



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

3

Том 69 • 2024

Volume 69 • Issue 3 • 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 30.06.2023.
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.

3

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 June 30, 2023.
Print format 60 × 90^{1/8}.
Circulation 50 copies.

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

16+

© Central Research Institute for Epidemiology, 2024

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

PROBLEMS OF VIROLOGY

(VOPROSY VIROLOGII)

SCIENTIFIC THEORETICAL JOURNAL ISSUED
ONCE IN TWO MONTHS

Published since 1956

3

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

ОБЗОРЫ

Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Борисевич С.В.

Сравнительный анализ критериев классификации ряда групп патогенных ДНК- и РНК-содержащих вирусов на основе геномных данных 203

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мырзахметова Б.Ш., Жаппарова Г.А., Бисенбаева К.Б., Тойтанова А.С., Туысканова М.С., Жугунисов К.Д., Кутумбетов Л.Б.

Иммунная реактивность двух биологических моделей на прививку инактивированной вакциной QazVac против коронавирусной инфекции COVID-19* 219

Ожмегова Е.Н., Кузнецова А.И., Лебедев А.В., Антонова А.А., Ким К.В., Мунчак Я.М., Туманов А.С., Казеннова Е.В.

Эффективность схем АРТ первой линии на основе TDF у ВИЧ-инфицированных пациентов с преобладающей мутацией А62V в обратной транскриптазе* 231

Чернышев Р.С., Иголкин А.С., Шотин А.Р., Зиняков Н.Г., Колбин И.С., Садчикова А.С., Лаврентьев И.А., Груздев К.Н., Мазлум А.

Пространственно-временной кластерный анализ циркуляции вируса африканской чумы свиней (Asfarviridae: *Asfivirus*) в Калининградской области на основе трех генетических маркеров* 241

Яшина Л.Н., Жигалин А.В., Абрамов С.А., Лучникова Е.М., Сметанникова Н.А., Дупал Т.А., Кривопапов А.В., Вдовина Е.Д., Свиринов К.А., Гаджиев А. А., Малышев Б.С.

Выявление коронавирусов (*Coronaviridae*) у рукокрылых на территории Северного Кавказа и юга Западной Сибири* 255

AlKhuzaie A.A.M., Jabbar E.A.K., Albadry B.J.

Электролиты, цинк и витамин D₃ у пациентов с COVID-19 с сердечно-сосудистыми осложнениями* 266

Ihoukou P.J., Boumba A.L.M., Ngombe Mouabata D.F.L., Massengo N.R.B., Malonga G.A., Moukassa D., Ennaji M.M.

Обнаружение и генотипирование вируса герпеса человека 8-го типа (Orthoherpesviridae: *Rhadinovirus: Rhadinovirus humangamma 8*) молекулярными методами у доноров крови в Конго* 277

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

Иванов А.П., Дзагурова Т.К., Курашова С.С., Теодорович Р.Д., Клеблеева Т.Д., Ткаченко Е.А.

Система иммуноферментного анализа для серологической диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом на основе инактивированного очищенного вируса Пуумала (*Hantaviridae: Orthohantavirus*) 285

ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

Ершов Ф.И.

Мой учитель. К 110-летию со дня рождения академика Виктора Михайловича Жданова 290

ИНФОРМАЦИЯ

О вручении Государственной премии в области науки и техники за 2023 год члену-корреспонденту РАН Петру Михайловичу Чумакову 293

CONTENTS

REVIEWS

Sizikova T.E., Lebedev V.N., Borisevich S.V.

Comparative analysis of the taxonomic classification criteria for a number of groups of pathogenic DNA and RNA viruses based on genomic data 204

ORIGINAL RESEARCHES

Myrzakhmetova B.Sh., Zhapparova G.A., Bissenbayeva K.B., Toytanova A.S., Tuyskanova M.S., Zhugunissov K.D., Kutumbetov L.B.

Immune reactivity of two biological models to vaccination with inactivated vaccine QazVac against coronavirus infection COVID-19* 219

Ozhmegova E.N., Kuznetsova A.I., Lebedev A.V., Antonova A.A., Kim K.V., Munchak Ya.M., Tumanov A.S., Kazennova E.V.

Efficacy of first-line ART regimens based on tenofovir in HIV-infected patients with pre-existing A62V mutation in reverse transcriptase* 231

Chernyshev R.S., Igoikin A.S., Shotin A.R., Zinyakov N.G., Kolbin I.S., Sadchikova A.S., Lavrentiev I.A., Gruzdev K.N., Mazloum A.Spatio-temporal clustering of African swine fever virus (Asfarviridae: *Asfivirus*) circulating in the Kaliningrad region based on three genome markers* 241**Yashina L.N., Zhigalin A.V., Abramov S.A., Luchnikova E.M., Smetannikova N.A., Dupal T.A., Krivopalov A.V., Vdovina E.D., Svirin K.A., Gadzhiev A.A., Malyshev B.S.**Coronaviruses (*Coronaviridae*) of bats in the northern Caucasus and south of western Siberia* 255**Alkhuzaie A.A.M., Jabbar E.A.K., Albadry B.J.**Electrolytes, Zinc and Vitamin D₃ in COVID-19 Patients with Cardiovascular Complications* 266**Iloukou P.J., Boumba A.L.M., Ngombe Mouabata D.F.L., Massengo N.R.B., Malonga G.A., Moukassa D., Ennaji M.M.**Molecular detection and genotyping of human herpes virus 8 (Orthoherpesviridae: *Rhadinovirus: Rhadinovirus humangamma 8*) in blood donors in Congo* 277

TO HELP THE VIROLOGYST

Ivanov A.P., Dzagurova T.K., Kurashova S.S., Teodorovich R.D., Klebleeva T.D., Tkachenko E.A.Enzyme immunoassay system for serological diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome based on inactivated purified Puumala virus (Hantaviridae: *Orthohantavirus*) 285

ANNIVERSARY DATES

Ershov F.I.

My teacher. On the 110th anniversary of academician Viktor Mikhailovich Zhdanov 290

INFORMATION

On the presentation of the State Prize in Science and Technology for 2023 to Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences Petr Mikhailovich Chumakov 293

ОБЗОРЫ



НАУЧНЫЙ ОБЗОР

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-238>

© СИЗИКОВА Т.Е., ЛЕБЕДЕВ В.Н., БОРИСЕВИЧ С.В., 2024

Сравнительный анализ критериев классификации ряда групп патогенных ДНК- и РНК-содержащих вирусов на основе геномных данных

Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Борисевич С.В.✉

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

Резюме

В обзоре рассмотрено обоснование критериев идентификации таксономической принадлежности некоторых групп патогенных ДНК- и РНК-содержащих вирусов на основе результатов секвенирования генома. Проанализированы данные секвенирования геномной нуклеиновой кислоты вирусов, геном которых представлен двухцепочечной ДНК (на примере ортопоксвирусов), одноцепочечной «плюс» РНК (на примере альфавирусов и флавивирусов), одноцепочечной несегментированной «минус» РНК (на примере филовирусов), одноцепочечной сегментированной «минус» РНК (на примере аренавирусов и флебовирусов). Для каждой группы вирусов установлены уровни генетической изменчивости, определяющие отнесение сравниваемых вирусов к таксонам разных порядков.

Ключевые слова: геном; ДНК- и РНК-содержащие вирусы; группы вирусов; секвенирование; генетическая изменчивость; ортопоксвирусы; альфавирусы; флавивирусы; филовирусы; аренавирусы; флебовирусы

Для цитирования: Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. Сравнительный анализ критериев классификации ряда групп патогенных ДНК- и РНК-содержащих вирусов на основе геномных данных. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(3): 203–218. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-238> EDN: <https://elibrary.ru/njrkwu>

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.

REVIEW

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-238>

Comparative analysis of the taxonomic classification criteria for a number of groups of pathogenic DNA and RNA viruses based on genomic data

Tatiana E. Sizikova, Vitaliy N. Lebedev, Sergey V. Borisevich✉

48 Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation, 141306, Sergiev Posad, Russia

Abstract

The basis for criteria of the taxonomic classification of DNA and RNA viruses based on data of the genomic sequencing are viewed in this review. The genomic sequences of viruses, which have genome represented by double-stranded DNA (orthopoxviruses as example), positive-sense single-stranded RNA (alphaviruses and flaviviruses as example), non-segmented negative-sense single-stranded RNA (filoviruses as example), segmented negative-sense single-stranded RNA (arenaviruses and phleboviruses as example) are analyzed. The levels of genetic variability that determine the assignment of compared viruses to taxa of various orders are established for each group of viruses.

Keywords: genome; DNA and RNA viruses; group of viruses; sequencing; genetic variation; orthopoxviruses; alphaviruses; flaviviruses; filoviruses; arenaviruses; phleboviruses

For citation: Sizikova T.E., Lebedev V.N, Borisevich S.V. Comparative analysis of the taxonomic classification criteria for a number of groups of pathogenic DNA and RNA viruses based on genomic data. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(3): 203–218 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-238> EDN: <https://elibrary.ru/njrkwu>

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

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

Введение

Вирусы – это облигатные внутриклеточные паразиты, имеющие собственный геном, кодирующий структурные белки и ферменты, и способные реплицироваться только в чувствительных клетках [1].

В современной классификации вирусы представляют отдельный, но формально не выделенный аналог домена (domain) – Viruses, наряду с тремя главными доменами живой природы: археями (Archaea), бактериями (Bacteria) и эукариотами (Eukarya). Внутри домена Viruses вирусы объединены в 6 основных надцарств (realm), 10 царств (kingdom), 17 типов (phylum), 65 отрядов (order), 233 семейства (family) и 2606 родов (genus), включающих более 10 тыс. описанных видов (species). Внутри основных таксономических рангов используют промежуточные ранги, такие как подтип, подсемейство, подрод¹. Концепция вида в вирусологии разрабатывалась с середины 1980-х гг. В настоящее время под видом вируса понимают монофилетическую группу вирусов, занимающих одну экологическую нишу. И эта группа может быть дифференцирована от родственных вирусов на основе серологических, генетических или филогенетических критериев.

Традиционные подходы идентификации и классификации вирусов основаны на антигенных связях и включают в себя серологические (реакция нейтрализации, реакция торможения гемагглютинации) и иммунохимические методы (иммуноферментный анализ, метод флуоресцирующих антител и др.). В основе данных методов лежит взаимодействие вирусов со специфическими антителами. Фактором, непосредственно влияющим на воспроизводимость полученных данных, является изменчивость поверхностных антигенов вирусов, которая обусловлена двумя генетическими процессами: дрейфом, не выводящим штамм вируса за пределы данного вида, и шифтом, определяющим изменения, приводящие к появлению нового вида вируса [2, 3], а также необходимостью использования стандартизованного антителосодержащего субстрата при строгом соблюдении принципа «единственного различия». Кроме того, достаточно сложно установить строгие количественные границы серологических различий при установлении видовой идентичности. Для идентификации и классификации вирусов на основе антигенных реакций используют стандартизованные панели сывороток и антигенов, которые хранятся в коллекциях вирусов. Минималь-

ный порог кратности антигенных различий в перекрестной реакции, необходимый и достаточный для идентификации того или иного вируса в качестве самостоятельного вида, зависит не только от используемого серологического теста и конкретных методических особенностей его постановки, но и от таксономической принадлежности исследуемого изолята вируса и варианта сравнения.

Антигенные связи выявляются только внутри родственных групп вирусов, как правило, принадлежащих одному виду и роду. Для определения критериев более высоких таксономических рангов (семейство и выше) основное значение имеют тип и структура генома, структура вириона (тип симметрии нуклеокапсида, число капсомеров, наличие или отсутствие суперкапсида)¹.

В настоящее время одно из важнейших мест в диагностике инфекционных заболеваний занимают молекулярно-биологические и молекулярно-генетические методы, направленные на изучение особенностей генома. В диагностике вирусных инфекционных заболеваний наиболее часто используют выявление возбудителя с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), ДНК-чипов, а также секвенирование геномных нуклеиновых кислот (НК). Для проведения секвенирования НК традиционно используют метод Сэнгера [цит. по 2]. В настоящее время широкое распространение получили технологии секвенирования нового поколения – массивное параллельное секвенирование [4] и нанопоровое секвенирование [5]. Последние модели автоматических секвенаторов позволяют при секвенировании получить значительный объем генетической информации. Внедрение методов секвенирования нового поколения приводит к упрощению процесса, уменьшению временных затрат (в первую очередь – на анализ результатов) и снижению его стоимости.

Анализ исследований в области молекулярной биологии и генетики вирусов, свидетельствует о широком внедрении в практику метода секвенирования для генотипирования возбудителей опасных и особо опасных вирусных инфекций. В настоящее время для каждого семейства определены свои критерии таксономии, которые могут быть основаны на определенном гене или группе генов, т.е. секвенирование геномных НК вирусов можно условно разделить на секвенирование по одному гену и секвенирование по всему геному. Выбор варианта секвенирования зависит от поставленных задач. Для классификации новых видов, как правило, требуется полногеномное секвенирование, при характеристике геновариантов внутри вида может быть использовано и секвенирование определенного гена. Результаты секвенирова-

¹ICTV. Current ICTV Taxonomy Release. Available at: <http://talk.ictvonline.org/taxonomy/>

ния могут быть использованы в качестве алгоритма определения места вновь выделенного изолята вируса в соответствующем таксоне семейства. В настоящее время разработан порядок применения молекулярно-биологических и молекулярно-генетических методов, основанный на структурированном подходе (алгоритме) индикации и генетической характеристике патогенного биологического агента. Обоснован трехуровневый алгоритм молекулярно-генетической характеристики патогенов (I уровень – выявление возбудителя с помощью ПЦР, II уровень – секвенирование фрагментов генома возбудителя, III уровень – проведение генотипирования [6].

Границы вида определяются критериями, принятыми Международным комитетом по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) для данной группы вирусов. Молекулярно-биологический анализ геномной НК исследуемого возбудителя, основанный на данных секвенирования, позволит точно определить возможный уровень изменчивости внутри данного вида.

Возбудители особо опасных вирусных инфекционных заболеваний – это вирусы, геном которых представлен двухцепочечной (ds)ДНК, либо одноцепочечной (ss)(+)РНК, либо одноцепочечной (ss)(–)РНК. Критерии определения до вида четко определены ICTV. Критерии выделения отдельных вирусов и их геновариантов, как правило, определяются исторической традиций для этой группы, при этом данные молекулярно-генетических исследований хорошо согласуются с результатами, полученными при использовании серологических тестов. Однако при использовании только данных секвенирования генома для разных групп вируса отсутствуют универсальные количественные критерии, четко определяющие таксономическую принадлежность исследуемого возбудителя.

Цель работы – провести обзор и сравнительный анализ критериев, применяемых для идентификации и определения таксономической принадлежности ряда групп патогенных ДНК- и РНК-содержащих вирусов на основе геномных данных.

Вирусы, геном которых представлен dsДНК

Натуральная оспа – заболевание человека, характеризующееся высокой летальностью (30–50%), многочисленными, разнообразными и тяжелыми осложнениями. Восприимчивость человека к этой инфекции составляет более 95% [7–11].

В природе продолжают циркулировать ортопоксвирусы, в том числе и патогенные для человека: вирусы оспы обезьян, оспы коров, оспы буйволов. С прекращением вакцинации происходит снижение коллективного иммунитета, что позволяет распространяться в человеческой популяции патогенным для человека ортопоксвирусами. Скорость накопления мутаций в геноме ортопоксвирусов составляет 1×10^6 нуклеотидных замен на сайт в год [12].

Геном ортопоксвирусов представлен линейной dsДНК размером 170–250 тыс. пар нуклеотидных

остатков (п.н.о.) [13, 14]. Первые попытки установить эволюционную удаленность разных видов ортопоксвирусов были предприняты при помощи построения рестрикционных карт генома. Еще в конце прошлого века были построены рестрикционные карты геномов всех известных к тому времени представителей рода *Orthopoxvirus*. Такое картирование может служить критерием принадлежности исследуемого вируса к роду *Orthopoxvirus*, а внутри рода – критерием принадлежности к тому или иному виду. Однако при использовании данного метода нельзя установить, какой из видов является самым близким к наиболее общему предку и, соответственно, имеет больший эволюционный потенциал. Ответ на этот вопрос может дать секвенирование и изучение функционально-структурной организации генома исследуемого ортопоксвируса.

Полная структура генома вируса вакцины была определена в 1990 г. [13], вируса натуральной оспы – в 1992 г. [14]. Сравнительный анализ геномов вируса вакцины и вируса натуральной оспы позволил установить уровень изменчивости их генов. Установлено, что такие характеристики вируса вакцины и вируса натуральной оспы, как патогенность и круг восприимчивых хозяев, определяются разными наборами генов [14]. Это означает, что вирус натуральной оспы не мог произойти от вируса вакцины, а также вирус вакцины не мог произойти от вируса натуральной оспы. В то же время наличие выраженной гомологии в центральной области генома указывает на то, что эти вирусы имеют общего предшественника.

Сравнение нуклеотидных последовательностей вируса вакцины и вируса натуральной оспы указывает на то, что они имеют протяженные делеции относительно друг друга. Тот вирус, который при сравнении двух вирусов имеет наиболее протяженный геном, является эволюционно более близким к вирусу-предшественнику, что, как правило, подтверждается сравнением уровня гомологии наиболее консервативных генов. Из известных к настоящему времени ортопоксвирусов наиболее протяженным геномом и наиболее полным набором вирусных генов обладает вирус оспы коров [13, 15].

Для идентификации разных ортопоксвирусов использованы различные наборы генов. Описано использование для этой цели генов хемокинсвязывающего белка и α/β -интерферонсвязывающего белка, а также гена белка A27C, кодирующего консервативный белок вириона [12]. Для идентификации вновь выделяемых изолятов ортопоксвирусов как новых штаммов какого-либо идентифицированного вида или как представляющих отдельный самостоятельный вирус, перспективной является стратегия, предложенная G.L. Emerson и соавт. [16], предусматривающая анализ 9 открытых рамок считывания генома: A7L – ранний транскрипционный фактор, большая субъединица; A10L – основной центральный белок; A24R – РНК-полимераза 132; D1R – информационная РНК копирующего фермента, большая субъединица; D5R – ДНК-зависимая нуклеотидфосфатаза;

E6R – гипотетический белок; E9L – ДНК-полимераза; H4L – белок, ассоциированный с РНК-полимеразой; J6R – РНК-полимераза 147.

Такой методический подход был использован для идентификации таксономической принадлежности недавно выявленных ортопоксвирусов: вирусов оспы кошек, Ахмета, Аляска. С этой целью было проведено выравнивание сцепленных геномных последовательностей ортопоксвирусов, представляющих Северную Америку и Старый Свет.

Данные сравнения геномных последовательностей 9 выбранных генов вируса оспы кошек (штамм Италия_09/17) с соответствующими геномными последовательностями для вирусов оспы кроликов, оспы обезьян, натуральной оспы, оспы коров, вакцины, экстремелии свидетельствуют о том, что вирус оспы кошек является отдаленно родственным по отношению к другим ортопоксвирусам, в том числе всем 10 линиям вируса оспы коров [17] и недавно выделенным сублиниям [18, 19]. При этом обнаружено более близкое родство с прототипным штаммом вируса экстремелии.

На филогенетическом дереве ортопоксвирусов штамм Италия_09/17 вируса оспы кошек формирует отдельный кластер, включающий также недавно выделенный от макак в Италии штамм Abatino. Нуклеотидная идентичность штамма Италия_09/17 и штамма Abatino составляет 99,66%, в то время как с референтными штаммами вируса экстремелии – 98,11–98,13%. По результатам анализа гена гемагглютинина, уровень идентичности штамма Италия_09/17 и штамма Abatino еще выше (99,79%) [20]. Следовательно, штаммы Италия_09/17 (выделенный от кошек) и Abatino (выделенный от макак) могут рассматриваться как штаммы одного нового ортопоксвируса Старого Света (вирус оспы кошек).

Изучение структуры генома вируса Ахмета показало наиболее высокую идентичность данного возбудителя с вирусом оспы коров. По сравнению с вирусом оспы коров, в центральной части генома вируса Ахмета отсутствовал только ген *CPXV119A*, кодирующий белок размером 80 аминокислотных остатков, в то время как он содержал малый ген *AKMV059*, отсутствующий у изолятов вируса оспы коров. Наибольший уровень геномных различий установлен по отношению к вирусу экстремелии, в центральном регионе которого отсутствуют 7 малых генов, выявленных в центральной части генома вируса Ахмета [21].

Филогенетический анализ перекрывающейся последовательности генома размером 28 037 п.н.о. выявил, что вирус Аляска (штамм АК2015) представляет собой отдельную генетическую линию ортопоксвирусов, которая значительно отличается как от североамериканских ортопоксвирусов (вирусы оспы енотов, оспы скунсов, оспы полевок) так и от ортопоксвирусов Старого Света (вирусы оспы верблюдов, оспы вакцины, оспы коров, экстремелии, Ахмета).

Вирус Аляска входит в монофилетическую кладу ортопоксвирусов Старого Света, уровень различия с отдельными видами которых составляет 6,1–7,3%, соот-

ветствующий показатель при сравнении с североамериканскими ортопоксвирусами составляет 12,3–12,8%. В этой связи следует отметить, что уровень генетических различий между сравниваемыми ортопоксвирусами Старого Света колеблется от 0,6% (в паре вирус оспы верблюдов – вирус оспы полевок) до 3,2% (в паре вирус экстремелии – вирус натуральной оспы) [18].

Рассмотренные данные позволяют установить видовую идентификацию вирусов Ахмета, Аляска и оспы кошек как отдельных представителей рода *Orthopoxvirus*.

Положение новых ортопоксвирусов на филогенетическом дереве ортопоксвирусов Старого Света, по результатам секвенирования генов A7L, A10L, A24R, D1R, D5R, E6R, E9L, H4L, J6R (имеющих близкие уровни консервативности) представлено на рисунке [18, 21, 22]. Результаты секвенирования геномов новых ортопоксвирусов позволяют предполагать возможность рекомбинации между ними и уже известными представителями рода, в результате которого возможно спонтанное появление варианта с повышенным уровнем патогенности для человека, вероятно, приближающемуся к таковому для вируса натуральной оспы.

На основании существующих критериев демаркации видов ортопоксвирусов¹ нами предложены следующие количественные показатели для проведения таксономической характеристики новых изолятов ортопоксвирусов (табл. 1). Необходимо отметить, что при проведении таксономической характеристики нами использованы данные частичного секвенирования генома. Результаты полногеномного секвенирования, безусловно, позволят уточнить предложенные количественные показатели, однако возможные изменения вряд ли будут носить кардинальный характер.

Вирусы, геном которых представлен ss(+)РНК

Для анализа критериев идентификации видовой принадлежности РНК-содержащих вирусов этого класса по результатам секвенирования генома рассмотрены данные секвенирования представителей рода *Alphavirus* семейства *Togaviridae* – вирусов комплекса венесуэльского энцефаломиелита лошадей (ВЭЛ) и восточного энцефаломиелита лошадей (ВсЭЛ) и представителей рода *Flavivirus* семейства *Flaviviridae* – вирусов комплекса японского энцефалита.

Альфовирусы

Род *Alphavirus* семейства *Togaviridae* объединяет в настоящее время 34 самостоятельных вируса, разделенных на 7 антигенных комплексов (комплексы вируса Леса Барма, вируса ВсЭЛ, вируса Ндumu, вируса Леса Семлики, вируса ВЭЛ, вируса западного энцефаломиелита лошадей и неклассифицированные альфовирусы).

Строение генома альфовирусов выглядит следующим образом: «кэпированный» 5'-конец, нетранслируемая область, гены неструктурных белков Nsp1, Nsp2, Nsp3, Nsp4, 26S; РНК, содержащая гены структурных белков, нетранслируемая область, поли-А последовательность на 3'-конце. Общий размер генома

составляет около 12 тыс. нуклеотидов [23–26]. Расчетная скорость мутаций (которые потенциально могут привести к появлению вирулентных для человека природных штаммов) для геномов указанных альфавирусов составляет приблизительно $1,0 \times 10^{-4}$ нукле-

отидных замен в соответствующих позициях генома в год [27].

В комплекс ВЭЛ входят альфавирусы со схожими генетическими характеристиками и перекрестной антигенной активностью [28]. Альфавирусы являют-

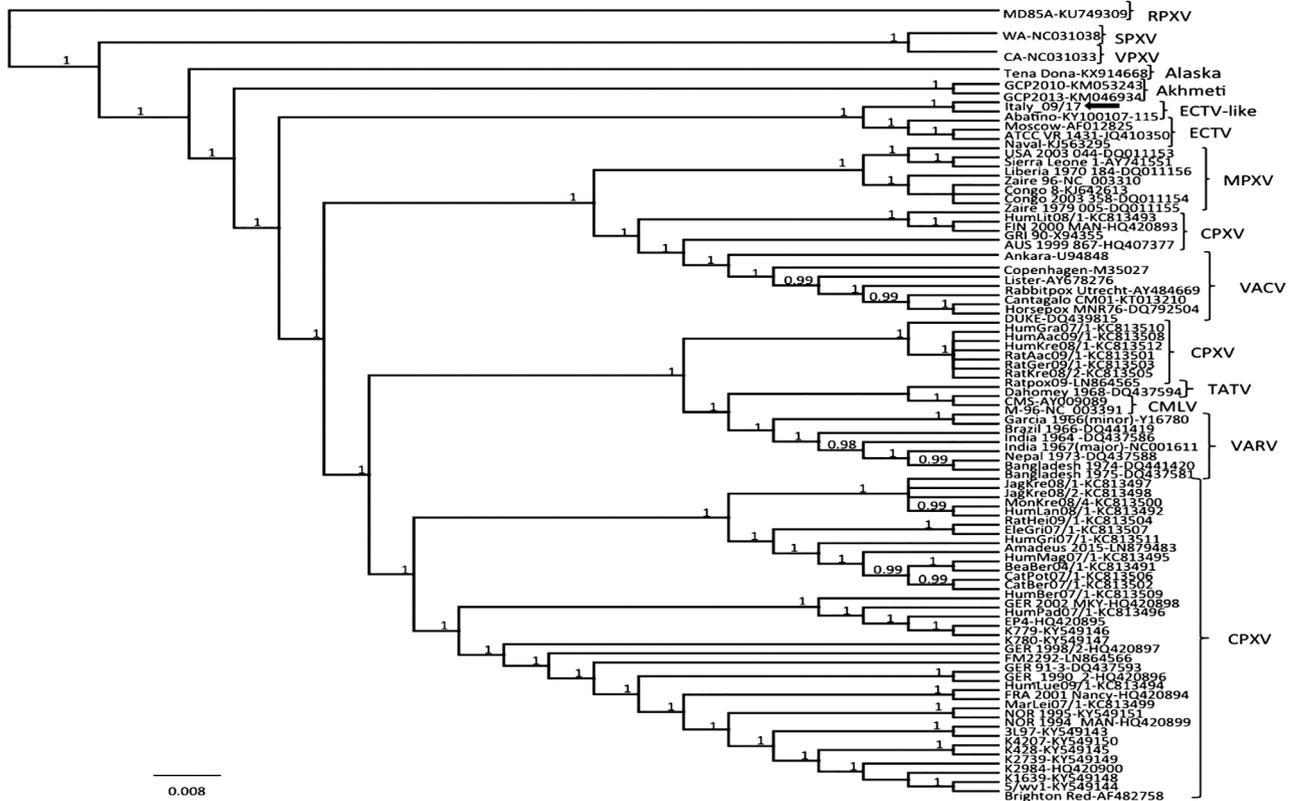


Рисунок. Положение вирусов Ахмета, Аляска и оспы кошек на филогенетическом дереве ортопоксвирусов Старого Света.
Figure. The position of the Alaska virus, the Akhmat virus and cat poxvirus on the phylogenetic tree of the Old World orthopoxviruses.

Таблица 1. Количественные показатели для проведения таксономической характеристики новых изолятов ортопоксвирусов при секвенировании по генам A7L, A10L, A24R, D1R, D5R, E6R, E9L, H4L, J6R
Table 1. The quantitative indicators for the taxonomic characterization of new isolates of orthopoxviruses based on A7L, A10L, A24R, D1R, D5R, E6R, E9L, H4L, J6R genes

Результаты секвенирования (уровень различий между сравниваемыми ортопоксвирусами), % Sequencing results (the level of differences between the compared orthopoxviruses) %	Вывод по результатам секвенирования Conclusion based on sequencing results
Менее 0,6 Less than 0.6	Сравниваемые ортопоксвирусы относятся к одному виду The orthopoxviruses being compared belong to the same species 0,6–3,2
0,6–3,2	Сравниваемые ортопоксвирусы относятся к разным видам монофилетической клады ортопоксвирусов Старого Света, за исключением вируса Аляска и вируса Ахмета The orthopoxviruses being compared belong to different species of a monophyletic clade of Old World orthopoxviruses, with the exception of the Alaska virus and the Akhmat virus
3,2–7,3	Сравниваемые ортопоксвирусы относятся к разным видам монофилетической клады ортопоксвирусов Старого Света The orthopoxviruses being compared belong to different species of a monophyletic clade of Old World orthopoxviruses
7,3–12,8	Сравниваемые ортопоксвирусы относятся к разным монофилетическим клатам (Старого и Нового Света) The orthopoxviruses being compared belong to different monophyletic clades of Old World orthopoxviruses and New World orthopoxviruses

ся ре-эмерджентными арбовирусами, вызывающими эпизоотии лошадей и вспышки заболеваний человека [29]. Комплекс ВЭЛ разделяется на 6 подтипов (I–VI), в которые входят 9 вирусов [30], наибольшее значение для здравоохранения и ветеринарии имеет вирус ВЭЛ.

Филогенетический анализ вирусов комплекса ВЭЛ основан на определении нуклеотидной последовательности генов структурных белков [24, 26, 31, 32]. N.L. Forrester и соавт. [28] провели анализ комплекса ВЭЛ с помощью секвенирования геномов 94 штаммов вирусов с последующим филогенетическим анализом при использовании открытых рамок считывания для структурных и неструктурных белков. Результаты анализа показали, что селекция является основным фактором эволюции этих возбудителей, а также определяющим механизмом молекулярных часов датирования наиболее позднего общего предка, которое для подтипов ID/IAB/IC/I II и IE составляет 149–973 года. IE-подтип комплекса ВЭЛ характеризует значительный эволюционный сдвиг. Увеличение количества аминокислотных замен в структурных белках является уникальным для этого подтипа, что отражает адаптацию возбудителя к уникальному вектору – комарам *Culex taeniopus*.

Проведенные исследования позволили подтвердить гипотезу, согласно которой подтипы IAB и IC произошли от энзоотического подтипа ID вследствие мутаций, что привело к изменению их эпидемических и эпизоотических характеристик [26, 32–35]. Деление внутри комплекса на подтипы I–VI ранее было проведено по результатам серологических тестов. Однако дифференциация между субтипами A–F антигенного подтипа I при использовании только серологических тестов невозможна [36–38]. Результаты секвенирования геномной РНК могут внести изменения в существующую в настоящее время таксономическую номенклатуру, в результате чего некоторые штаммы возбудителя ВЭЛ сейчас классифицируют как отдельные самостоятельные вирусы. Например, подтип IF существенно отличается от других субтипов подтипа I и в настоящее время рассматривается не как штамм вируса ВЭЛ, а как отдельный возбудитель (вирус Mosso das Pedras).

До относительно недавнего времени вирус ВcЭЛ рассматривался как единственный представитель одноименного комплекса. Однако в результате проведенных в последнее время генетических исследований представители южноамериканского подтипа возбудителя ВcЭЛ рассматриваются в качестве отдельных штаммов самостоятельного вируса, получившего название вирус Мадариага [39]. Установлены различия вируса Мадариага с возбудителем ВcЭЛ, циркулирующим в Северной Америке.

Согласно классификации, предложенной N.C. Arrigo и соавт. [27], североамериканский подтип вируса ВcЭЛ образует одну генетическую линию комплекса ВcЭЛ (линия I). Эта линия включает штаммы вируса ВcЭЛ из Северной Америки. Южноамериканский подтип вируса ВcЭЛ, или вирус Мадариага, разделен на линии II, III и IV.

Филогенетический анализ, проведенный с помощью программы MUSCLE [40], выявил, что штаммы, выделенные от больных на Гаити, относятся к линии III, которая представляет изоляты из Центральной и Южной Америки и изоляты из Центральной Америки, формирующие Центральноамериканскую Карибскую монофилетическую сублинию. Время появления наиболее позднего общего предка для этой сублинии 1939 г. (I_{95} – 1931–1948 гг.). В пределах данной сублинии новые изоляты из Гаитянского кластера близки к изолятам, выделенным в Панаме. Оцениваемая скорость эволюции составляет $1,2 \times 10^{-4}$ нуклеотидных замен в год [27].

Количественные показатели для проведения таксономической характеристики новых изолятов вирусов комплексов ВЭЛ и ВcЭЛ по результатам секвенирования геномной РНК представлены в табл. 2.

Флавивирусы

Представители рода *Flavivirus* – это возбудители, геном которых представлен ss(+)РНК, содержащей 7-метилгуанозинный кэп на 5'-конце. Геномная РНК размером около 11 тыс. нуклеотидных остатков (н.о.) содержит одну открытую рамку считывания, которая фланкирована 5'-концевым экпированным некодирующим регионом и 3'-концевым некодирующим регионом, совместно формирующими петлевидную структуру, необходимую для вирусной репликации и трансляции, и содержит детерминанты, определяющие патогенность возбудителя [41].

Открытая рамка считывания флавивирусов кодирует 10 белков, включающих 3 структурных (белок нуклеокапсида (С), трансмембранный белок (рgМ) и белок оболочки (Е)), а также 7 неструктурных (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b и NS5) белков [41].

Род *Flavivirus* (семейство *Flaviviridae*) разделяется по меньшей мере на 14 групп, это деление базируется на данных анализа нуклеотидного состава геномных РНК и рассчитанных на его основе аминокислотных последовательностях структурных белков, антигенному родству и другим характеристикам [41].

Двумя близкородственными группами внутри рода *Flavivirus* являются группы вирусов Нтайя и японского энцефалита.

Группа японского энцефалита, кроме одноименного вируса, включает такие возбудители инфекционных заболеваний человека, как вирусы энцефалита Долины Мюррея, энцефалита Сан-Луи, Западного Нила, денге, желтой лихорадки. Группа Нтайя включает, в частности, вирусы Ильеус, Росио и Зика¹.

Минимальный порог кратности антигенных различий в перекрестной реакции, необходимый и достаточный для идентификации того или иного флавивируса в качестве самостоятельного вида, составляет более 4 [42]. По результатам секвенирования геномной РНК пороговое значение, указывающее на принадлежность 2 сравниваемых флавивирусов к одному виду, должно быть более 84% [43].

Установление таксономической принадлежности вновь выделяемых флавивирусов будет рассмотрено

на примере вируса Росио, который ранее был классифицирован как подтип вируса Ильеус [44]. Вирус Росио впервые был выделен в штате Сан-Пауло (Бразилия) в 1975 г. от человека, погибшего от энцефалита неизвестной этимологии [45]. Летальность среди заболевших превышает 10% [46, 47].

Организация геномной РНК вируса Росио (с указанием генов структурных и неструктурных белков) представлена в **табл. 3**.

Для установления таксономического родства вируса Росио с другими флавивирусами достаточно ис-

пользовать данные секвенирования гена белка NS5 размером 1358 нуклеотидов.

Уровень гомологии указанного участка по сравнению с вирусом Ильеус составляет 81,9%, с вирусом Зика – 78,3%, с вирусом японского энцефалита – 64,5%, с вирусом Западного Нила – 65,0%, с вирусом энцефалита долины Муррея – 64,7%, с вирусом энцефалита Сан-Луи – 66,1% [41, 48–50].

Полученные данные дают основания для проведения таксономической характеристики новых изолятов флавивирусов по результатам частичного секвениро-

Таблица 2. Количественные показатели для проведения таксономической характеристики новых изолятов вирусов комплексов ВЭЛ и ВсЭЛ по результатам секвенирования геномной РНК

Table 2. The quantitative indicators for the taxonomic characterization of new isolates of VEE and EEE virus complexes based on data of sequencing of genomic RNA

Результат секвенирования (уровень различий между сравниваемыми альфавирусами), % Sequencing result (the level of differences between the compared alphaviruses), %	Вывод по результатам секвенирования Conclusion based on sequencing result
Менее 0,1 Less than 0.1	Сравниваемые изоляты вирусов относятся к одному генотипу определенного субтипа The compared virus isolates belong to the same genotype of a certain subtype
0,1–0,3	Сравниваемые изоляты вирусов относятся к одному субтипу определенного подтипа The compared virus isolates belong to the same genotype of a certain type
0,3–2,3	Сравниваемые изоляты вирусов относятся к разным подтипам комплекса The compared virus isolates belong to different subtypes of complex
Более 2,3 More than 2.3	Сравниваемые изоляты вирусов относятся к разным комплексам рода <i>Alphavirus</i> The compared virus isolates belong to different complexes of <i>Alphavirus</i> genus

Таблица 3. Организация геномной РНК вируса Росио [48]

Table 3. The organization of the genomic RNA of the Rocio virus [48]

Вирусспецифические белки Viral proteins	Участки генома Genome regions	Размер (н.о.) Size (nt)	Позиции генома Position in genome
5'- и 3'-нетранслируемые участки 5' and 3' untranslated regions	5'НКР	92	1–92
	3'НКР	424	10 371–10 794
Структурные белки Structural proteins	C	354	93–446
	p ₂ M	501	447–947
	E	1503	948–2450
	NS1	1059	2451–3509
	NS2A	681	3510–4190
	NS2B	393	4191–4583
	NS3	1857	4584–6440
Неструктурные белки Nonstructural proteins	NS4A	378	6441–6818
	2K	69	6819–6887
	NS4B	768	6888–7655
	NS5	2715	7656–10 370

Примечание. НКР – некодируемый регион.

Note. NCR – noncoding region.

вания геномной РНК (по гену белка NS5). Результаты представлены в табл. 4.

Вирусы, геном которых представлен ss(-)РНК

При анализе этого класса рассмотрены группы вирусов с несегментированным (на примере представителей семейства *Filoviridae* порядка *Mononegavirales*) и сегментированным геномами (на примере представителей семейств *Arenaviridae* и *Phenuiviridae* порядка *Bunyavirales*).

Филовирусы

Таксономия семейства *Filoviridae* в последние десятилетия претерпела существенные изменения. Еще в конце прошлого века в это семейство входил единственный род – *Filovirus*, который включал вирусы Марбург и Эбола [51]. Внедрение в практику вирусологических исследований методов молекулярной биологии и молекулярной генетики привело к существенному изменению таксономии семейства *Filoviridae*. На родовом уровне сначала род *Filovirus* был разделен на роды *Marburgvirus* и *Ebolavirus* (в настоящее время получившие названия *Orthomarburgvirus* и *Orthoebolavirus*) [52]. В дальнейшем был идентифицирован ряд новых филовирусов, представляющих самостоятельные роды *Cuevavirus*, *Dianlovirus*, *Striavirus*, *Thamnovirus* [53, 54].

Вирус Эбола – общее название вирусов, относящихся к роду *Orthoebolavirus* семейства *Filoviridae*. На уровне вида вирусов сначала вирус Эбола был разделен на вирусы Эбола-Заир (по бинарной номенклатуре – *Orthoebolavirus zairense*) и Эбола-Судан (*Orthoebolavirus sudaense*), рассматриваемых ранее как подтипы одного возбудителя. Затем в качестве отдельных вирусов были идентифицированы патогенные для человека вирусы Эбола-Таи Форест (*Orthoebolavirus taiense*) [55] и Эбола-Бундибуджио

(*Orthoebolavirus bundibudgioense*) [56], патогенный для приматов вирус Эбола-Рестон (*Orthoebolavirus restonense*) [57] и вирус Бомбали (*Orthoebolavirus bombaliense*), патогенность которого для каких-либо животных в настоящее время не определена [58, 59].

Таким образом, из 6 видов вируса Эбола 3 вида вызывают у человека заболевание с высокой летальностью: Эбола-Заир – летальность 50–90%, Эбола-Судан – около 50% и Эбола-Бундибуджио – около 30%.

В семейство *Orthomarburgvirus* ранее входил один вид – вирус Марбург. Вирус Ravn, в настоящее время рассматриваемый в качестве самостоятельного вируса, сначала считали отдельным штаммом вируса Марбург [60].

Рассмотрим экспериментальные данные секвенирования геномов, которые легли в основу изменения таксономии семейства *Filoviridae*.

С целью филогенетического анализа представителей семейства *Filoviridae* S.A. Carroll и соавт. [61] провели детальный анализ 97 полногеномных нуклеотидных последовательностей, из которых 55 установлены после 2010 г. С помощью байесовского анализа авторы определили скорость эволюции и предполагаемое время происхождения филовирусов от общего предка. Рассмотрим результаты секвенирования для отдельных филовирусов.

Вирус Эбола-Заир

При анализе 22 полногеномных последовательностей, включающих образцы, взятые в разных регионах, выявлено, что генетическое разнообразие между штаммами вируса Эбола-Заир незначительное, максимальное различие между нуклеотидными последовательностями составляет 2,7%. У штаммов, выделенных в ходе одной вспышки, уровень различий еще ниже. Например, различия в нуклеотидных последовательностях изолятов выделенных в Луэ-

Таблица 4. Количественные показатели для проведения таксономической характеристики новых изолятов флавивирусов по результатам секвенирования геномной РНК (по гену белка NS5) (вид-вирус – генотип-штамм)

Table 4. Quantitative indicators for the taxonomic characterization of new isolates flaviviruses based on data of sequencing of genomic RNA (the NS5 protein coding region) (virus species–genotype-strain)

Результаты секвенирования (уровень различий между сравниваемыми флавивирусами), % Sequencing results (the level of differences between the compared flaviviruses), %	Вывод по результатам секвенирования Conclusion based on sequencing results
Менее 16 Less than 16	Сравниваемые изоляты вирусов относятся к одному и тому же виду флавивирусов The compared virus isolates belong to same flaviviruses species
16–25	Сравниваемые изоляты вирусов представляют разные виды, относящихся к одной и той же группе флавивирусов The compared virus isolates represent different species belonging to the same group of flaviviruses
25–36	Сравниваемые изоляты вирусов относятся к разным группам флавивирусов The compared virus isolates represent different group of flaviviruses
Более 36 More than 36	Если один из сравниваемых изолятов идентифицирован как относящийся к роду <i>Flavivirus</i> , другой не является членом данного рода The one of the compared isolates is identified as member of <i>Flavivirus</i> genus, while the other is not a member of this genus

Таблица 5. Количественные показатели для проведения таксономической характеристики новых изолятов филовирусов по результатам секвенирования геномной РНК (по гену белка L)

Table 5. Quantitative indicators for the taxonomic characterization of new isolates of filoviruses based on data of sequencing of genomic RNA (L protein gene)

Результаты секвенирования (уровень различий между сравниваемыми филовирусами), % Sequencing results (the level of differences between the compared filoviruses), %	Вывод по результатам секвенирования Conclusion based on sequencing results
Менее 4,5 Less than 4.5	Сравниваемые изоляты вирусов относятся к одному и тому же виду филовирусов The compared virus isolates belong to same filovirus species
4,5–20	Сравниваемые изоляты вирусов предположительно представляют разные виды, относящихся к одному и тому же роду филовирусов The compared virus isolates presumably represent different species, belonging to the same genus of filoviruses
20–35	Сравниваемые изоляты вирусов представляют разные виды, которые предположительно могут относиться к одному и тому же роду филовирусов The compared virus isolates represent different species, presumably belonging to the same genus of filoviruses
Более 35 More than 35	Сравниваемые изоляты вирусов представляют разные роды семейства <i>Filoviridae</i> The compared virus isolates represent different genus of <i>Filoviridae</i> family

бо (Демократическая Республика Конго) во время вспышки 2007–2008 гг., были менее 0,07% [61, 62].

Вирус Эбола-Судан

По сравнению с вирусом Эбола-Заир вирус Эбола-Судан имеет более ограниченное географическое происхождение, все 5 известных вспышек к настоящему времени произошли в районе протяженностью не более 560 км, что предположительно отражает ограниченное распределение природного резервуара или другие экологические ограничения. По вирусу Эбола-Судан проанализировано 5 полногеномных последовательностей, по одной из каждой вспышки. Результаты полногеномного секвенирования штаммов вируса Эбола-Судан показали, что в целом изменчивость вирусов внутри вида низкая, максимальное количество нуклеотидных замен (5,2%) установлено между изолятами из Судана, выделенными в 2004 г. и Уганды в 2011 г. [61, 62].

Вирус Эбола-Рестон

Проанализированы 7 полногеномных последовательностей изолятов вируса Эбола-Рестон, выделенных во время вспышек у низших приматов (Рестон, Пенсильвания, США) и в 1996 г. (Техас, США), на Филиппинах в 1989 г. и 2008–2009 гг. от свиней [57, 59]. Полученные данные показали влияние на генетическую изменчивость как временных, так и пространственных факторов. Оцениваемый уровень генетической изменчивости между различными выделенными изолятами составлял от 0,08 до 4,5% [61].

Вирус Марбург

Исследовано 60 последовательностей 48 изолятов от человека и 12 изолятов от летучих мышей. Полученные результаты показали, что уровень генетической изменчивости между штаммами вируса Марбург не пре-

вышает 4,6%. Уровень генетической изменчивости между вирусами Марбург и Ravn составил около 20% [60].

Для оценки влияния данных секвенирования геномов на таксономию семейства *Filoviridae* целесообразно рассмотреть соответствующие результаты для выявленных в последнее время филовирусов. Так, для вируса Бомбали, уровень генетической изменчивости которого от вируса Эбола-Заир составляет около 18%, отмечен высокий уровень идентичности геномов (98%) штаммов из Сьерра-Леоне и Кении [58]. При секвенировании вируса Ллови (род *Cuevavirus*) установлено, что по первичной структуре последовательности геномной РНК вирус на 57,3–57,7% отличается от вируса Марбург и на 51,8–52,6% от вируса Эбола-Заир [63].

При секвенировании вируса Менгла (род *Dianlovirus*) по фрагменту гена нуклеопротеина установлена 74% идентичность по отношению к вирусу Ллови, по фрагменту гена VP35 (69% идентичность по отношению к вирусу Эбола-Судан, по фрагменту гена РНК-зависимой РНК-полимеразы – 66–68% для членов рода *Ebolavirus*, 64% идентичность с вирусом Ллови и около 60% с вирусом Марбург [64].

На основании рассмотренных данных можно предложить следующие количественные показатели для проведения таксономической характеристики новых изолятов филовирусов по результатам полного или частичного (по гену белка L) секвенирования геномной РНК. Результаты представлены в **табл. 5**.

Аренавирусы

Семейство *Arenaviridae* представляет собой большую группу РНК-содержащих вирусов, геномная РНК которых состоит из двух сегментов и обладает амбисенсной стратегией кодирования. Аренавирусы разделяют на аренавирусы Старого и Нового Света. Это разделение основано на серологических и фило-

генетических критериях, а также на географическом положении эндемичных регионов.

В семейство *Arenaviridae* входит один род (*Arenavirus*), который включает 24 вируса [65].

Геном аренавирусов состоит из ss(-)РНК, включающей большой (L) и малый (S) сегменты. L-сегмент (размер приблизительно 7,1 тыс. н.о.) кодирует вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу (L) и цинк-связывающий белок (Z). S-сегмент (размер приблизительно 3,4 тыс. н.о.) кодирует белок нуклеокапсида (N) и предшественника оболочечного гликопротеина, который в ходе онтогенеза расщепляется на гликопротеины G1 и G2 (GPC) [66].

При оценке влияния результатов секвенирования геномной РНК аренавирусов на таксономию представителей этого семейства целесообразно отдельно рассмотреть данные, полученные при секвенировании геномной РНК аренавирусов Старого (вирус Ласса) и Нового Света. Это обусловлено тем, что южноамериканские аренавирусные геморрагические лихорадки, в отличие от лихорадки Ласса, обладают выраженными природными очагами, выход за пределы которых в естественных условиях является маловероятным событием.

Штаммы вируса Ласса по результатам секвенирования геномной РНК первоначально были распределены на 4 генетические линии, в дальнейшем были установлены еще 2 генетические линии, хотя ICTV они официально еще не признаны [67, 68]. Линии 1–3 выделены только в Нигерии, в то время как линия 4 выделена в разных странах Западной Африки. Результаты секвенирования геномной РНК показали высокий уровень генетической изменчивости между линиями 1–4 (до 27% по нуклеотидной последовательности). Необходимо отметить, что различия по нуклеотидному составу гена гликопротеина для разных генетических линий вируса Ласса ниже, чем для гена белка нуклеокапсида.

При сравнении нуклеотидных последовательностей штаммов вируса Ласса установлено, что последовательности штаммов, относящихся к одному и тому же географическому региону, являются очень сходными (уровень идентичности более 99%). При сравнении штаммов вируса Ласса из разных регионов установлена значительная вариабельность, причем для генов белков L и Z более высокая (до 26%), чем для генов белков GPC и N.

Филогенетический анализ аренавирусов Нового Света базируется на секвенировании гена белка нуклеокапсида, по результатам которого проведено разделение вирусов, входящих в данную группу, на три клады (A, B и C). Возбудители особо опасных аренавирусных геморрагических лихорадок (аргентинской, боливийской, бразильской и венесуэльской) – вирусы Хунин, Мачупо, Сэбиа и Гуанарито соответственно, относятся к кладе B. Уровень генетической изменчивости по гену белка нуклеокапсида для разных штаммов одного и того же возбудителя не превышает 5%, в то время как аналогичный показатель при сравнении разных аренавирусов Нового Света, входящих в одну кладу, превышает 40%, а в разные клады – 60% [69].

Рассмотренные данные могут быть использованы для определения количественных показателей при проведении таксономической характеристики новых изолятов аренавирусов Старого (по результатам секвенирования по гену белка L) и Нового Света (по результатам секвенирования по гену белка N). Результаты представлены в **табл. 6**.

Бандавирусы

Геном бандавирусов, как и других представителей семейства *Phenuiviridae*, состоит из 3 сегментов (L, M и S) (-)РНК. L-сегмент генома (≈ 6400 н.о.) содержит одну открытую рамку считывания, кодирующую РНК-зависимую РНК-полимеразу. M-сегмент генома (≈ 3400 н.о.) содержит одну открытую рамку считывания, кодирующую предшественника гликопротеинов (Gn и Gc). S-сегмент, содержащий 1744 н.о., имеет амбисенсную организацию, кодирует белок N в антисмысловой ориентации и вирусный неструктурный белок (Nss) в смысловой ориентации [70, 71].

Влияние результатов секвенирования геномной РНК бандавирусов на таксономию этой группы рассмотрено на примере нового вируса Даби (возбудитель острой лихорадки с тромбоцитопеническим синдромом (SFTS)), относящегося к роду *Bandavirus* семейства *Phenuiviridae*.

Филогенетический анализ, проведенный с помощью определения полноразмерных последовательностей сегментов L, M и S вируса Даби, установил, что данный возбудитель занимает промежуточное положение между двумя другими группами рода *Bandavirus* (группа Сицилийской москитной лихорадки и группа вируса Укуниими), т.е. представляет новую группу рода *Bandavirus* [72–75].

В ходе проведения секвенирования геномной РНК выявлено 6 генотипов возбудителя SFTS (A, B, C, D, E и F). Уровень генетических различий вируса Даби и других бандавирусов в значительной степени различается при сравнении по разным генам. Уровень гомологии вирусов Даби и Укуниими по сегментам L, M и S геномной РНК составляет 34, 24 и 29% соответственно. Наиболее уникальной структурой характеризуется ген белка NSs, для которого уровень гомологии с другими флебовирусами составляет от 11,2 до 16,0% [76]. В то же время уровень гомологии по сегментам L, M и S различных генотипов возбудителя SFTS составлял 95,8–99,8, 94,1–99,9 и 94,8–99,7% соответственно [76, 77].

Для проведения таксономической оценки изолятов вируса SFTS достаточно использовать данные секвенирования гена белка L. Количественные показатели, которые можно использовать при проведении таксономической характеристики вновь выделенных изолятов вируса SFTS, представлены в **табл. 7**.

Таким образом, даже результаты частичного секвенирования геномной НК вносят существенный вклад при проведении таксономической характеристики вновь выявляемых ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Ввиду недостаточности таксономической иден-

Таблица 6. Количественные показатели для проведения таксономической характеристики новых изолятов аренавирусов по результатам секвенирования геномной РНК

Table 6. Quantitative indicators for the taxonomic characterization of new arenavirus isolates based on data of sequencing of genomic RNA

Группа аренавирусов Group of arenaviruses	Область секвенирования Sequencing region	Результаты секвенирования (уровень различий между сравниваемыми аренавирусами), % Sequencing results (the level of differences between the compared arenaviruses), %	Вывод по результатам секвенирования Conclusion based on sequencing results
Старого Света (на примере вируса Ласса) Old World arenaviruses (Lassa virus as example)	Ген белка L L-protein gene	Менее 1 Less than 1	Сравниваемые изоляты относятся к одной и той же генетической линии вируса. Вероятно, что сравниваемые штаммы выделены в одном и том же регионе The compared isolates belong to the same genetic lineage of the virus. It is likely that the compared strains were isolated in the same region
		1–2	Сравниваемые изоляты относятся к одной и той же генетической линии вируса The compared isolates belong to the same genetic lineage of the virus
		2–26	Сравниваемые изоляты относятся к разным генетическим линиям вируса The compared isolates belong to the different genetic lineages of the virus
		Более 26 More than 26	Сравниваемые изоляты представляют разные вирусы The compared isolates represent different viruses
Нового Света (на примере вируса Мачупо) New World arenaviruses (Machupo virus as example)	Ген белка N N-protein gene	Менее 5 Less than 5	Сравниваемые изоляты представляют разные штаммы вируса, относящиеся к одной и той же генетической линии The compared isolates belong to the same genetic lineage of the virus
		5–40	Сравниваемые изоляты представляют разные вирусы, входящие в одну и ту же кладу The compared isolates represent different viruses from the same clade
		Более 40 More than 40	Сравниваемые изоляты представляют разные вирусы, входящие в разные кладу The compared isolates represent different viruses from different clades

Таблица 7. Количественные показатели для проведения таксономической характеристики новых изолятов вируса Даби по результатам секвенирования по гену белка L

Table 7. Quantitative indicators for the taxonomic characterization of new isolates of Daby virus based on data of sequencing of genomic RNA (L protein gene)

Результаты секвенирования (уровень различий между сравниваемыми филовир username), % Sequencing results (the level of differences between the compared isolates), %	Вывод по результатам секвенирования Conclusion based on sequencing results
Менее 0,2 Less than 0.2	Сравниваемые изоляты вирусов относятся к одному и тому же генотипу вируса The compared isolates belong to the same genotype of the virus
0,2–4,2	Сравниваемые изоляты вирусов относятся к разным генотипам вируса The compared isolates belong to the different genotypes of the virus
4,2–31	Сравниваемые изоляты вирусов представляют разные виды, которые предположительно могут относиться одной и той же группе рода <i>Bandavirus</i> The compared virus isolates represent different species, which presumably may belong to the same group within genus <i>Bandavirus</i>
Более 35 More than 35	Сравниваемые изоляты вирусов представляют разные группы рода <i>Bandavirus</i> The compared virus isolates represent different groups within genus <i>Bandavirus</i>

тификации с использованием серологических методов, данные секвенирования геномной НК должны занять приоритетное положение.

ICTV активно использует для классификации данные секвенирования геномов возбудителей. Согласно

установленным требованиям, главным критерием для идентификации вида вируса является идентичность последовательности нуклеотидов свыше 90% [78]. Однако вместе с тем в настоящее время находит широкое применение также метод идентификации вида

вируса с использованием короткого участка генома, определенного гена или нескольких генов. Важно отметить, что не только для каждого класса вирусов, но и для таксонов более низкого уровня при проведении частичного секвенирования с целью таксономической идентификации вновь выделенного изолята возбудителя необходимы обоснованный выбор участка генома для секвенирования и определение количественных критериев, позволяющих провести идентификацию. Разный уровень количественных показателей для ДНК- и РНК-содержащих вирусов определяют различия в скорости эволюции, которая для РНК-содержащих вирусов в среднем на 2 порядка выше (1×10^{-6} и 1×10^{-6} нуклеотидных замен на сайт в год соответственно). С целью таксономической идентификации вновь выделенного изолята вируса с помощью секвенирования необходимо проведение сравнительной оценки с охарактеризованным штаммом возбудителя. При этом высшим таксономическим уровнем, в пределах которого должны находиться анализируемый изолят возбудителя и вариант сравнения, является род вирусов.

ЛИТЕРАТУРА

- Lwoff A., Tournier P. The classification of viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 1966; 20: 45–74. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.20.100166.000401>
- Гинцбург А.Л. Генодиагностика инфекционных заболеваний. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 1998; 75(3): 86–95. EDN: <https://elibrary.ru/mozshn>
- Глик Б., Пастернак Дж. *Молекулярная биотехнология. Принципы и применение.* Пер. с англ. М.: Мир; 2002.
- Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф. Возможности и перспективы применения методов массивного параллельного секвенирования в диагностике и эпидемиологическом надзоре за инфекционными заболеваниями. *Журнал МедиАль.* 2014; (2): 6–28. EDN: <https://elibrary.ru/sgxcgt>
- Eisenstein M. Oxford Nanopore announcement sets sequencing sector abuzz. *Nat. Biotechnol.* 2012; 30(4): 295–6. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt0412-295>
- Кузнецова И.В., Ефременко Д.В., Куличенко А.Н. Применение принципов многофакторного генетического анализа возбудителей инфекционных болезней в работе СПЭБ Роспотребнадзора в период массовых мероприятий. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2018; (2): 68–72. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-2-68-72> EDN: <https://elibrary.ru/xrvfhz>
- Behbehani A.M. The smallpox story: life and death of old disease. *Microbiol. Rev.* 1983; 47(4): 455–505. DOI: <https://doi.org/10.1128/mr.47.4.455-509.1983>
- Онищенко Г.Г., Максимов В.А., Воробьев А.А., Подкуйко В.Н., Мельников С.А. Актуальность возврата к оспопрививанию: проблемы и перспективы. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2006; (7): 32–8. EDN: <https://elibrary.ru/hvtfyn>
- Lofquist J.M., Weimert N.A., Hayney M.S. Smallpox: A review of clinical disease and vaccination. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 2003; 60(8): 749–56. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajhp/60.8.749>
- Booss J., Davis L.E. Smallpox and smallpox vaccination. Neurological implications. *Neurology.* 2003; 60(8): 1241–5. DOI: <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000063319.64515.6b>
- Fenner F. *Smallpox and Its Eradication.* Geneva: WHO; 1988.
- Михеев М.В., Феценко В.М., Щелкунов С.Н. Филогенетический анализ хемокинсвязывающего белка ортопоксвирусов. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2004; (1): 29–36. EDN: <https://elibrary.ru/okkpev>
- Сафронов П.Ф., Рязанкина О.И., Петров Н.А., Тотменин А.В., Колосова И.В., Щелкунов С.Н. Структурно-функциональная организация генома вируса оспы коров, штамм GRI-90. Сообщение 2. Сравнительный анализ структуры левого видоспецифического района генома ортопоксвирусов. *Молекулярная биология.* 1999; 33(2): 291–302.
- Маренникова С.С., Щелкунов С.Н. *Патогенные для человека ортопоксвирусы.* М.; 1998.
- Сафронов П.Ф., Тотменин А.В., Рязанкина О.И., Щелкунов С.Н. Структурно-функциональная организация генома вируса оспы коров, штамм GRI-90. Сообщение 3. Функциональная характеристика левого видоспецифического района генома ортопоксвирусов. *Молекулярная биология.* 1999; 33(2): 303–13.
- Emerson G.L., Li Y., Frace M.A., Olsen-Rasmussen M.A., Khristova M.L., Govil D., et al. The phylogenetics and ecology of the orthopoxviruses endemic to North America. *PLoS One.* 2009; 4(10): e7666. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007666>
- Mauldin M.R., Antwerpen M., Emerson G.L., Li Y., Zoeller G., Carroll D.S., et al. Cowpox virus: what's in a name? *Viruses.* 2017; 9(5): 101. DOI: <https://doi.org/10.3390/v9050101>
- Springer Y.P., Hsu C.H., Werle Z.R., Olson L.E., Cooper M.P., Castrodale L.J., et al. Novel orthopoxvirus infection in an Alaska resident. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 64(12): 1737–41. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cix219>
- Vora N.M., Li Y., Geleishvili M., Emerson G.L., Khmaladze E., Maghlakelidze G., et al. Human infection with a zoonotic orthopoxvirus in the country of Georgia. *N. Engl. J. Med.* 2015; 372(13): 1223–30. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407647>
- Cardeti G., Gruber C.E.M., Eleni C., Carletti F., Castilletti C., Manna G., et al. Fatal outbreak in Tonkean macaques caused by possibly novel orthopoxvirus, Italy, January 2015. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23(12): 1941–9. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2312.162098>
- Gao J., Gigante C., Khmaladze E., Liu P., Tang S., Wilkins K., et al. Genome sequences of Akhmeta virus, an early divergent old world orthopoxvirus. *Viruses.* 2018; 10(5): 252. DOI: <https://doi.org/10.3390/v10050252>
- Lanave G., Dowgier G., Decaro N., Albanese F., Brogi E., Parisi A., et al. Novel orthopoxvirus and lethal disease in Cat, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(9): 1665–73. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2409.171283>
- Волчков В.Е., Волчкова В.А., Нетесов С.В. Полная нуклеотидная последовательность генома вируса ВСЭЛ. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 1991; (5): 8–15.
- Agular P., Adams A.P., Suarez V., Beingolea L., Vargas J., Manock S., et al. Genetic characterization of VEE virus from Bolivia, Ecuador and Peru: identification of a new subtype ID lineage. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009; 3(9): e514. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000514>
- Chang G.J., Trent D.W. Nucleotide sequence of the genomic region encoding the 26S mRNA of EEE virus and the deduced amino acid sequence of the viral structural proteins. *J. Gen. Virol.* 1987; 62(Pt. 8): 2129–42. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-8-2129>
- Weaver S.C., Pfeffer M., Marriott K., Kang W., Kinney R.M. Genetic evidence for the origins of Venezuelan equine encephalitis virus subtype IAB outbreaks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 60(3): 441–8. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.441>
- Arrigo N.C., Adams A.P., Weaver S.C. Evolutionary patterns of eastern equine encephalitis virus in North versus South America suggest ecological differences and taxonomic revision. *J. Virol.* 2010; 84(2): 1014–25. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01586-09>
- Forrester N.L., Weitheim J.O., Dugan V.G., Auguste A.J., Lin D., Adams A.P., et al. Evolution and spread of VEE complex alphavirus in the Americas. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(8): e0005693. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005693>
- Weaver S.C., Winegar R., Manger I.D., Forrester N.L. Alphaviruses: Population genetics and determinants emergence. *Antiviral Res.* 2012; 94(3): 242–57. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.04.002>
- Powers A.M., Huang H.V., Roehrig J.T., Strauss E.G., Weaver S.C. Togaviridae. In: King A.M.G., Adams M.J., Carstens E.B., Lefcovitz E.J., eds. *Virus Taxonomy, Ninth Report of International Committee on taxonomy of Viruses.* Oxford: Elsevier; 2011: 1103–10.
- Kinney R.M., Pfeffer M., Tsuchiya K.R., Chang G.J., Roehrig J.T. Nucleotide sequences of 26S mRNAs of the viruses, defining the VEE antigenic complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998; 59(6): 952–64. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.952>
- Quiroz E., Aguilar P.V., Cisneros J., Tesh R.B., Weaver S.C. Venezuelan equine encephalitis in Panama: fatal endemic disease and genetic diversity of etiologic viral strains. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009; 3(6): e472. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000472>

33. Brault A.C., Powers A.M., Weaver S.C. Vector infection determinants of Venezuelan equine encephalitis virus reside within the E2 envelope glycoprotein. *J. Virol.* 2002; 76(12): 6387–92. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.76.12.6387-6392.2002>
34. Brault A.C., Powers A.M., Holmes E.C., Woelk C.H., Weaver S.C. Positively-charged amino acid substitutions in the E2 envelope glycoprotein are associated with the emergence of VEE virus. *J. Virol.* 2005; 79(14): 9128–33. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.14.9128-9133.2005>
35. Greene I.P., Paessler S., Austgen L., Anischenko M., Brault A.C., Bowen R.A., et al. Envelope glycoprotein mutations mediate equine amplification and virulence of epizootic VEE virus. *J. Virol.* 2005; 79(14): 9128–33. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.14.9128-9133.2005>
36. Anischenko M., Bowen R.A., Paessler S., Austgen L., Greene I.P., Weaver S.C. Venezuelan encephalitis emergence mediated by a phylogenetically predicted virus mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103(13): 4994–9. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0509961103>
37. Agular P.V., Estrada-Franco J.C., Navarro-Lopes R., Ferro C., Haddow A.D., Weaver S.C. Endemic VEE in the Americas: Hidden under dengue umbrella. *Future Virol.* 2011; 6(6): 721–40. DOI: <https://doi.org/10.2217/FVL.11.5>
38. Sharma A., Knollmann-Ritchel B. Current understanding of molecular basis of VEE virus pathogenesis and vaccine development. *Viruses.* 2019; 11(2): 164. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11020164>
39. Lednicky J.A., White S.K., Mavian C.N., Badry M.A., Telisma T., Salemi M., et al. Emergence of Madariaga virus as cause of acute febrile illness of children, Haiti 2015. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2019; 13(1): e006972. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006972>
40. Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(5): 1792–7. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
41. Barrows N.J., Campos R.K., Liao K., Prasanth K.R., Soto-Acosta R., Yeh S., et al. Biochemistry and molecular biology of flaviviruses. *Chem. Rev.* 2018; 118(8): 4448–82. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00719>
42. Pierson T.C., Diamond M.S. Flaviviruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Field virology*. Philadelphia; 2013: 714–94.
43. Karabatsos N. *International Catalogue of Arboviruses: Including Certain other Viruses of Vertebrates*. San Antonio: Published for the Subcommittee on Information Exchange of the American Committee on Arthropod-borne Viruses by the American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 1985.
44. Kuno G., Chang G.J., Tsuchiya K.R., Karabatsos N., Cropp C.B. Phylogeny of the genus Flavivirus. *J. Virol.* 1998; 72(1): 73–83. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.72.1.73-83.1998>
45. de Souza Lopes O., de Abreu Sacchetta L., Coimbra T.L., Pinto G.H., Glasser C.M. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. II. Epidemiologic studies on 1975 epidemic. *Am. J. Epidemiol.* 1978; 108(5): 394–401. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxford-journals.aje.a112637>
46. Saivish M.V., da Costa V.G., da Silva R.A., Dutra da Silva G.C., Menezes G., Moreli M.L. Rocio Virus: An updated view on an elusive flavivirus. *Viruses.* 2021; 13(11): 2293. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13112293>
47. Mitchell C.J., Monath T.P., Cropp C.B. Experimental transmission of Rocio virus by mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1981; 30(2): 465–72. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1981.30.465>
48. Tiriba A.C., Miziara A.M., Lorenço R., da Costa R.B., Costa C.S., Pinto G.H. Primary human epidemic encephalitis induced by Arbovirus found at the sea shore south of the State of São Paulo. Clinical study in an emergency hospital. *AMB Rev. Assoc. Med. Bras.* 1976; 22(11): 415–20. (in Portuguese)
49. Medeiros D.B., Nunes M.R., Vasconcelos P.F., Chang G.J., Kuno G. Complete genome characterization of Rocio virus (Flavivirus: Flaviviridae), a Brazilian flavivirus isolated from a fatal case of encephalitis during an epidemic in Sao Paulo state. *J. Gen. Virol.* 2007; 88(8): 2237–46. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.82883-0>
50. Faye O., Freire C.C., Imarino A., Faye O., Oliveira J.V.C., Diallo M., et al. Molecular evolution of Zika virus during its emerging in the 20th century. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(1): e2636. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002636>
51. Kiley M.P., Bowen E.T., Eddy G.A., Isaacson M., Johnson K.M., McCormick J.B., et al. Filoviridae: A taxonomic home for Marburg and Ebola viruses? *Intervirology.* 1982; 18(1-2): 24–32. DOI: <https://doi.org/10.1159/000149300>
52. Kuhn J.H., Becker S., Ebihara H., Geisbert T.W., Johnson K.M., Kawaoka Y., et al. Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations. *Arch. Virol.* 2010; 155(12): 2083–103. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0814-x>
53. Biedenkopf N., Bukreyev A., Chandran K., Di Paola N., Formenty P.B.H., Griffiths A., et al. Renaming of genera Ebolavirus and Marburgvirus to Orthoebolavirus and Orthomarburgvirus, respectively, and introduction of binomial species names within family Filoviridae. *Arch. Virol.* 2023; 168(8): 220. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05834-2>
54. Kuhn J.H., Adachi T., Adhikari N.K.J., Arribas J.R., Bah I.E., Bausch D.G., et al. New filovirus disease classification and nomenclature. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019; 17(5): 261–3. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0187-4>
55. Le Guenno B., Formenty P., Wyers M., Gounon P., Walker F., Boesch C. Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus. *Lancet.* 1995; 345(8960): 1271–4. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(95\)90925-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(95)90925-7)
56. Towner J.S., Sealy T.K., Khristova M.L., Albarino C.G., Conlan S., Reeder S.A., et al. Newly discovered Ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda. *PLoS Pathog.* 2008; 4(11): e1000212. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000212>
57. Miranda M.E.G., Miranda N.L.J. Reston ebolavirus in humans and animals in the Philippines: A review. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(3): 757–60. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jir296>
58. Goldstein T., Anthony S.J., Gbakima A., Bird B.H., Bangura J., Tremeau-Bravard A. The discovery of Bombali virus adds further support for bats as hosts of ebolaviruses. *Nat. Microbiol.* 2018; 3(10): 1084–9. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0227-2>
59. de La Vega M.A., Stein D., Kobinger G.P. Ebolavirus evolution: past and present. *PLoS Pathog.* 2015; 11(11): e1005221. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005221>
60. Towner J.S., Khristova M.L., Sealy T.K., Vincent M.J., Erickson B.R., Bawies D.A., et al. Marburg virus genomics and association with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola. *J. Virol.* 2006; 80(13): 6497–516. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00069-06>
61. Carroll S.A., Towner J.S., Sealy T.K., McMullan L.K., Khristova M.L., Burt F.J., et al. Molecular evolution of viruses of the family Filoviridae based on 97 whole-genome sequences. *J. Virol.* 2013; 87(5): 2608–16. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.03118-12>
62. He B., Feng Y., Zhang H., Xu L., Yang W., Zhang Y., et al. Filovirus RNA in fruit bats, China. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(9): 1675–7. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2109.150260>
63. Negrodo A., Palacios G., Vazquez-Moron S., Gonzales F., Dopazo H., Molero F., et al. Discovery of an Ebola-like filovirus in Europe. *PLoS Pathog.* 2011; 7(10): e1002304. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002304>
64. Di Paola N., Sanchez-Lockhart M., Zeng X., Kuhn J.H., Palacios G. Viral genomics in Ebola virus research. *Nat. Rev. Microbiol.* 2020; 18(7): 365–78. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0354-7>
65. Southern P.J. Arenaviridae: The viruses and their replication. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. *Field's Virology. Volume 1*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996: 1505–19.
66. Hallam S.J., Koma T., Maruyama J., Paessler S. Review of Mammarenavirus Biology and Replication. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 1751. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01751>
67. Munning J.T., Forester N., Paesler S.J.T. Lassa virus isolates from Mali and Ivory Coast represent an emerging fifth lineage. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 1037. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01037>
68. Whitmer S.L.M., Strecker T., Cadar D., Dienes H.P., Faber K., Patel K., et al. New lineage of Lassa virus Togo 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(3): 596–602. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2403.171905>
69. Charrel R.N., Feldmann H., Fulhorst C.F., Khelifa R., de Chesse R., de Lamballerie X. Phylogeny of New World arenaviruses based on the complete coding sequences of the small genomic segment identified an evolutionary lineage produced by intrasegmental recombination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 296(5): 1118–24. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)02053-3](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(02)02053-3)
70. Li A., Liu L., Wu W., Liu Y., Huang X., Li C., et al. Molecular evolution and genetic diversity analysis of SFTS virus based on next-generation sequencing. *Biosaf. Health.* 2021; 3(02): 105–15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bshealth.2021.02.002>

71. Ning Y.J., Feng K., Min Y.Q., Cao W.C., Wang M., Deng F., et al. Disruption of type I interferon signaling by the nonstructural protein of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus via the hijacking of STAT2 and STAT1 into inclusion bodies. *J. Virol.* 2015; 89(8): 4227–36. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00154-15>
72. Qu B., Qi X., Wu X., Liang M., Li C., Cardona C.J., et al. Suppression of the interferon and NF- κ B responses by severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *J. Virol.* 2012; 86(16): 8388–401. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00612-12>
73. Huang X., Liu L., Du Y., Wu W., Wang H., Su J., et al. The evolutionary history and spatiotemporal dynamics of the fever, thrombocytopenia and leukocytopenia syndrome virus (FTLSV) in China. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(10): e3237. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003237>
74. Lam T.T., Liu W., Bowden T.A., Cui N., Zhuang L., Liu K., et al. Evolutionary and molecular analysis of the emergent severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *Epidemics.* 2013; 5(1): 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2012.09.002>
75. Zhang Y.Z., Zhou D.J., Qin X.C., Tian J.H., Xiong Y., Wang J.B., et al. The ecology, genetic diversity, and phylogeny of Huaiyangshan virus in China. *J. Virol.* 2012; 86(5): 2864–8. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.06192-11>
76. Xu B., Liu L., Huang X., Ma H., Zhang Y., Du Y., et al. Metagenomic analysis of fever, thrombocytopenia and leucopenia syndrome (FTLS) in Henan province, China: Discovery of a new Bunyavirus. *PLoS Patog.* 2011; 7(11): e1002369. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002369>
77. Liu L., Chen W., Yang Y., Jiang Y. Molecular evolution of fever, thrombocytopenia and leukocytopenia virus (FTLSV) based on whole-genome sequences. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 39: 55–63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.12.022>
78. Lefkowitz E.J., Dempsey D.M., Hendrickson R.C., Orton R.J., Siddell S.G., Smith D.B. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(D1): D708–17. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>
12. Mikheev M.V., Feshchenko V.M., Shchelkunov S.N. Phylogenetic analysis of a chemokine-binding protein gene of orthopoxviruses. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2004; (1): 29–36. EDN: <https://elibrary.ru/okkpev> (in Russian)
13. Safronov P.F., Ryazankina O.I., Petrov N.A., Totmenin A.V., Kolosova I.V., Shchelkunov S.N. Structural and functional organization of the genome of the cowpox virus, strain GRI-90. Report 2. Comparative analysis of the structure of the left species-specific region of the orthopoxvirus genome. *Molekulyarnaya biologiya.* 1999; 33(2): 291–302. (in Russian)
14. Marennikova S.S., Shchelkunov S.N. *Orthopoxviruses Pathogenic to Humans [Patogennyye dlya cheloveka ortopoksvirusy]*. Moscow; 1998. (in Russian)
15. Safronov P.F., Totmenin A.V., Ryazankina O.I., Shchelkunov S.N. Structural and functional organization of the genome of the cowpox virus, strain GRI-90. Report 3. Functional characteristics of the left species-specific region of the orthopoxvirus genome. *Molekulyarnaya biologiya.* 1999; 33(2): 303–13. (in Russian)
16. Emerson G.L., Li Y., Frace M.A., Olsen-Rasmussen M.A., Khristova M.L., Govil D., et al. The phylogenetics and ecology of the orthopoxviruses endemic to North America. *PLoS One.* 2009; 4(10): e7666. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007666>
17. Mauldin M.R., Antwerpen M., Emerson G.L., Li Y., Zoeller G., Carroll D.S., et al. Cowpox virus: what's in a name? *Viruses.* 2017; 9(5): 101. DOI: <https://doi.org/10.3390/v9050101>
18. Springer Y.P., Hsu C.H., Werle Z.R., Olson L.E., Cooper M.P., Castrodale L.J., et al. Novel orthopoxvirus infection in an Alaska resident. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 64(12): 1737–41. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cix219>
19. Vora N.M., Li Y., Geleishvili M., Emerson G.L., Khmaladze E., Maghlakelidze G., et al. Human infection with a zoonotic orthopoxvirus in the country of Georgia. *N. Engl. J. Med.* 2015; 372(13): 1223–30. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1407647>
20. Cardeti G., Gruber C.E.M., Eleni C., Carletti F., Castilletti C., Manca G., et al. Fatal outbreak in Tonkean macaques caused by possibly novel orthopoxvirus, Italy, January 2015. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23(12): 1941–9. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2312.162098>
21. Gao J., Gigante C., Khmaladze E., Liu P., Tang S., Wilkins K., et al. Genome sequences of Akhmeta virus, an early divergent old world orthopoxvirus. *Viruses.* 2018; 10(5): 252. DOI: <https://doi.org/10.3390/v10050252>
22. Lanave G., Dowgier G., Decaro N., Albanese F., Brogi E., Parisi A., et al. Novel orthopoxvirus and lethal disease in Cat, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(9): 1665–73. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2409.171283>
23. Volchkov V.E., Volchkova V.A., Netesov S.V. Complete nucleotide sequence of the Eastern equine encephalomyelitis virus genome. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 1991; (5): 8–15. (in Russian)
24. Aguilar P., Adams A.P., Suarez V., Beingolea L., Vargas J., Manock S., et al. Genetic characterization of VEE virus from Bolivia, Ecuador and Peru: identification of a new subtype ID lineage. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009; 3(9): e514. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000514>
25. Chang G.J., Trent D.W. Nucleotide sequence of the genomic region encoding the 26S mRNA of EEE virus and the deduced amino acid sequence of the viral structural proteins. *J. Gen. Virol.* 1987; 62(Pt. 8): 2129–42. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-8-2129>
26. Weaver S.C., Pfeffer M., Marriott K., Kang W., Kinney R.M. Genetic evidence for the origins of Venezuelan equine encephalitis virus subtype IAB outbreaks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1999; 60(3): 441–8. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.441>
27. Arrigo N.C., Adams A.P., Weaver S.C. Evolutionary patterns of eastern equine encephalitis virus in North versus South America suggest ecological differences and taxonomic revision. *J. Virol.* 2010; 84(2): 1014–25. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01586-09>
28. Forrester N.L., Weithelm J.O., Dugan V.G., Auguste A.J., Lin D., Adams A.P., et al. Evolution and spread of VEE complex alphaviruses in the Americas. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(8): e0005693. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005693>
29. Weaver S.C., Winegar R., Manger I.D., Forrester N.L. Alphaviruses: Population genetics and determinants emergence. *Antiviral Res.* 2012; 94(3): 242–57. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.04.002>

REFERENCES

1. Lwoff A., Tournier P. The classification of viruses. *Annu. Rev. Microbiol.* 1966; 20: 45–74. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.20.100166.000401>
2. Gintsburg A.L. Genodiagnosis of infectious diseases. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii.* 1998; 75(3): 86–95. EDN: <https://elibrary.ru/mozshn> (in Russian)
3. Glick B.R., Pasternak J.J. *Molecular Biotechnology. Principles and Applications of Recombinant DNA*. Washington: American Society for Microbiology; 1994.
4. Alekseeva A.E., Brusnigina N.F. Possibility and perspectives of massive parallel sequencing methods application in the diagnostics and epidemiological surveillance of infectious diseases. *Zhurnal Medits. Biol.* 2014; (2): 6–28. EDN: <https://elibrary.ru/sgxegt> (in Russian)
5. Eisenstein M. Oxford Nanopore announcement sets sequencing sector abuzz. *Nat. Biotechnol.* 2012; 30(4): 295–6. DOI: <https://doi.org/10.1038/nbt0412-295>
6. Kuznetsova I.V., Efremenko D.V., Kulichenko A.N. Applying principles of multi-factor genetic analysis of infectious disease agents in the work of the Rospotrebnadzor SAET during mass events. *Problemy osobo opasnykh infektsii.* 2018; (2): 68–72. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-2-68-72> EDN: <https://elibrary.ru/xrvhfz> (in Russian)
7. Behbehani A.M. The smallpox story: life and death of old disease. *Microbiol. Rev.* 1983; 47(4): 455–505. DOI: <https://doi.org/10.1128/mr.47.4.455-509.1983>
8. Onishchenko G.G., Maksimov V.A., Vorob'ev A.A., Podkuiko V.N., Mel'nikov S.A. The topicality of return to smallpox vaccination: problems and prospects. *Vestnik Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk.* 2006; (7): 32–8. EDN: <https://elibrary.ru/htvfyn> (in Russian)
9. Lofquist J.M., Weimert N.A., Hayney M.S. Smallpox: A review of clinical disease and vaccination. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 2003; 60(8): 749–56. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajhp/60.8.749>
10. Booss J., Davis L.E. Smallpox and smallpox vaccination. Neurological implications. *Neurology.* 2003; 60(8): 1241–5. DOI: <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000063319.64515.6b>
11. Fenner F. *Smallpox and Its Eradication*. Geneva: WHO; 1988.

30. Powers A.M., Huang H.V., Roehrig J.T., Strauss E.G., Weaver S.C. Togaviridae. In: King A.M.G., Adams M.J., Carstens E.B., Lefcowitz E.J., eds. *Virus Taxonomy, Ninth Report of International Committee on taxonomy of Viruses*. Oxford: Elsevier; 2011: 1103–10.
31. Kinney R.M., Pfeffer M., Tsuchiya K.R., Chang G.J., Roehrig J.T. Nucleotide sequences of 26S mRNAs of the viruses, defining the VEE antigenic complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1998; 59(6): 952–64. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.952>
32. Quiroz E., Aguilar P.V., Cisneros J., Tesh R.B., Weaver S.C. Venezuelan equine encephalitis in Panama: fatal endemic disease and genetic diversity of etiologic viral strains. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2009; 3(6): e472. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000472>
33. Brault A.C., Powers A.M., Weaver S.C. Vector infection determinants of Venezuelan equine encephalitis virus reside within the E2 envelope glycoprotein. *J. Virol.* 2002; 76(12): 6387–92. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.76.12.6387-6392.2002>
34. Brault A.C., Powers A.M., Holmes E.C., Woelk C.H., Weaver S.C. Positively-charged amino acid substitutions in the E2 envelope glycoprotein are associated with the emergence of VEE virus. *J. Virol.* 2002; 76(4): 1718–30. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.76.4.1718-1730.2002>
35. Greene I.P., Paessler S., Austgen L., Anischenko M., Brault A.C., Bowen R.A., et al. Envelope glycoprotein mutations mediate equine amplification and virulence of epizootic VEE virus. *J. Virol.* 2005; 79(14): 9128–33. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.14.9128-9133.2005>
36. Anischenko M., Bowen R.A., Paessler S., Austgen L., Greene I.P., Weaver S.C. Venezuelan encephalitis emergence mediated by a phylogenetically predicted virus mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006; 103(13): 4994–9. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0509961103>
37. Aguilar P.V., Estrada-Franco J.C., Navarro-Lopes R., Ferro C., Had-dow A.D., Weaver S.C. Endemic VEE in the Americas: Hidden under dengue umbrella. *Future Virol.* 2011; 6(6): 721–40. DOI: <https://doi.org/10.2217/FVL.11.5>
38. Sharma A., Knollmann-Ritchel B. Current understanding of molecular basis of VEE virus pathogenesis and vaccine development. *Viruses.* 2019; 11(2): 164. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11020164>
39. Lednicky J.A., White S.K., Mavian C.N., Badry M.A., Telisma T., Salemi M., et al. Emergence of Madariaga virus as cause of acute febrile illness of children, Haiti 2015. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2019; 13(1): e006972. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006972>
40. Edgar R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32(5): 1792–7. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
41. Barrows N.J., Campos R.K., Liao K., Prasanth K.R., Soto-Acosta R., Yeh S., et al. Biochemistry and molecular biology of flaviviruses. *Chem. Rev.* 2018; 118(8): 4448–82. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00719>
42. Pierson T.C., Diamond M.S. Flaviviruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Field virology*. Philadelphia; 2013: 714–94.
43. Karabatsos N. *International Catalogue of Arboviruses: Including Certain other Viruses of Vertebrates*. San Antonio: Published for the Subcommittee on Information Exchange of the American Committee on Arthropod-borne Viruses by the American Society of Tropical Medicine and Hygiene; 1985.
44. Kuno G., Chang G.J., Tsuchiya K.R., Karabatsos N., Cropp C.B. Phylogeny of the genus Flavivirus. *J. Virol.* 1998; 72(1): 73–83. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.72.1.73-83.1998>
45. de Souza Lopes O., de Abreu Sacchetta L., Coimbra T.L., Pinto G.H., Glasser C.M. Emergence of a new arbovirus disease in Brazil. II. Epidemiologic studies on 1975 epidemic. *Am. J. Epidemiol.* 1978; 108(5): 394–401. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxford-journals.aje.a112637>
46. Saivish M.V., da Costa V.G., da Silva R.A., Dutra da Silva G.C., Menezes G., Moreli M.L. Rocio Virus: An updated view on an elusive flavivirus. *Viruses.* 2021; 13(11): 2293. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13112293>
47. Mitchell C.J., Monath T.P., Cropp C.B. Experimental transmission of Rocio virus by mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1981; 30(2): 465–72. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1981.30.465>
48. Tiriba A.C., Miziara A.M., Lorenço R., da Costa R.B., Costa C.S., Pinto G.H. Primary human epidemic encephalitis induced by Arbovirus found at the sea shore south of the State of São Paulo. Clinical study in an emergency hospital. *AMB Rev. Assoc. Med. Bras.* 1976; 22(11): 415–20. (in Portuguese)
49. Medeiros D.B., Nunes M.R., Vasconcelos P.F., Chang G.J., Kuno G. Complete genome characterization of Rocio virus (Flavivirus: Flaviviridae), a Brazilian flavivirus isolated from a fatal case of encephalitis during an epidemic in Sao Paulo state. *J. Gen. Virol.* 2007; 88(8): 2237–46. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.82883-0>
50. Faye O., Freire C.C., Imarino A., Faye O., Oliveira J.V.C., Diallo M., et al. Molecular evolution of Zika virus during its emerging in the 20th century. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(1): e2636. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002636>
51. Kiley M.P., Bowen E.T., Eddy G.A., Isaacson M., Johnson K.M., McCormick J.B., et al. Filoviridae: A taxonomic home for Marburg and Ebola viruses? *Intervirology.* 1982; 18(1-2): 24–32. DOI: <https://doi.org/10.1159/000149300>
52. Kuhn J.H., Becker S., Ebihara H., Geisbert T.W., Johnson K.M., Kawaoka Y., et al. Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations. *Arch. Virol.* 2010; 155(12): 2083–103. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0814-x>
53. Biedenkopf N., Bukreyev A., Chandran K., Di Paola N., Formenty P.B.H., Griffiths A., et al. Renaming of genera Ebolavirus and Marburgvirus to Orthobolavirus and Orthomarburgvirus, respectively, and introduction of binomial species names within family Filoviridae. *Arch. Virol.* 2023; 168(8): 220. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05834-2>
54. Kuhn J.H., Adachi T., Adhikari N.K.J., Arribas J.R., Bah I.E., Bausch D.G., et al. New filovirus disease classification and nomenclature. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019; 17(5): 261–3. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0187-4>
55. Le Guenno B., Formenty P., Wyers M., Gounon P., Walker F., Boesch C. Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus. *Lancet.* 1995; 345(8960): 1271–4. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(95\)90925-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(95)90925-7)
56. Towner J.S., Sealy T.K., Khristova M.L., Albarino C.G., Conlan S., Reeder S.A., et al. Newly discovered Ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda. *PLoS Pathog.* 2008; 4(11): e1000212. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000212>
57. Miranda M.E.G., Miranda N.L.J. Reston ebolavirus in humans and animals in the Philippines: A review. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(3): 757–60. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jir296>
58. Goldstein T., Anthony S.J., Gbakima A., Bird B.H., Bangura J., Tremereau-Bravard A. The discovery of Bombali virus adds further support for bats as hosts of ebolaviruses. *Nat. Microbiol.* 2018; 3(10): 1084–9. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0227-2>
59. de La Vega M.A., Stein D., Kobinger G.P. Ebolavirus evolution: past and present. *PLoS Pathog.* 2015; 11(11): e1005221. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005221>
60. Towner J.S., Khristova M.L., Sealy T.K., Vincent M.J., Erickson B.R., Bawies D.A., et al. Marburg virus genomics and association with a large hemorrhagic fever outbreak in Angola. *J. Virol.* 2006; 80(13): 6497–516. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00069-06>
61. Carroll S.A., Towner J.S., Sealy T.K., McMullan L.K., Khristova M.L., Burt F.J., et al. Molecular evolution of viruses of the family Filoviridae based on 97 whole-genome sequences. *J. Virol.* 2013; 87(5): 2608–16. DOI: <https://doi.org/10.1128/jvi.03118-12>
62. He B., Feng Y., Zhang H., Xu L., Yang W., Zhang Y., et al. Filovirus RNA in fruit bats, China. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(9): 1675–7. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2109.150260>
63. Negrodo A., Palacios G., Vazquez-Moron S., Gonzales F., Dopazo H., Molero F., et al. Discovery of an Ebola-like filovirus in Europe. *PLoS Pathog.* 2011; 7(10): e1002304. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002304>
64. Di Paola N., Sanchez-Lockhart M., Zeng X., Kuhn J.H., Palacios G. Viral genomics in Ebola virus research. *Nat. Rev. Microbiol.* 2020; 18(7): 365–78. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0354-7>
65. Southern P.J. Arenaviridae: The viruses and their replication. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. *Field's Virology. Volume 1*. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996: 1505–19.
66. Hallam S.J., Koma T., Maruyama J., Paessler S. Review of Mammarenavirus Biology and Replication. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 1751. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01751>
67. Munning J.T., Forester N., Paessler S.J.T. Lassa virus isolates from Mali and Ivory Coast represent an emerging fifth lineage. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 1037. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01037>

68. Whitmer S.L.M., Strecker T., Cadar D., Dienes H.P., Faber K., Patel K., et al. New lineage of Lassa virus Togo 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(3): 596–602. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2403.171905>
69. Charrel R.N., Feldmann H., Fulhorst C.F., Khelifa R., de Chesse R., de Lamballerie X. Phylogeny of New World arenaviruses based on the complete coding sequences of the small genomic segment identified an evolutionary lineage produced by intrasegmental recombination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 296(5): 1118–24. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02053-3](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02053-3)
70. Li A., Liu L., Wu W., Liu Y., Huang X., Li C., et al. Molecular evolution and genetic diversity analysis of SFTS virus based on next-generation sequencing. *Biosaf. Health.* 2021; 3(02): 105–15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bshealth.2021.02.002>
71. Ning Y.J., Feng K., Min Y.Q., Cao W.C., Wang M., Deng F., et al. Disruption of type I interferon signaling by the nonstructural protein of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus via the hijacking of STAT2 and STAT1 into inclusion bodies. *J. Virol.* 2015; 89(8): 4227–36. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00154-15>
72. Qu B., Qi X., Wu X., Liang M., Li C., Cardona C.J., et al. Suppression of the interferon and NF- κ B responses by severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *J. Virol.* 2012; 86(16): 8388–401. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00612-12>
73. Huang X., Liu L., Du Y., Wu W., Wang H., Su J., et al. The evolutionary history and spatiotemporal dynamics of the fever, thrombocytopenia and leukocytopenia syndrome virus (FTLSV) in China. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(10): e3237. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003237>
74. Lam T.T., Liu W., Bowden T.A., Cui N., Zhuang L., Liu K., et al. Evolutionary and molecular analysis of the emergent severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *Epidemics.* 2013; 5(1): 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2012.09.002>
75. Zhang Y.Z., Zhou D.J., Qin X.C., Tian J.H., Xiong Y., Wang J.B., et al. The ecology, genetic diversity, and phylogeny of Huaiyangshan virus in China. *J. Virol.* 2012; 86(5): 2864–8. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.06192-11>
76. Xu B., Liu L., Huang X., Ma H., Zhang Y., Du Y., et al. Metagenomic analysis of fever, thrombocytopenia and leucopenia syndrome (FTLS) in Henan province, China: Discovery of a new Bunyavirus. *PLoS Patog.* 2011; 7(11): e1002369. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002369>
77. Liu L., Chen W., Yang Y., Jiang Y. Molecular evolution of fever, thrombocytopenia and leukocytopenia virus (FTLSV) based on whole-genome sequences. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 39: 55–63. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.12.022>
78. Lefkowitz E.J., Dempsey D.M., Hendrickson R.C., Orton R.J., Siddell S.G., Smith D.B. Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(D1): D708–17. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>

Информация об авторах:

Сизикова Татьяна Евгеньевна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, Сергиев Посад, Россия. <https://orcid.org/0000-0002-1817-0126>

Лебедев Виталий Николаевич – д-р биол. наук, профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, Сергиев Посад, Россия. <https://orcid.org/0000-0002-6552-4599>

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

Участие авторов: Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. – разработка концепции, анализ литературы, написание статьи, окончательное одобрение статьи.

Поступила 06.05.2024
Принята в печать 25.06.2024
Опубликована 30.06.2024

Information about the authors:

Tatiana E. Sizikova – Ph. D. in Biology, 48th Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Sergiev Posad, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-1817-0126>

Vitaliy N. Lebedev – D. Sc. in Biology, Professor, Leading Researcher at the 48th Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Sergiev Posad, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-6552-4599>

Sergey V. Borisevich  – D. Sc. in Biology, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Head of the Institute, 48th Central Scientific Research Institute of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Sergiev Posad, Russia. E-mail: 48cnii@mil.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

Contribution: Sizikova T.E., Lebedev V.N., Borisevich S.V. – concept development, literature analysis, article writing, final approval of the article.

Received 06 May 2024
Accepted 25 June 2024
Published 30 June 2024

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-222>

© МЫРЗАХМЕТОВА Б.Ш., ЖАППАРОВА Г.А., БИСЕНБАЕВА К.Б., ТОЙТАНОВА С.А., ТУЫСКАНОВА М.С., ЖУГУНИСОВ К.Д., КУТУМБЕТОВ Л.Б., 2024

Иммунная реактивность двух биологических моделей на прививку инактивированной вакциной QazVac против коронавирусной инфекции COVID-19

Мырзахметова Б.Ш.✉, Жаппарова Г.А., Бисенбаева К.Б., Тойтанова С.А., Туысканова М.С., Жугунисов К.Д., Кутумбетов Л.Б.

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» МЗ РК, 080409, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан

Резюме

Введение. Специфическая профилактика ряда инфекционных болезней введена в календарь медицинских прививок. Производство иммунопрофилактических препаратов в целях установления стандартных свойств, в том числе по безопасности и специфической эффективности, требует строгого соблюдения регламента изготовления, а достоверность полученных результатов – проведения контроля указанных параметров. Специфическую эффективность вакцинных препаратов стандартизируют по показателям стимуляции гуморальных факторов иммунитета, формируемых в организме привитых модельных биологических объектов.

Цель работы. Определение иммунной реактивности белых мышей на прививку вакциной QazVac для установления возможности их использования в качестве биологической модели в оценке иммуногенности вакцины вместо сирийских хомяков.

Материалы и методы. Оценку иммунной реактивности модельных животных проводили по количеству сероконверсивности, скорости и динамике титров антител на вирус SARS-CoV-2, формируемых в организме после прививки испытуемой вакциной.

Результаты. Результаты исследований показали, что испытуемые биологические модели обладают примерно одинаковой иммунной реактивностью на введение вакцины QazVac, подтверждающим свидетельством которой являлись уровень и динамика титров антител. При анализе кратности увеличения титров антител в сравнении с таковыми контрольных животных, сирийские хомяки обладают сравнительно большей реактивностью. Но белые мыши, свободные от патогенной микрофлоры (СПФ), стандартны по интактности от антител на вирус SARS-CoV-2.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что иммунная реактивность белых мышей на введение вакцины QazVac по скорости и динамике формирования вируснейтрализующих антител является практически равнозначной иммунной реактивности сирийских хомяков. В организме белых мышей категории СПФ до прививки вакциной, в отличие от сирийских хомяков, не содержатся факторы гуморального иммунитета, специфичные к вирусу SARS-CoV-2.

Ключевые слова: *иммунная реактивность; вирус SARS-CoV-2; реакция нейтрализации; вакцина*

Для цитирования: Мырзахметова Б.Ш., Жаппарова Г.А., Бисенбаева К.Б., Тойтанова С.А., Туысканова М.С., Жугунисов К.Д., Кутумбетов Л.Б. Иммунная реактивность двух биологических моделей на прививку инактивированной вакциной QazVac против коронавирусной инфекции COVID-19. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(3): 219–230. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-222> EDN: <https://elibrary.ru/mcackf>

Благодарности. Авторы выражают благодарность руководству и сотрудникам института за оказанную помощь в проведении данных исследований.

Источник финансирования. Работа выполнена в рамках Государственного задания «Услуги по обеспечению биологической безопасности в сфере науки» на 2023 год, при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Республики Казахстан.

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

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Комитетом по биоэтике Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности Министерства здравоохранения Республики Казахстан (Протокол № 2 от 14.08.2023).

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-222>

Immune reactivity of two biological models to vaccination with inactivated vaccine QazVac against coronavirus infection COVID-19

Balzhan Sh. Myrzakhmetova[✉], Gulzhan A. Zhapparova, Karina B. Bissenbayeva, Aizhan S. Toytanova, Moldir S. Tuyskanova, Kuandyk D. Zhugunissov, Lespek B. Kutumbetov

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

Abstract

Introduction. Specific prevention of a number of infectious diseases has been introduced into the vaccination schedule. The production of immunoprophylactic drugs, in order to establish standard properties, including safety and specific effectiveness, requires strict adherence to manufacturing regulations, and the reliability of the results obtained requires monitoring of these parameters. The specific effectiveness of vaccine preparations is standardized according to the indicators of stimulation of specific antibody response formed in the body of vaccinated model biological objects.

Objective. Determination of the immune reactivity of white mice to vaccination with the QazVac vaccine to establish the possibility of using them as a biological model in assessing the immunogenicity of the vaccine instead of Syrian hamsters.

Materials and methods. The immune reactivity of model animals was assessed by the seroconversion rate, dynamics of antibody titers to the SARS-CoV-2 virus formed in the body after vaccination with the test vaccine. In the case of seropositivity of animals before administration of vaccine or placebo, the level of immune reactivity was calculated by the difference in antibody titers between control and vaccinated animals or by the difference in antibody titers before and after immunization. Specific antibodies were detected and their titer was determined using a neutralization reaction.

Results. The research results showed that the tested biological models had approximately the same immune reactivity to the administration of the QazVac vaccine, confirmed by the level and dynamics of antibody titers. When analyzing the fold increase in antibody titers in comparison to those of control animals, Syrian hamsters were more reactive compared to mice. But SPF white mice were standardized in their lack of the immune reactivity to SARS-CoV-2 virus before the immunization.

Conclusion. The data obtained indicate that the immune reactivity of white mice to the administration of the QazVac vaccine in terms of the rate and dynamics of the formation of virus-neutralizing antibodies is approximately equivalent to the immune reactivity of Syrian hamsters. Before immunization with the vaccine, SPF white mice, in contrast to Syrian hamsters, do not have humoral immunity specific to the SARS-CoV-2 virus. The immune reactivity equivalent to that observed of Syrian hamsters and the absence of antibodies to the SARS-CoV-2 virus at a baseline indicate the superiority of the use of white mice in assessing the immunogenicity of vaccines against COVID-19 and/or obtaining specific factors of humoral immunity.

Keywords: *immune reactivity; SARS-CoV-2 virus; neutralization reaction; vaccine*

For citation: Myrzakhmetova B.Sh., Zhapparova G.A., Bissenbayeva K.B., Toytanova A.S., Tuyskanova M.S., Zhugunissov K.D., Kutumbetov L.B. Immune reactivity of two biological models to vaccination with inactivated vaccine QazVac against coronavirus infection COVID-19. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(3): 219–230. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-222> EDN: <https://elibrary.ru/mcackf>

Acknowledgment. The authors express their gratitude to the management and staff of the institute for their assistance in conducting these studies.

Funding. The work was carried out within the framework of the State assignment «Services for ensuring biological safety in the field of science» for 2023, with financial support from the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan.

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

Ethics approval. The 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 Bioethics Committee of the Research Institute for Biological Safety Problems of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan (Protocol No 2 dated August 14, 2023).

Введение

Эффективным способом профилактики инфекционных заболеваний и ликвидации их эпидемического распространения является повышение иммунной защиты организма с помощью вакцинных препаратов [1–10]. Так, для предупреждения случаев заболевания и предотвращения эпидемий кори, полиомиелита, гриппа и др. социально опасных болезней в медицинской практике проводят соответствующую иммунную профилактику людей с раннего возраста и/или в процессе их жизни [11–14]. Специфическая профилактика ряда инфекционных болезней введена в календарь медицинских прививок. Производство иммунопрофилактических препаратов подразумевает строгое соблюдение регламента изготовления в целях их соответствия заданным стандартным требованиям¹, в том числе по безопасности и специфической эффективности, а также проведение контроля указанных параметров [15, 16]. Специфическую эффективность вакцинных препаратов стандартизируют по показателям стимуляции гуморальных факторов иммунитета, формируемых в организме привитых модельных биологических объектов.

В связи с возникновением пандемии новой коронавирусной инфекции (COVID-19) в разных странах были разработаны различные вакцины против этой болезни, из которых одни получили международное признание, другие используются в национальных масштабах [17–19]. В Республике Казахстан в период пандемии COVID-19 применяли импортные вакцины («Спутник V», Россия; SinoVac, Китай; Pfizer, США) и отечественную вакцину (QazVac, Казахстан) против этой патологии, высокая безопасность и удовлетворительная эффективность которых была продемонстрирована в клинических исследованиях [20–22]. При оценке иммунизирующей эффективности отечественной вакцины QazVac в качестве биологической модели используются сирийские хомяки, которых прививают испытываемой серией вакцины, а через 7 сут после введения второй дозы препарата подвергают исследованию на содержание специфических вируснейтрализующих антител [23]. Согласно требованиям Аналитического нормативного документа (АНД) контроля качества² на препарат, в образцах сыворотки крови модельных животных в эти сроки должны в ходе реакции нейтрализации (РН) определяться специфические антитела в титре не ниже 32. Использование сирийских хомяков в качестве лабораторной модели для оценки иммуногенной активности вакцины было связано с тем, что эти животные восприимчивы к заболеванию COVID-19 [24, 25] и в их организме в постинфекционный период формируются специфические антитела к S-белку вируса SARS-

CoV-2. От начала пандемии новой коронавирусной инфекции до настоящего времени было опубликовано большое количество исследовательских работ, в которых авторами были использованы разные виды животных в качестве биологической модели при производстве и контроле иммунобиологических препаратов против COVID-19 [25–35]. О восприимчивости к вирусу SARS-CoV-2 мелких грызунов Rodentia (мыши, сирийские хомяки) [36–39], хищных животных Carnivora (хорьки, кошки, собаки) [40–42] и нечеловекообразных обезьян Primates (зеленая мартышка, обыкновенная игрунка, африканский бабуин, макак-резус) сообщили ряд ученых, с работами которых можно ознакомиться в базах данных bioRxiv, Medline и PubMed [43–48]. Однако опыт использования сирийских хомяков показал, что часто в их организме содержатся специфические антитела к вирусу SARS-CoV-2 [49] до начала исследования и, соответственно, их наличие не позволяет получать достоверные сведения о стандартности испытываемой вакцины.

Цель исследования – определение иммунной реактивности белых мышей на прививку вакциной QazVac для установления возможности их использования в качестве биологической модели в оценке иммуногенности вакцины вместо сирийских хомяков.

Материалы и методы

Вакцина. В качестве иммунизирующего инструмента была использована вакцина QazVac, изготовленная из варианта «Омикрон-Южная Африка» вируса SARS-CoV-2 в трех сериях (серии № 1, № 2, № 3) по действующей стандартной технологии.

Вирус. Для производства испытываемой вакцины и постановки РН был использован штамм генетического варианта «Омикрон-Южная Африка» вируса SARS-CoV-2, адаптированный в культуре клеток Vero с биологической активностью $6,67 \pm 0,22 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{cm}^3$.

Культура клеток. Для получения биомассы вируса SARS-CoV-2 и постановки РН использовали линию культуры клеток Vero (WHO), сертифицированную Всемирной организацией здравоохранения, выращенную монослоем в пластиковых клеточных фабриках Cell Factory, матрасах и планшетах. Клетки выращивали в питательной среде DMEM с содержанием 5–10% фетальной сыворотки крови крупного рогатого скота (FBS). Для поддержания жизнеспособности клеток использовали ту же питательную среду, но с содержанием 1–2% FBS.

Животные. В качестве лабораторных животных были использованы клинически здоровые золотистые сирийские хомяки живой массой 70–80 г и беспородные белые мыши, свободные от патогенной микрофлоры (СПФ), живой массой 18–22 г. Животных содержали в условиях научно-экспериментальной биологической клиники (ABSL-2) с уровнем биологической безопасности II, где предусмотрены санитарный пропускник, приточно-вытяжная вентиляция, оснащенная фильтрами тонкой очистки HEPA, специальные клетки для содержания животных с автономной подачей воздуха, корма и воды.

¹WHO. Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Available at: <https://covid19.who.int>

²Аналитический нормативный документ (АНД) контроля качества инактивированной вакцины QazCOVID-in (QazVac). Гвардейский; 2021.

Оценка иммунной реактивности животных. Оценку иммунной реактивности модельных животных проводили по количеству сероконверсивности, скорости и динамике титров антител на вирус SARS-CoV-2, формируемых в организме после прививки испытуемой вакциной. В случае серопозитивности животных до прививки вакциной или плацебо уровень иммунной реактивности рассчитывали по разнице титров антител между контрольными и привитыми вакцинами моделями или по разнице титров антител до и после вакцинации. Специфические антитела выявляли и устанавливали их титр с помощью РН.

Постановка реакции нейтрализации. РН проводили на монослойной культуре клеток Vero, приготовленной в 96-луночных пластиковых планшетах. В качестве реакционной смеси использовали двукратные разведения (1 : 2, 1 : 4 и т.д.) исследуемой сыворотки крови сирийских хомяков и белых мышей на поддерживающей среде и культуральную суспензию вируса SARS-CoV-2 варианта «Омикрон» с титром 100 ТЦД₅₀, взятых в равных объемных соотношениях. Полученную смесь выдерживали при температуре 37 °С в течение 60 мин и вносили в равных дозах в не менее чем 4 лунки 96-луночного планшета с тестовой культурой клеток. В качестве контроля дозы суспензию вируса титровали на той же культуре клеток используя ее десятикратные (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴) разведения на поддерживающей среде. Для контроля качества культуры клеток оставляли не менее 4 лунок без внесения реакционной смеси и вируса, но с заменой на поддерживающую среду. Культуру клеток в планшетах с РН выдерживали при температуре 37 °С в течение 5 сут, после чего проводили учет результатов по цитопатическому действию (ЦПД) вируса. Отсутствие ЦПД в культуре клеток, при наличии его в контрольных лунках с дозой вируса и отсутствии в лунках с контролем качества культуры клеток, определяли как нейтрализацию вируса или наличие антител, а наличие ЦПД, при указанных состояниях в перечисленных контролях, – как отсутствие нейтрализации и специфических антител. За титр антител принимали то наивысшее разведение сыворотки крови, которое в не менее 50% случаев нейтрализовало репродукцию вируса. Титр антител описывали в обратных цифровых величинах двукратных разведений сыворотки крови. Титр вируса и сыворотки крови рассчитывали по L. Reed и H. Muench [50]. Достоверность разности титров антител, формируемых у модельных животных, устанавливали по Стьюденту [51–53].

Иммунизация животных. Иммунизацию модельных животных проводили путем внутримышечного введения испытуемой вакцины в дозе 0,5 мл в четырехглавую мышцу левой задней конечности. Перед инъекцией место укола обрабатывали 70° этиловым спиртом и высушивали. Контрольным животным вместо вакцины вводили коммерческий физиологический раствор хлорида натрия (АО «ХимФарм», Шымкент).

Определение безопасности. Безопасность вакцины оценивали путем проведения процедур контро-

ля качества согласно требованиям АНД на препарат и по результатам инъекций двух его иммунизирующих человеческих доз 10 сирийским хомякам и 10 беспородным белым мышам категории СПФ внутримышечно в мышцы задних конечностей. Вакцину считали безопасной в случае соответствия стерильности, содержания эндотоксина, общего белка, клеточной ДНК и пирогенности нормативным значениям, установленным в АНД, а также при выживании всех привитых двойной дозой препарата сирийских хомяков и белых мышей без развития местной и общей патологии в течение 14 сут.

Схема исследования иммуногенности. Сирийских хомяков и белых мышей разделили на 5 групп по 20 голов каждого вида: 1-ю группу животных прививали вакциной серии № 1, 2-ю – вакциной серии № 2, 3-ю – вакциной серии № 3, 4-ю – плацебо, а 5-ю группу оставляли без экспериментального вмешательства. За привитыми и контрольными животными вели ежедневное клиническое наблюдение с регистрацией температуры тела, живой массы. Перед постановкой эксперимента от всех сирийских хомяков и белых мышей собирали образцы сыворотки крови. При этом образцы крови от сирийских хомяков собирали из межрезцовой вены, а у мышей – из подхвостовой вены. На 14, 21, 28, 35-е сутки после инъекции вакцины и плацебо сыворотку крови собирали от 5 голов животных каждого вида, у сирийских хомяков из межрезцовой вены, а у мышей – из шейных сосудов тотально путем декапитации. Образцы сыворотки крови перед исследованием в РН подвергали термической обработке при температуре 56 °С в течение 30 мин.

Статистическая обработка. Статистический анализ результатов проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism8. Достоверность различий между показателями ($p \leq 0,05$) определяли с применением критерия Стьюдента.

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 Комитетом по биоэтике Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности Министерства здравоохранения Республики Казахстан (Протокол № 2 от 14.08.2023).

Результаты

Контроль используемых серий вакцины показал, что они содержат количество водородных ионов в пределах 7,24–7,31, общего белка – 92,765–99,343 мкг/0,5, клеточной ДНК – 37,32–38,94 нг/0,5, эндотоксинов не более 0,15 МЕ/мл и формальдегида не более 20 мг/л. Результаты испытания на стерильность с помощью высева на питательные среды (мясопептонный бульон, мясопептонный агар, Сабуро и тиогликолевую) были отрицательными, что указывало на чистоту от посторонних микроорганизмов.

Сирийские хомяки и белые мыши, получившие 2 дозы вакцины внутримышечно, остались жи-

выми и здоровыми в течение 14 сут наблюдения, кроме первого дня после инъекции препаратом, когда отмечали пониженную подвижность животных в течение 2–4 ч. В остальное время животные обоих видов, привитые двумя дозами вакцины, были активными и здоровыми. В месте введения вакцины в течение наблюдаемого периода какие-либо патологии не развивались.

Исходя из полученных результатов исследований было сделано заключение о том, что три серии вакцины, подвергшиеся исследованию, являются безопасными и пригодными для оценки иммуногенности на модельных животных, а при необходимости и на людях-добровольцах.

Все животные, привитые вакциной и плацебо, а также содержащиеся в чистом контроле в течение всего периода наблюдения, который длился 35 сут, оставались живыми и здоровыми. Результаты исследований образцов сыворотки крови, собранных до постановки опыта и в последующие сроки после введения вакцины и плацебо, в РН показаны в **табл. 1**.

Как видно из данных табл. 1, в образцах сыворотки крови большинства сирийских хомяков до начала исследования присутствовали факторы, нейтрализующие вирус SARS-CoV-2. Серопозитивные животные были выявлены в двух группах, использованных для прививки вакциной, и группе плацебо. Средние титры таких факторов составляли $3,06 \pm 1,7$ в группе плацебо и $3,6 \pm 1,4$ и $8,8 \pm 2,8$ в 1-й и 3-й группе соответственно. Животные 2-й группы были полно-

стью интактны от антител, нейтрализующих вирус SARS-CoV-2.

В образцах сыворотки крови всех животных, привитых вакциной, не зависимо от серии препарата, к 14-м суткам в группах отмечался рост титров антител, нейтрализующих вирус SARS-CoV-2, от $10,0 \pm 3,2$ до $26,8 \pm 7,84$, которые превышали исходные титры в 5,3 раза в 1-й группе, 10-кратно во 2-й группе и 3-кратно в 3-й группе. Среднее значение титров антител по трем группам составило $18,7 \pm 6,12$, что означает прирост в 4,8 раза от исходного среднего титра 3,9. В группе плацебо кратность прироста антител в этот срок была незначительной и составила 1,7.

В последующие сроки в сыворотке крови животных, привитых вакциной, был зарегистрирован дальнейший рост титров антител. К 21-м суткам в группах было зафиксировано нарастание титра от $78,2 \pm 25,60$ до $96,4 \pm 31,35$ со средним значением для всех трех групп $86,2 \pm 28,89$. К 28-м суткам титры антител в группах животных с вакцинацией достигли максимальных значений, колебавшихся от $102,6 \pm 31,35$ до $132,5 \pm 62,71$, со средним показателем $115,2 \pm 39,87$. Средние значения кратности прироста титров антител по сравнению с исходными составили к 21-м суткам 22,1 и к 28-м суткам 29,5, а по отношению к титрам контрольной группы – 22,6 и 41,1 соответственно. На 35-е сутки этот показатель оставался высоким и составил 39,84. В то время как у контрольных животных за весь период наблюдения прирост антител, нейтрализующих вирус SARS-CoV-2, не отмечался.

Таблица 1. Динамика титров ВНА в сыворотке крови сирийских хомяков до и после прививки вакциной QazVac

Table 1. Dynamics of virus-neutralizing antibody titers in blood serum of Syrian hamsters before and after vaccination with QazVac vaccine

Группа Group №	Серия вакцины Vaccine series	Число животных, абс. Number of animals, abs.	Сроки исследования сыворотки крови, сут Time of serum examination, days				
			0	14	21	28	35
1	QazVac, серия 1 series 1	20	$3,6 \pm 1,4$ (10)	$19,2 \pm 6,4$ (5)	$96,4 \pm 31,35$ (5)	$132,5 \pm 62,71$ (5)	$114,0 \pm 27,3$ (5)
2	QazVac, серия 2 series 2	20	0 (10)	$10,0 \pm 3,2$ (5)	$78,2 \pm 25,60$ (5)	$102,6 \pm 31,35$ (5)	$79,6 \pm 25,97$ (5)
3	QazVac, серия 3 series 3	20	$8,8 \pm 2,8$ (10)	$26,8 \pm 7,84$ (5)	$84,2 \pm 29,73$ (5)	$110,4 \pm 25,60$ (5)	$105,2 \pm 31,4$ (5)
Средние данные по трем группам Average data for the three groups		60	$3,9 \pm 1,9$ (30)	$18,7 \pm 6,12$ (15)	$86,2 \pm 28,89$ (15)	$115,2 \pm 39,87$ (15)	$99,6 \pm 28,22$ (15)
4	Плацебо – физ. раствор Placebo – physical solution	20	$3,06 \pm 1,7$ (10)	$3,86 \pm 1,4$ (10)	$3,8 \pm 1,4$ (10)	$2,8 \pm 0,76$ (10)	$2,5 \pm 0,82$ (10)
Кратность повышения титров антител в опытных группах от уровня титров антител в контрольной группе Multiplicity of the increase in antibody titers in the experimental groups compared to the level of antibody titers in the control group			1,27	4,84	22,68	41,14	39,84

Примечание. Здесь и в табл. 2: ВНА – вируснейтрализующие антитела; титры антител в обратных величинах кратности разведения сыворотки крови; в скобках – число животных.

Note. Here and in the table. 2: VNA – virus-neutralizing antibodies; antibody titers in inverse multiples of serum dilution; number of animals in parentheses.

Таблица 2. Динамика титров ВНА в сыворотке крови белых мышей категории СПФ после прививки вакциной QazVac**Table 2.** Dynamics of virus-neutralizing antibody titers in serum of SPF white mice after inoculation with QazVac vaccine

Группа Group №	Серия вакцины Vaccine series	Число животных, абс. Number of animals, abs.	Сроки исследования сыворотки крови, сут Time of serum examination, days				
			0	14	21	28	35
1	QazVac, серия 1 series 1	20	0 (20)	4,4 ± 0,96 (5)	89,2 ± 31,4 (5)	104,6 ± 31,4 (5)	98,4 ± 29,4 (5)
2	QazVac, серия 2 series 2	20	0 (20)	8,1 ± 1,71 (5)	112,4 ± 25,7 (5)	129,3 ± 37,11 (5)	119,4 ± 27,8 (5)
3	QazVac, серия 3 series 3	20	0 (20)	5,6 ± 1,19 (5)	97,4 ± 32,9 (5)	106,4 ± 27,6 (5)	113,6 ± 33,6 (5)
Средние данные по трем группам Average data for the three groups		60	0 (60)	6,03 ± 1,54 (15)	99,67 ± 29,6 (15)	113,43 ± 32,03 (15)	110,46 ± 38,8 (15)
4	Плацебо – физ. раствор Placebo – physical solution	20	0 (20)	1,4 ± 0,8 (5)	4,8 ± 1,6 (5)	8,8 ± 3,91 (5)	3,6 ± 0,8 (5)
Кратность повышения титров антител в опытных группах от уровня титров антител в контрольной группе Multiplicity of the increase in antibody titers in the experimental groups compared to the level of antibody titers in the control group			0	4,31	20,76	12,89	30,68

Анализ индивидуальной серопозитивности по антителам на вирус SARS-CoV-2 показал, что у сирийских хомяков, привитых вакциной, уровень сероконверсии составил 100%, т.е. у всех привитых животных формировались вируснейтрализующие антитела, титры которых возрастали с течением времени.

В исследованиях, проведенных аналогичным образом параллельно на белых мышях, были получены также положительные результаты, которые приведены в табл. 2.

Как видно из данных табл. 2, в образцах сыворотки крови белых мышей, в отличие от сирийских хомяков, до вакцинации не выявлялись факторы, нейтрализующие вирус SARS-CoV-2. Одно у интактных животных контрольной группы такие факторы были обнаружены в низких титрах после введения плацебо. В группах белых мышей опытных групп, подвергнутых вакцинации, с 14-х суток определялись антитела в невысоких титрах, которые уже в этот срок более чем 4-кратно превышали вируснейтрализующий уровень факторов контрольной группы. В последующие сутки титры антител у привитых вакциной белых мышей увеличились значительно и достигли максимальных значений на 21, 28, 35-е сутки, средние значения титров составляли $99,67 \pm 29,61$, $113,43 \pm 32,03$ и $110,46 \pm 38,85$ соответственно. Серопозитивность среди привитых белых мышей во всех группах составила, как и у сирийских хомяков, 100%. Максимальные титры антител были зарегистрированы на 28-е сутки, их среднее значение составило $113,43 \pm 32,03$. На 21-е сутки после первой вакцинации титры антител у вакцинированных животных более чем 20-кратно превышали неспецифический фон задержки репродукции вируса, отмечаемый

в контрольной группе, а на 28-е сутки этот показатель был равен 12,9. При этом уровень кратности превышения титров антител в опытной группе по сравнению с контрольной к 35-м суткам был предельно высоким и составил 30,7.

Результаты исследований, полученные при проведении РН, показали, что как у сирийских хомяков, так и белых мышей после иммунизации вакциной QazVac выявляется поствакцинальная серопозитивность в 100% случаев. Вируснейтрализующие антитела в сыворотке крови сирийских хомяков и белых мышей определялись с 14-х суток после вакцинации в титрах $18,7 \pm 6,12$ у сирийских хомяков и $6,03 \pm 1,54$ у белых мышей, которые достигали максимальных значений в течение последующих 7–21 сут. У сирийских хомяков максимальные титры антител в этот период колебались в пределах от $86,2 \pm 28,89$ до $115,2 \pm 39,87$, а у белых мышей – от $99,67 \pm 29,6$ до $113,43 \pm 32,03$. Приведенные данные указывают на то, что беспородные белые мыши обладают достаточной иммунной реактивностью в отношении цельновирионного антигена вируса SARS-CoV-2, находящегося в составе инактивированной вакцины [57, 58]. Однако необходимо подчеркнуть, что иммунная реактивность сирийских хомяков несколько превышала показатели белых мышей, т.к. у первых кратность увеличения титра антител на всех сроках исследования имела большее числовое значение. Однако эта разница до 21-х суток не имела значимого различия. Различие в кратности прироста титра антител отмечалось, начиная с 28-х по 35-е сутки после иммунизации.

Преимуществом беспородных белых мышей категории СПФ является то, что они до использования

в исследованиях гарантированно свободны от вируса SARS-CoV-2 и антител к этому возбудителю. Такое состояние позволяет получать стандартные результаты оценки иммуногенности испытуемого препарата^{3,4} [59].

Обсуждение

Оценка иммуногенной активности вакцины QazVac (QazCOVID-in) проводится по уровню антител, формируемых в организме сирийских хомяков после двукратного введения этого препарата [23]. Этот вид животных был взят в качестве лабораторной модели для стандартизации иммуногенной активности вакцины вследствие его сравнительно высокой восприимчивости к COVID-19 и достаточной иммунной реактивности на возбудитель этой болезни [24–26]. Однако в процессе использования этих животных было отмечено, что в организме ряда из них выявляются гуморальные факторы, нейтрализующие вирус SARS-CoV-2 в титрах, достигающих до 5–6 log₂ (неопубликованные данные). Вероятно, эти факторы являются следствием контакта животных с пандемическим вирусом через корма и/или с обслуживающим персоналом в процессе размножения и выращивания, т.к. животные поставляются частными предпринимателями, которые содержат их в условиях, не обеспечивающих биологическую безопасность от патогенных микроорганизмов, в том числе от коронавирусной инфекции COVID-19. Отсутствие интактности лабораторной модели не дает возможности утвердительно оценивать иммуногенную активность испытуемого препарата, в связи с чем приходится дополнительно подбирать животных, свободных от целевых антител. В таком случае процесс стандартизации вакцины может выйти за пределы регламентного срока. Кроме того, статистический анализ влияния нейтрализующих факторов в организме сирийских хомяков, имевшихся до вакцинации, на последующую иммунную реактивность животного или выработку антител показывает, что имеется корреляция (статистическая значимость разницы) между наличием нейтрализующего фактора SARS-CoV-2 и выработкой антител [54]. Эта статистически достоверная разница выявлялась на уровне значимости $p = 0,05$ с доверительным интервалом 0,95 [55]. Вышеперечисленное не позволяет стандартизовать иммуногенность препарата по кратности увеличения титра антител с использованием серопозитивных животных.

В этой связи с целью замены сирийских хомяков в испытаниях были использованы беспородные белые мыши, выращенные в условиях, свободных от патогенной микрофлоры. Исследования были проведены

с использованием трех серий вакцины параллельно на указанных двух модельных видах животных.

Результаты исследований показали, что белые мыши так же, как и сирийские хомяки, оказались иммунореактивными на инактивированный антиген вируса SARS-CoV-2 при внутримышечном введении в виде вакцины QazVac, сорбированной на гидрате окиси алюминия. У животных обоих видов, привитых вакциной, с 14-х суток сформировалась серопозитивность 100%. Динамика титров антител у белых мышей близко напоминала таковую у сирийских хомяков. Средние числовые значения титров антител у сирийских хомяков на 14-е сутки в 3,1 раза превышали уровень средних титров антител, выявляемых у белых мышей. Однако кратность увеличения титров антител по сравнению с данными контрольной группы у испытуемых видов животных была одинаковой и равнялась 4,31 у белых мышей и 4,84 у сирийских хомяков. Титры антител в последующие 3 нед (21–35-е сутки) у обоих видов животных имели одинаковую динамику роста до максимальных значений к 28-м суткам и с незначительным снижением к 35-м суткам. Уровень титров антител у сирийских хомяков в эти сроки составлял от $86,2 \pm 28,89$ до $115,2 \pm 39,87$, а у белых мышей – от $99,67 \pm 29,6$ до $113,43 \pm 32,03$ и не имел значимых различий. Кратность увеличения титров антител по сравнению с иммунным фоном контрольной группы животных была примерно одинаковой у обоих видов на 21-е сутки. В последующие сроки этот показатель у сирийских хомяков (41,14 и 39,84 на 28-е и 35-е сутки соответственно) значительно превышал таковой, установленный для белых мышей (12,89 и 30,68 на 28-е и 35-е сутки соответственно), что свидетельствовало о сравнительно большей их иммунной реактивности.

Анализ результатов сравнительных испытаний показывает, что белые мыши так же, как и сирийские хомяки, обладают достаточной иммунной реактивностью на прививку инактивированной вакциной QazCOVID-in (QazVac) и в их организме формируются специфические антитела на вирус SARS-CoV-2. Выявленная иммунная реактивность белых мышей, несмотря на сравнительно меньшую выраженность, чем у сирийских хомяков, вполне достаточна для оценки иммуногенной активности испытуемой вакцины. Белые мыши категории СПФ превосходят сирийских хомяков по интактности от антител на вирус SARS-CoV-2. Исходя из приведенных характеристик, беспородные белые мыши категории СПФ могут быть использованы при оценке иммуногенности вакцины QazVac в качестве новой биологической модели. Согласно данным динамики накопления и титров антител, контрольной точкой оценки иммуногенной эффективности вакцины можно обозначить 21-е сутки после первого введения вместо 7 сут после ревакцинации, проводимой с интервалом в 21 сут, т.е. на 35-е сутки после первого введения вакцины. В таком случае срок стандартизации иммуногенности препарата сократится на 14 сут.

³Решение Комитета по Биоэтике Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности Министерства здравоохранения Республики Казахстан. Протокол № 2; 2023.

⁴ГОСТ 33215–2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур. Межгосударственный стандарт; 2014.

Заключение

1. Проведена оценка иммунной реактивности сирийских хомяков и беспородных белых мышей категории СПФ на иммунизирующий антиген инактивированного вируса SARS-CoV-2 с использованием трех серий вакцины QazVac против коронавирусной инфекции COVID-19 по динамике вируснейтрализующих антител.

2. Согласно результатам исследований, беспородные белые мыши категории СПФ обладают достаточной иммунной реактивностью на введение вакцины QazVac и в их организме формируются специфические антитела на вирус SARS-CoV-2, так же как и у сирийских хомяков, в 100% случаев с 14-х суток после иммунизации. При этом титры вируснейтрализующих антител достигают максимальных значений у обоих видов животных в период с 21-х по 35-е сутки и варьируют у сирийских хомяков в пределах от $86,2 \pm 28,89$ до $115,2 \pm 39,87$, у белых мышей от $99,67 \pm 29,60$ до $113,43 \pm 32,03$ и между собой не имеют значимых различий.

3. Согласно результатам сравнительной оценки кратности увеличения титров специфических антител, иммунная реактивность сирийских хомяков и белых мышей в первые 21 сут представляется равнозначной, а в последующие сроки (28–35-е сутки) у сирийских хомяков она значительно превышает таковые показатели у белых мышей.

4. Согласно результатам исследований, у интактных сирийских хомяков часто выявляются факторы гуморального иммунитета, нейтрализующие вирус SARS-CoV-2, в то время как белые мыши категории СПФ являются свободными от антител на возбудителя коронавирусной инфекции COVID-19. Предварительная специфическая серопозитивность у сирийских хомяков оказывает значимое влияние на уровень формирования поствакцинальных антител, вследствие чего достоверность результатов, получаемых при контроле, становится сомнительной.

5. Полученные данные свидетельствует о том, что иммунная реактивность белых мышей на введение вакцины QazVac по скорости и динамике формирования вируснейтрализующих антител является примерно равнозначной иммунной реактивности сирийских хомяков. В организме белых мышей категории СПФ до введения вакцины, в противовес сирийским хомякам, не содержится факторов гуморального иммунитета, специфичных на вирус SARS-CoV-2. Равнозначная иммунная реактивность с иммунной реактивностью сирийских хомяков и чистота от антител на вирус SARS-CoV-2 показывают превосходство использования белых мышей при оценке иммунизирующей активности вакцин против коронавирусной инфекции COVID-19. Результаты исследований позволяют проводить стандартизацию иммуногенности вакцины на 21-е сутки после первого введения вакцины вместо действующих 35 сут по АНД.

6. Имеется корреляция (статистическая значимость разницы) между наличием нейтрализующего фактора SARS-CoV-2 и выработкой антител [53, 54].

Эта статистически достоверная разница выявлялась на уровне значимости $p = 0,05$ с доверительным интервалом 0,95 [55]. Степени свободы для t-критерия Стьюдента с двумя независимыми выборками – $k = 8$ [56]. Применение t-критерия обусловлено малой мощностью выборок ($n < 30$, $m < 30$). Отличие от Z-критерия незначительное с учетом поправки выборочных средних, таких как дисперсия или среднеквадратическое отклонение. Используя распределение параметров для элементов выборки в заданных диапазонах, заключаем, что разница статистически достоверна с уровнем доверия $1 - p = 0,95$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Young M., Crook H., Scott J., Edison P. COVID-19: Virology, variants, and vaccines. *BMJ Med.* 2022; 1(1): e000040. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmjmed-2021-000040>
2. Fu Y., Zhao J., Wei X., Han P., Yang L., Ren T., et al. Effectiveness and cost-effectiveness of inactivated vaccine to address COVID-19 pandemic in China: Evidence from randomized control trials and real-world studies. *Front. Public Health.* 2022; 10: 917732. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.917732>
3. Minor P.D. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. *Virology.* 2015; 479-480: 379–92. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.032>
4. Subbarao K. Live attenuated cold-adapted influenza vaccines. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2021; 11(9): a038653. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038653>
5. Okamura S., Ebina H. Could live attenuated vaccines better control COVID-19. *Vaccine.* 2021; 39(39): 5719–26. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.08.018>
6. Yarosh O.K., Wandeler A.I., Graham F.L., Campbell J.B., Prevee L. Human adenovirus type 5 vectors expressing rabies glycoprotein. *Vaccine.* 1996; 14(13): 1257–64. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(96\)00012-6](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(96)00012-6)
7. Пушко П., Ишмухаметов А.А., Бреденбек П.Дж., Лукашевич И.С. Экспериментальные живые аттенуированные вакцины против желтой лихорадки на основе инфекционных ДНК. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2019; 18(1): 18–25. DOI: <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-1-18-25> EDN: <https://elibrary.ru/scwjvy>
8. Bugybayeva D., Kydyrbayev Z., Zinina N., Assanzhanova N., Yespembetov B., Kozhamkulov Y., et al. A new candidate vaccine for human brucellosis based on influenza viral vectors: a preliminary investigation for the development of an immunization schedule in a guinea pig model. *Infect. Dis. Poverty.* 2021; 10(1): 13. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40249-021-00801-y>
9. McMenamin M.E., Cowling B.J. CoronaVac efficacy data from Turkey. *Lancet.* 2021; 398(10314): 1873–4. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02288-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02288-1)
10. Heidary M., Kaviar V.H., Shirani M., Ghanavati R., Motahar M., Sholeh M., et al. A comprehensive review of the protein subunit vaccines against COVID-19. *Front. Microbiol.* 2022; 13: 927306. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.927306>
11. Bennett J.V., De Castro L.J., Valdespino-Gomez J.L., Garcia-Garcia Mde L., Islas-Romero R., Echaniz-Aviles G., et al. Aerosolized measles and measles-rubella vaccines induce better measles antibody booster responses than injected vaccines: randomized trials in Mexican schoolchildren. *Bull. World Health Organ.* 2002; 80(10): 806–12.
12. Ecuwwe E.O. Immunization by inhalation of aerosolized measles vaccine. *Ann. Trop. Ped.* 1990; 10(2): 145–9. DOI: <https://doi.org/10.1080/02724936.1990.11747422>
13. Liashenko V.A., Krasnova V.P., Youminova N.V. Measles IgA in the nasal washings of adult volunteers and children immunized intranasally with measles vaccine L-16. *Hum. Antibodies.* 1999; 9(3): 143–8.
14. Бектимиров Т.А. Успехи вакцинопрофилактики кори, краснухи и эпидемического паротита за рубежом. *Вакцинация.* 2006; (4): 4–5.
15. Юнасова Т.Н., Бинятова А.С., Федейкина О.В., Саркисян К.А., Мовсесянц А.А., Игнатъев Г.М. и др. Анализ качества отече-

- ственной вакцины для профилактики краснухи. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(2): 90–6. DOI: <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-90-96> EDN: <https://elibrary.ru/yuujuh>
16. Шамсутдинова О.А. Живые аттенуированные вакцины для иммунопрофилактики. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 7(2): 107–16. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-2-107-116> EDN: <https://elibrary.ru/ysktdf>
 17. Vanaparthi R., Mohan G., Vasireddy D., Atluri P. Review of COVID-19 viral vector-based vaccines and COVID-19 variants. *Infez. Med.* 2021; 29(3): 328–38. DOI: <https://doi.org/10.53854/liim-2903-3>
 18. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatullin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020; 396(10255): 887–97. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)31866-3)
 19. Khoshnood S., Arshadi M., Akrami S., Koupaei M., Ghahramanpour H., Shariati A., et al. An overview on inactivated and live-attenuated SARS-CoV-2 vaccines. *J. Clin. Lab. Anal.* 2022; 36(5): e24418. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcla.24418>
 20. Zakarya K., Kutumbetov L., Orynbayev M., Abduraimov Y., Sultankulova K., Kassenov M., et al. Safety and immunogenicity of a QazCovid-in® inactivated whole-virion vaccine against COVID-19 in healthy adults: A single-centre, randomised, single-blind, placebo-controlled phase 1 and an open-label phase 2 clinical trials with a 6 months follow-up in Kazakhstan. *EClinicalMedicine*. 2021; 39: 101078. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101078>
 21. Khairullin B., Zakarya K., Orynbayev M., Abduraimov Y., Kassenov M., Sarsenbayeva G., et al. Efficacy and safety of an inactivated whole-virion vaccine against COVID-19, QazCovid-in®, in healthy adults: A multicentre, randomised, single blind, placebo-controlled phase 3 clinical trial with a 6-month follow-up. *EClinicalMedicine*. 2022; 50: 101526. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101526>
 22. Nabirova D., Horth R., Smagul M., Nukenova G., Yesmagambetova A., Singer D., et al. Effectiveness of four vaccines in preventing SARS-CoV-2 infection in Almaty, Kazakhstan in 2021: retrospective population-based cohort study. *Front. Public Health*. 2023; 11: 1205159. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1205159>
 23. Zhgunissov K., Zakarya K., Khairullin B., Orynbayev M., Abduraimov Y., Kassenov M., et al. Development of the inactivated QazCovid-in vaccine: protective efficacy of the vaccine in Syrian hamsters. *Front. Microbiol.* 2021; 12: 720437. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.720437>
 24. Nurpeisova A., Khairullin B., Abitayev R., Shorayeva K., Jekebekov K., Kalimolda E., et al. Safety and immunogenicity of the first Kazakh inactivated vaccine for COVID-19. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2022; 18(5): 2087412. DOI: <https://doi.org/10.1080.21645515.2022.2087412>
 25. Жугунисов К.Д., Керимбаев А.А., Копеев С.К., Мырзахметова Б.Ш., Туысканова М.С., Наханов А.К. и др. Вирус SARS-CoV-2: выделение, культивирование, термостабильность, инaktivация и пассирование. *Вестник КазНУ. Серия биологическая*. 2022; 90(1): 73–89. DOI: <https://doi.org/10.26577/eb.2022.v90.il.07>
 26. Imai M., Iwatsuki-Horimoto K., Hatta M., Loeher S., Halfmann P.J., Nakajima N., et al. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2020; 117(28): 16587–95. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2009799117>
 27. Kim Y.I., Kim S.G., Kim S.M., Kim E.H., Park S.J., Yu K.M., et al. Infection and rapid transmission of SARS-CoV-2 in ferrets. *Cell Host Microbe*. 2020; 27(5): 704–9.e2. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.023>
 28. Bao L., Deng W., Huang B., Gao H., Liu J., Ren L., et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature*. 2020; 583(7818): 830–3. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2312-y>
 29. Sun S.H., Chen O., Gu H.J., Yang G., Wang Y.X., Huang X.Y., et al. A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis. *Cell Host Microbe*. 2020; 28(1): 124–33.e4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.020>
 30. Soldatov V.O., Kubekina M.V., Silaeva Y.Yu., Bruter A.V., Deykin A.V. On the way from SARS-CoV-2 sensitive mice to murine COVID-19 model. *Res. Results Pharmacol.* 2020; 6(2): 1–7. DOI: <https://doi.org/10.3897/rpparmacology.6.53633>
 31. Schlottau K., Rissmann M., Graaf A., Schön J., Sehl J., Wylezich C., et al. SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens an experimental transmission study. *Lancet Microbe*. 2020; 1(5): e218–25. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30089-6](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30089-6)
 32. Richard M., Kok A., de Meulder D., Bestebroer T.M., Lamers M.M., Okba N.M.A., et al. SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 3496. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17367-2>
 33. Chan J.F., Zhang A.J., Yuan S., Poon V.K., Chan C.C., Lee A.C., et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(9): 2428–46. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa325>
 34. Boudewijns R., Thibaut H.J., Kaptein S.J.F., Li R., Vergote V., Seldeslachts J., et al. STAT2 signaling as double-edged sword restricting viral dissemination but driving severe pneumonia in SARS-CoV-2 infected hamsters. *bioRxiv*. 2020. Preprint. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.04.23.056838>
 35. Sia S.F., Yan L.M., Chin A.W.H., Fung K., Choy K.T., Wong A.Y.L., et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature*. 2020; 583(7818): 834–8. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2342-5>
 36. Петрова Н.В., Ганина К.К., Тарасов С.А. Изучение чувствительности лабораторных животных к вирусу SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(2): 103–11. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-47> EDN: <https://elibrary.ru/hfvjns>
 37. Takayama K. In vitro and Animal Models for SARS-CoV-2 research. *Trends Pharmacol. Sci.* 2020; 41(8): 513–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.05.005>
 38. Sun J., Zhuang Z., Zheng J., Li K., Wong R.L., Liu D., et al. Generation of a broadly useful model for COVID-19 pathogenesis, vaccination and treatment. *Cell*. 2020; 182(3): 734–43.e5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.010>
 39. Golden J.W., Cline C.R., Zeng X., Garrison A.R., Carey B.D., Mucker E.M., et al. Human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice infected with SARS-CoV-2 develop severe and fatal respiratory disease. *JCI Insight*. 2020; 5(19): e142032. DOI: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.142032>
 40. Martina B.E., Haagmans B.L., Kuiken T., Fouchier R.A.M., Rimmelzwaan G.F., van Amerongen G., et al. SARS virus infection of cats and ferrets. *Nature*. 2023; 425(6961): 915. DOI: <https://doi.org/10.1038/425915a>
 41. Нагорных А.М., Тюменцев А.И., Тюменцева М.А., Акимкин В.Г. SARS, снова SARS и MERS. Обзор животных моделей респираторных синдромов человека, вызываемых коронавирусными инфекциями. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(5): 431–44. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-6> EDN: <https://elibrary.ru/zqdsu>
 42. Shi J., Wen Z., Zhong G., Yang H., Wang C., Huang B., et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus-2. *Science*. 2020; 368(6494): 1016–20. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>
 43. Woolsey C., Borisevich V., Prasad A.N., Agans K.N., Deer D.J., Dobias N.S., et al. Establishment of an African green monkey model for COVID-19. *bioRxiv*. 2020. Preprint. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.05.17.100289>
 44. Corbett K.S., Flynn B., Foulds K.E., Francica J.R., Boyoglu-Barnum S., Werner A.P., et al. Evaluation of the mRNA-1273 vaccine against SARS-CoV-2 in nonhuman primates. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(16): 1544–55. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2024671>
 45. Shan C., Yao Y.F., Yang X.L., Zhou Y.W., Gao G., Peng Y., et al. Infection with novel coronavirus (SARS-CoV-2) causes pneumonia in the rhesus macaques. *Cell Res*. 2020; 30(8): 670–7. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0364-z>
 46. Singh D.K., Ganatra S.R., Singh B., Cole J., Alfson K.J., Clemmons E., et al. SARS-CoV-2 infection leads to acute infection with dynamic cellular and inflammatory flux in the lung that varies across nonhuman primate species. *bioRxiv*. 2020. Preprint. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.06.05.136481>
 47. Williamson B.N., Feldmann F., Schwarz B., Meade-White K., Porter D.P., Schulz J., et al. Clinical benefit of remdesivir in rhesus

- macaques infected with SARS-CoV-2. *bioRxiv*. 2020. Preprint. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.04.15.043166>
48. Yu J., Tostanoski L.H., Peter L., Mercado N.B., McMahan K., Mahrokhian S.H., et al. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Science*. 2020; 369(6505): 806–11. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abc6284>
 49. Мырзахметова Б.Ш., Жаппарова Г.А., Бисенбаева К.Б., Тойтанова А.С., Туысканова М.С., Наханова Г.Д. и др. Стандартизация иммуногенности инактивированной вакцины QazVac против коронавирусной инфекции COVID-19 из эпидемиологически актуального штамма. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*. 2023; (4): 31–41. DOI: <https://doi.org/10.11134/btp.4.2023.4>
 50. Reed L.J., Muench Simple H.A. Method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 1938; 27(3): 493–7. DOI: [https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408\(1938\)](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408(1938))
 51. Мырзагалиев А.К., Щербаква И.В. Возможности использования t-критерия Стьюдента для анализа данных медицинских исследований. *Бюллетень медицинских интернет-конференций*. 2014; 4(11): 1275. EDN: <https://elibrary.ru/tgglen>
 52. Guo B., Yuan Y. A comparative review of methods for comparing means using partially paired data. *Stat. Methods Med. Res.* 2017; 26(3): 1323–40. DOI: <https://doi.org/10.1177/0962280215577111>
 53. Туысканова М.С., Жугунисов К.Д., Ozaslan M., Мырзахметова Б.Ш., Кутумбетов Л.Б. Клинические симптомы/признаки у хомяков при экспериментальном заражении вирусом SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Betacoronavirus). *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(6): 513–25. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-202> EDN: <https://elibrary.ru/kivlek>
 54. Moore D., McCabe G. *Introduction to the Practice of Statistics*. New York: Freeman W.H. and Co; 1989.
 55. Zar J.H. *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River, N.J.: Prentice Hall; 1999: 43–5.
 56. Student. The probable error of a mean. *Biometrika*. 1908; 6(1): 1–25.
 57. Хайруллин Б.М., Закарья К.Д., Орынбаев М.Б., Касенов М.М., Султанкулова К.Т., Жугунисов К.Д. и др. Способ получения инактивированной вакцины для профилактики COVID-19. Патент РК № 34761; 2020.
 58. Государственная Фармакопея Республики Казахстан. Первое издание, выпуск 1; 2008.
 59. Миронов А.Н. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. М.; 2021.
- investigation for the development of an immunization schedule in a guinea pig model. *Infect. Dis. Poverty*. 2021; 10(1): 13. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40249-021-00801-y>
9. McMenamin M.E., Cowling B.J. CoronaVac efficacy data from Turkey. *Lancet*. 2021; 398(10314): 1873–4. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02288-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02288-1)
 10. Heidary M., Kaviar V.H., Shirani M., Ghanavati R., Motahar M., Sholeh M., et al. A comprehensive review of the protein subunit vaccines against COVID-19. *Front. Microbiol.* 2022; 13: 927306. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.927306>
 11. Bennett J.V., De Castro L.J., Valdespino-Gomez J.L., Garcia-Garcia Mde L., Islas-Romero R., Echaniz-Aviles G., et al. Aerosolized measles and measles-rubella vaccines induce better measles antibody booster responses than injected vaccines: randomized trials in Mexican schoolchildren. *Bull. World Health Organ.* 2002; 80(10): 806–12.
 12. Ecutwe E.O. Immunization by inhalation of aerosolized measles vaccine. *Ann. Trop. Ped.* 1990; 10(2): 145–9. DOI: <https://doi.org/10.1080/02724936.1990.11747422>
 13. Liashenko V.A., Krasnova V.P., Youminova N.V. Measles IgA in the nasal washings of adult volunteers and children immunized intranasally with measles vaccine L-16. *Hum. Antibodies*. 1999; 9(3): 143–8.
 14. Bektimirov T.A. Successes of vaccination of measles, rubella and mumps abroad. *Vaktsinatsiya*. 2006; (4): 4–5. (in Russian)
 15. Unasova T.N., Binyatova A.S., Phadeykina O.V., Sarkisyan K.A., Movsesyants A.A., Ignatyev G.M., et al. Analysis of the quality of national vaccine against Rubella. *Voprosy virusologii*. 2018; 63(2): 90–6. DOI: <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-90-96> EDN: <https://elibrary.ru/yuujuh> (in Russian)
 16. Shamsutdinova O.A. Live attenuated vaccines for the immunoprophylaxis. *Infektsiya i immunitet*. 2017; 7(2): 107–16. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2017-2-107-116> EDN: <https://elibrary.ru/yusktdf> (in Russian)
 17. Vanaparthi R., Mohan G., Vasireddy D., Atluri P. Review of COVID-19 viral vector-based vaccines and COVID-19 variants. *Infesz. Med.* 2021; 29(3): 328–38. DOI: <https://doi.org/10.53854/liim-2903-3>
 18. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatullin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020; 396(10255): 887–97. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)31866-3)
 19. Khoshnood S., Arshadi M., Akrami S., Koupaei M., Ghahramanpour H., Shariati A., et al. An overview on inactivated and live-attenuated SARS-CoV-2 vaccines. *J. Clin. Lab. Anal.* 2022; 36(5): e24418. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcla.24418>
 20. Zakarya K., Kutumbetov L., Orynbayev M., Abduraimov Y., Sultankulova K., Kassenov M., et al. Safety and immunogenicity of a QazCovid-in® inactivated whole-virion vaccine against COVID-19 in healthy adults: A single-centre, randomised, single-blind, placebo-controlled phase 1 and an open-label phase 2 clinical trials with a 6 months follow-up in Kazakhstan. *EclinicalMedicine*. 2021; 39: 101078. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101078>
 21. Khairullin B., Zakarya K., Orynbayev M., Abduraimov Y., Kassenov M., Sarsenbayeva G., et al. Efficacy and safety of an inactivated whole-virion vaccine against COVID-19, QazCovid-in®, in healthy adults: A multicentre, randomised, single blind, placebo-controlled phase 3 clinical trial with a 6-month follow-up. *EclinicalMedicine*. 2022; 50: 101526. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101526>
 22. Nabirova D., Horth R., Smagul M., Nukenova G., Yesmagambetova A., Singer D., et al. Effectiveness of four vaccines in preventing SARS-CoV-2 infection in Almaty, Kazakhstan in 2021: retrospective population-based cohort study. *Front. Public Health*. 2023; 11: 1205159. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1205159>
 23. Zhugunissov K., Zakarya K., Khairullin B., Orynbayev M., Abduraimov Y., Kassenov M., et al. Development of the inactivated QazCovid-in vaccine: protective efficacy of the vaccine in Syrian hamsters. *Front. Microbiol.* 2021; 12: 720437. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.720437>
 24. Nurpeisova A., Khairullin B., Abitayev R., Shorayeva K., Jekebekov K., Kalimolda E., et al. Safety and immunogenicity of the first Kazakh inactivated vaccine for COVID-19. *Hum. Vaccin.*

REFERENCES

- Immunother.* 2022; 18(5): 2087412. DOI: <https://doi.org/10.1080.21645515.2022.2087412>.
25. Zhugunissov K., Kerimbayev A.A., Kopeev S., Myrzakhmetova B., Tuyskanova M., Nakhanov A., et al. SARS-CoV-2 Virus: isolation, growth, thermostability, inactivation and passages. *Vestnik KazNU. Seriya biologicheskaya.* 2022; 90(1): 73–89. DOI: <https://doi.org/10.26577/eb.2022.v90.il.07> (in Russian)
 26. Imai M., Iwatsuki-Horimoto K., Hatta M., Loeher S., Halfmann P.J., Nakajima N., et al. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2020; 117(28): 16587–95. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2009799117>
 27. Kim Y.I., Kim S.G., Kim S.M., Kim E.H., Park S.J., Yu K.M., et al. Infection and rapid transmission of SARS-CoV-2 in ferrets. *Cell Host Microbe.* 2020; 27(5): 704–9.e2. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.023>
 28. Bao L., Deng W., Huang B., Gao H., Liu J., Ren L., et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature.* 2020; 583(7818): 830–3. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2312-y>
 29. Sun S.H., Chen O., Gu H.J., Yang G., Wang Y.X., Huang X.Y., et al. A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis. *Cell Host Microbe.* 2020; 28(1): 124–33.e4. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.020>
 30. Soldatov V.O., Kubekina M.V., Silaeva Y.Yu., Bruter A.V., Deykin A.V. On the way from SARS-CoV-2 sensitive mice to murine COVID-19 model. *Res. Results Pharmacol.* 2020; 6(2): 1–7. DOI: <https://doi.org/10.3897/rpharmacology.6.53633>
 31. Schlottau K., Rissmann M., Graaf A., Schön J., Sehl J., Wylezich C., et al. SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens an experimental transmission study. *Lancet Microbe.* 2020; 1(5): e218–25. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30089-6](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30089-6)
 32. Richard M., Kok A., de Meulder D., Bestebroer T.M., Lamers M.M., Okba N.M.A., et al. SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 3496. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17367-2>
 33. Chan J.F., Zhang A.J., Yuan S., Poon V.K., Chan C.C., Lee A.C., et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(9): 2428–46. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa325>
 34. Boudewijns R., Thibaut H.J., Kaptein S.J.F., Li R., Vergote V., Seldeslachts J., et al. STAT2 signaling as double-edged sword restricting viral dissemination but driving severe pneumonia in SARS-CoV-2 infected hamsters. *bioRxiv.* 2020. Preprint. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.04.23.056838>
 35. Sia S.F., Yan L.M., Chin A.W.H., Fung K., Choy K.T., Wong A.Y.L., et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature.* 2020; 583(7818): 834–8. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2342-5>
 36. Petrova N.V., Ganina K.K., Tarasov S.A. Susceptibility of animal species to experimental SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus) infection. *Voprosy virusologii* 2021; 66(2): 103–10. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-47> EDN: <https://elibrary.ru/hfvjns> (in Russian)
 37. Takayama K. In vitro and Animal Models for SARS-CoV-2 research. *Trends Pharmacol. Sci.* 2020; 41(8): 513–7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.05.005>
 38. Sun J., Zhuang Z., Zheng J., Li K., Wong R.L., Liu D., et al. Generation of a broadly useful model for COVID-19 pathogenesis, vaccination and treatment. *Cell.* 2020; 182(3): 734–43.e5. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.010>
 39. Golden J.W., Cline C.R., Zeng X., Garrison A.R., Carey B.D., Mucker E.M., et al. Human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice infected with SARS-CoV-2 develop severe and fatal respiratory disease. *JCI Insight.* 2020; 5(19): e142032. DOI: <https://doi.org/10.1172/jci.insight.142032>
 40. Martina B.E., Haagmans B.L., Kuiken T., Fouchier R.A.M., Rimmelzwaan G.F., van Amerongen G., et al. SARS virus infection of cats and ferrets. *Nature.* 2023; 425(6961): 915. <https://doi.org/10.1038/425915a>
 41. Nagornykh A.M., Tyumentsev A.I., Tyumentseva M.A., Akimkin V.G. SARS, SARS again, and MERS. Review of animal models of human respiratory syndromes caused by coronavirus infections. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2020; 97(5): 431–44. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-6> EDN: <https://elibrary.ru/zqdsu> (in Russian)
 42. Shi J., Wen Z., Zhong G., Yang H., Wang C., Huang B., et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus-2. *Science.* 2020; 368(6494): 1016–20. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>
 43. Woolsey C., Borisevich V., Prasad A.N., Agans K.N., Deer D.J., Dobias N.S., et al. Establishment of an African green monkey model for COVID-19. *bioRxiv.* 2020. Preprint. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.05.17.100289>
 44. Corbett K.S., Flynn B., Foulds K.E., Francica J.R., Boyoglu-Barnum S., Werner A.P., et al. Evaluation of the mRNA-1273 vaccine against SARS-CoV-2 in nonhuman primates. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(16): 1544–55. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2024671>
 45. Shan C., Yao Y.F., Yang X.L., Zhou H.W., Gao G., Peng Y., et al. Infection with novel coronavirus (SARS-CoV-2) causes pneumonia in the rhesus macaques. *Cell Res.* 2020; 30(8): 670–7. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0364-z>
 46. Singh D.K., Ganatra S.R., Singh B., Cole J., Alfson K.J., Clemmons E., et al. SARS-CoV-2 infection leads to acute infection with dynamic cellular and inflammatory flux in the lung that varies across nonhuman primate species. *bioRxiv.* 2020. Preprint. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.06.05.136481>
 47. Williamson B.N., Feldmann F., Schwarz B., Meade-White K., Porter D.P., Schulz J., et al. Clinical benefit of remdesivir in rhesus macaques infected with SARS-CoV-2. *bioRxiv.* 2020. Preprint. DOI: <https://doi.org/10.1101/2020.04.15.043166>
 48. Yu J., Tostanoski L.H., Peter L., Mercado N.B., McMahan K., Mahrokhian S.H., et al. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Science.* 2020; 369(6505): 806–11. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abc6284>
 49. Myrzakhmetova B.Sh., Zhapparova G.A., Bissenbayeva K.B., Toytanova A.S., Tuyskanova M.S., Nakhanova G.D., et al. Standardization of immunogenicity of inactivated vaccine QazVac against coronavirus infection COVID-19 from an epidemiologically relevant strain. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology.* 2023; (4): 31–41. DOI: <https://doi.org/10.11134/btp.4.2023.4> (in Russian)
 50. Reed L.J., Muench Simple H.A. Method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 1938; 27(3): 493–7. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>(1938)
 51. Myrzagaliev A.K., Shcherbakova I.V. Possibilities of using the Student's t-test for analyzing medical research data. *Byulleten' meditsinskikh internet-konferentsii.* 2014; 4(11): 1275. EDN: <https://elibrary.ru/tgglen> (in Russian)
 52. Guo B., Yuan Y. A comparative review of methods for comparing means using partially paired data. *Stat. Methods Med. Res.* 2017; 26(3): 1323–40. DOI: <https://doi.org/10.1177/0962280215577111>
 53. Tuyskanova M.S., Zhugunissov K.D., Ozaslan M., Myrzakhmetova B.Sh., Kutumbetov L.B. Clinical symptoms and signs in hamsters during experimental infection with the SARS-CoV-2 virus (Coronaviridae: Betacoronavirus). *Voprosy virusologii.* 2023; 68(6): 513–25. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-202> EDN: <https://elibrary.ru/kivlek> (in Russian)
 54. Moore D., McCabe G. *Introduction to the Practice of Statistics.* New York: Freeman W.H. and Co; 1989.
 55. Zar J.H. *Biostatistical Analysis.* Upper Saddle River, N.J.: Prentice Hall; 1999: 43–5.
 56. Student. The probable error of a mean. *Biometrika.* 1908; 6(1): 1–25.
 57. Khairullin B., Zakarya K., Orynbayev M., Kassenov M., Sultankulova K., Zhugunissov K., et al. Method for obtaining an inactivated vaccine for the prevention of COVID-19. Patent RK № 34761; 2020. (in Russian)
 58. State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan. First edition, issue 1; 2008. (in Russian)
 59. Mironov A.N. *Guidelines for Conducting Preclinical Studies of Medicinal Products [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv].* Moscow; 2021. (in Russian)

Информация об авторах:

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

Жаппарова Гулжан Амировна – магистр биологии, старший научный сотрудник лаборатории «Особо опасные инфекционные заболевания» РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» МЗ РК, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан. E-mail: gulzhan1003@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5382-831X>

Бисенбаева Карина Бисенбаевна – магистр биологии, младший научный сотрудник лаборатории «Особо опасные инфекционные заболевания» РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» МЗ РК, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан. E-mail: bisenbayeva.karina@bk.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5788-6074>

Тойтанова Айжан Сейткаримовна – магистр биологии, младший научный сотрудник лаборатории «Особо опасные инфекционные заболевания» РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» МЗ РК, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан. E-mail: aizhana-1308@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0004-9526-3539>

Туысканова Молдир Сежанкызы – магистр педагогических наук по специальности биология, младший научный сотрудник лаборатории «Коллекция микроорганизмов» РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» МЗ РК, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан. E-mail: monica_94@list.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6565-082X>

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

Кутумбетов Леспек Бекболатович – д-р вет. наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории «Особо опасные инфекционные заболевания» РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» МЗ РК, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан. E-mail: lespek.k@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-8481-0673>

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

Поступила 31.01.2024

Принята в печать 27.03.2024

Опубликована 30.06.2024

Information about the authors:

Balzhan Sh. Myrzakhmetova[✉] – candidate of biological sciences, head of the laboratory Especially Dangerous Infectious Diseases, Research Institute of Biological Safety Problems, Gvardeyskiy, Republic of Kazakhstan. E-mail: balzhan.msh@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4141-7174>

Gulzhan A. Zhapparova – master of biology, senior researcher of the laboratory Especially Dangerous Infectious Diseases, Research Institute of Biological Safety Problems, Gvardeyskiy, Republic of Kazakhstan. E-mail: gulzhan1003@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5382-831X>

Karina B. Bisenbayeva – master of biology, senior researcher of the laboratory Especially Dangerous Infectious Diseases, Research Institute of Biological Safety Problems, Gvardeyskiy, Republic of Kazakhstan. E-mail: bisenbayeva.karina@bk.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5788-6074>

Aizhan S. Toytanova – master of biology, senior researcher of the laboratory Especially Dangerous Infectious Diseases, Research Institute of Biological Safety Problems, Gvardeyskiy, Republic of Kazakhstan. E-mail: aizhana-1308@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0004-9526-3539>

Moldir S. Tuyskanova – master of pedagogical sciences, majoring in biology, junior researcher of the laboratory Collection of microorganisms, Research Institute of Biological Safety Problems, Gvardeyskiy, Republic of Kazakhstan. E-mail: monica_94@list.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6565-082X>

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

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

Contribution: Myrzakhmetova B.Sh. – study planning, conducting experiments, article design; Zhapparova G.A. – conducting experiments; Bisenbayeva K.B. – conducting experiments; Toytanova A.S. – conducting experiments; Tuyskanova M.S. – conducting experiments; Zhugunissov K.D. – conducting experiments, statistical processing of results; Kutumbetov L.B. – study planning, statistical processing of results, assistance in design of the article.

Received 31 January 2024

Accepted 27 March 2024

Published 30 June 2024

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-232>

© ОЖМЕГОВА Е.Н., КУЗНЕЦОВА А.И., ЛЕБЕДЕВ А.В., АНТОНОВА А.А., КИМ К.В., МУНЧАК Я.М., ТУМАНОВ А.С., КАЗЕННОВА Е.В., 2024



Эффективность схем АРТ первой линии на основе TDF у ВИЧ-инфицированных пациентов с предсуществующей мутацией А62V в обратной транскриптазе

Ожмегова Е.Н.✉, Кузнецова А.И., Лебедев А.В., Антонова А.А., Ким К.В., Мунчак Я.М., Туманов А.С., Казеннова Е.В.

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

Резюме

Введение. А62V в обратной транскриптазе была идентифицирована как мутация, коррелирующая с вирусологической неудачей у пациентов, получавших терапию первой линии, включая тенофовир (TDF) или тенофовир алафенамид (TAF). А62V представляет собой типично полиморфную мутацию суб-субтипа А6 ВИЧ-1, который является наиболее распространенным вариантом вируса в России.

Материалы и методы. По результатам запроса к общеевропейской базе данных EuResist (EIDB) были сформированы две эквивалентные группы пациентов: 1-я группа – пациенты с А62V на исходном уровне, получавшие TDF или TAF в терапии первой линии; 2-я группа – пациенты без А62V на исходном уровне, получавшие TDF или TAF в терапии первой линии. В каждую группу входило по 23 пациента.

Результаты. Статистической разницы между двумя группами по вирусологической эффективности через 4, 12 и 24 нед после начала антиретровирусной терапии (АРТ) и по частоте вирусологических неудач не выявлено.

Заключение. Проведенное исследование имело некоторые ограничения, в связи с чем роль А62V в эффективности АРТ первой линии на основе TDF нуждается в уточнении и заслуживает дальнейшего изучения.

Ключевые слова: ВИЧ-1; А62V; обратная транскриптаза; схема АРТ первого ряда; TDF/TAF

Для цитирования: Ожмегова Е.Н., Кузнецова А.И., Лебедев А.В., Антонова А.А., Ким К.В., Мунчак Я.М., Туманов А.С., Казеннова Е.В. Эффективность схем АРТ первой линии на основе TDF у ВИЧ-инфицированных пациентов с предсуществующей мутацией А62V в обратной транскриптазе. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(3): 231–240. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-232> EDN: <https://elibrary.ru/lnmvih>

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23–15–00027, <https://rscf.ru/project/23-15-00027/>, дата договора 15 мая 2023 г.

Благодарности. Авторы благодарят EuResist Network за предоставление данных из базы данных Euresist.

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

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-232>

Efficacy of first-line ART regimens based on tenofovir in HIV-infected patients with pre-existing A62V mutation in reverse transcriptase

Ekaterina N. Ozhmegova✉, Anna I. Kuznetsova, Aleksey V. Lebedev, Anastasiia A. Antonova, Kristina V. Kim, Yana M. Munchak, Alexandr S. Tumanov, Elena V. Kazennova

National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya of the Russian Ministry of Health, 123098, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The amino acid substitution A62V in reverse transcriptase was identified as a mutation correlated with virologic failure in patients on first-line therapy including tenofovir (TDF) and tenofovir alafenamide (TAF). A62V is a typically polymorphic mutation in HIV-1 sub-subtype A6, which is the most widespread virus variant in Russia.

Materials and methods. The European EuResist (EIDB) database was queried to form two equivalent groups of patients: group 1 – patients with A62V at baseline treated with TDF or TAF on the first-line therapy, group 2 – patients without A62V at baseline treated with TDF or TAF on the first-line therapy. Each group included 23 patients. **Results.** There was no statistical difference between the two groups in virologic efficacy in 4, 12, and 24 weeks after the start of antiretroviral therapy (ART) and in the frequency of virologic failures.

Conclusion. This study has some limitations, and the exact role of A62V in the efficacy of the first-line ART based on tenofovir deserves further investigation.

Keywords: HIV-1; A62V; reverse transcriptase; first-line ART regimen; TDF/TAF

For citation: Ozhmegova E.N., Kuznetsova A.I., Lebedev A.V., Antonova A.A., Kim K.V., Munchak Ya.M., Tumanov A.S., Kazennova E.V. Efficacy of first-line ART regimens based on tenofovir in HIV-infected patients with pre-existing A62V mutation in reverse transcriptase. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(3): 231–240. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-232> EDN: <https://elibrary.ru/lnmvih>

Funding. The research was funded by the Russian Science Foundation, grant number 23–15–00027, <https://rscf.ru/project/23-15-00027/>, date of agreement 15 May 2023.

Acknowledgement. The authors thank Euresist Network for providing the data from the Euresist database.

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

Введение

A62V в обратной транскриптазе (ОТ) является дополнительной мутацией, связанной с лекарственной устойчивостью (ЛУ) ВИЧ-1 [1, 2]. Она входит в состав мультирезистентных мутационных комплексов: комплекса Q151M (A62V, V75I, F77L, F116Y и Q151M) и инсерционного комплекса T69SSS (M41L, A62V, T69SSS, K70R и T215Y), которые влияют практически на все препараты нуклеозидных ингибиторов ОТ (НИОТ), включая широко используемые ламивудин (ЗТС), эмтрицитабин (ФТС) и тенофовир (ТДФ) [3]. Также A62V часто встречается в сочетании с мутацией K65R, вызывающей ЛУ к ТДФ, абакавиру (АВС), ставудину (d4T), диданозину (ddI) и редко к ЗТС [4]. Было показано, что A62V улучшает приспособленность устойчивых к лекарствам вирусов [3, 4]. A62V является непалиморфной мутацией для всех подтипов ВИЧ-1, за исключением подтипа А [3]. До сих пор неизвестно, может ли ранее существовавшая мутация A62V влиять на появление основных мутаций ЛУ ВИЧ-1 у пациентов, находящихся на первой линии терапии. Однако некоторые авторы определили A62V как одну из мутаций, коррелирующих с вирусологической неудачей у пациентов, получающих терапию первой линии, включая ТДФ, и подчеркнули необходимость дальнейшего изучения возможности влияния A62V на ЛУ к ТАФ [5]. В странах, где пациенты в основном инфицированы вариантами, отличными от А, A62V редко выявлялся исходно, до начала терапии [6, 7]. Кроме того, A62V в ОТ, как правило, представляет собой полиморфную мутацию подтипа А6, который является наиболее распространенным вариантом ВИЧ-1 в России [8, 9]. В период 2006–2022 гг. в России A62V был выявлен у 39,9% ранее не получавших лечения пациентов [9].

Целью данного исследования было сравнение эффективности схем антиретровирусной терапии (АРТ) первой линии с использованием ТДФ в двух группах: 1) в группе людей, живущих с ВИЧ (ЛЖВ), с мутацией A62V в ОТ ВИЧ-1 на исходном уровне

и 2) в группе ЛЖВ без мутации A62V в ОТ ВИЧ-1 на исходном уровне.

Материалы и методы

Дизайн исследования и участники

Из интегрированной общеевропейской базы данных EuResist (EuResist Integrated DataBase, EIDB), одной из крупнейших доступных баз данных генотипов ВИЧ и клинических результатов действия АРТ, все доступные данные были загружены 21 марта 2023 г.¹ Демографическая информация о пациентах являлась недоступной; все данные были полностью анонимными. Этическое одобрение в данном случае не требовалось.

Загруженный набор данных включал нуклеотидные последовательности и соответствующую им клиническую информацию о 151 109 пациентах. Были сформированы две группы.

Первая группа (A62V+) – группа ЛЖВ с мутацией A62V в ОТ ВИЧ-1 на исходном уровне – была сформирована по следующим критериям:

а) мутация A62V в ОТ ВИЧ-1 исходно до начала терапии первой линии;

б) отсутствие мутаций устойчивости к препаратам НИОТ на исходном уровне до начала терапии первой линии;

в) отсутствие мутаций ЛУ ВИЧ-1 к классам основных препаратов терапии первой линии (ненуклеозидных ингибиторов ОТ (ННИОТ), ингибиторов протеазы (ИП) или ингибиторов интегразы (ИИ)) на исходном уровне до начала терапии первой линии;

г) терапия первой линии на основе ННИОТ/ИП/ИИ с двумя НИОТ в качестве основы, одним из которых является ТДФ/ТАФ;

д) нахождение на терапии первой линии более 4 нед.

В итоге 23 пациента из EIDB соответствовали вышеперечисленным критериям.

¹The Euresist Integrated Database (EIDB). Available at: <https://euresist.org/eidb>

Число пациентов во 2-й группе (A62V-) – группе ЛЖВ без мутации A62V в ОТ ВИЧ-1 на исходном уровне – было эквивалентно группе A62V+: 23 пациента. Группа A62V- была сформирована на основе случайной выборки по следующим критериям:

а) отсутствие мутации A62V в ОТ ВИЧ-1 исходно до начала лечения;

б) отсутствие мутаций устойчивости ВИЧ к НИОТ на исходном уровне до начала терапии первой линии;

в) отсутствие мутаций ЛУ ВИЧ-1 к классам основных препаратов (ННИОТ, ИП или ИИ) на исходном уровне до начала терапии первой линии;

г) терапия первой линии, основанная на ННИОТ/ИП/ИИ с двумя НИОТ в качестве основы, одним из которых является TDF/TAF;

д) нахождение на терапии первой линии более 4 нед.

Пациенты, включенные в исследование, наблюдались в разных европейских центрах, и ни один из пациентов не был из России.

Для каждого пациента загружали следующие данные: последовательность гена *pol* для протеазы и ОТ перед началом терапии первой линии и для интегразы, если пациент находился на терапии первой линии на основе ИИ; дата секвенирования образца, субтип ВИЧ, список мутаций (основные и дополнительные мутации к ИП, НИОТ, ННИОТ и ИИ в соответствии со Стэнфордской базой данных), данные АРТ (состав терапии первой линии, дата начала терапии и прекращения) и динамика вирусной нагрузки (ВН).

Эффективность АРТ первой линии сравнивали в двух группах согласно определениям вирусологического ответа в российских и европейских руководствах (табл. 1) [10, 11].

Вирусологическую эффективность АРТ через 4, 12 и 24 нед оценивали на основании определения, приведенного в российских руководствах. Для определения случаев вирусологической неудачи критерии двух руководств были объединены. ВН < 50 копий РНК/мл использовали в качестве порогового или неопределяемого уровня ВН (вирусологическая супрессия).

Под вирусологическим всплеском «virologic blip» подразумевалось достижение уровня ВН < 50 копий РНК/мл с последующим кратковременным увеличением уровня ВН выше неопределяемого уровня с дальнейшим возвращением к уровню менее 50 копий РНК/мл.

Под вирусологической неудачей понимали невозможность достижения ВН < 50 копий/мл через 24 нед терапии или повторное выявление определяемого уровня ВН через 6 мес лечения и более у пациентов, достигших вирусологической супрессии. Также оценивали промежуточные результаты действия АРТ первой линии через 4, 12 и 24 нед после начала терапии в двух группах.

Статистический анализ проводили для сравнения частоты случаев вирусологической эффективности в двух группах в каждый момент времени.

Далее в каждой группе были выявлены случаи вирусологической неудачи. Статистический анализ проводили с целью определения разницы в частоте вирусологической неудачи в двух группах.

Статистический анализ и визуализация

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Statistica v. 6.0 (StatSoft Inc., США). Представление количественных данных в настоящем

Таблица 1. Определение вирусологического ответа на АРТ в российских и европейских руководствах

Table 1. Virologic response definitions to ART in Russian and European guidelines

Руководство Guidelines	Вирусологическая эффективность Virologic efficacy			Вирусологический всплеск Virologic blip	Вирусологический неуспех Virologic failure
	через 4 нед in 4 weeks	через 12 нед in 12 weeks	через 24 нед in 24 weeks		
Российское руководство Russian guidelines	Снижение ВН на ≥ 1 lg VL decrease by ≥ 1 lg	ВН < 400 копий РНК/мл VL < 400 copies/ mL	ВН < 50 копий РНК/мл VL < 50 copies/ mL	После неопределяемой ВН (< 50 копий/мл) повышение ВН до уровня менее 200 копий РНК/мл After undetectable VL (< 50 copies/mL) an isolated rising of VL to a level of less than 200 copies/ml	Невозможность достижения ВН < 50 копий РНК/мл, или после вирусологической супрессии подтвержденный обнаруживаемый уровень ВН > 50 копий РНК/мл через 24 нед или более после начала АРТ The inability to achieve VL < 50 copies/ml or after virologic suppression confirmed detectable VL > 50 copies/ml in 24 weeks or more after ART starting
Европейское руководство European guidelines	Н.д. N/a	Н.д. N/a	Н.д. N/a	После подтверждения неопределяемой ВН обнаруживаемый уровень ВН с последующим возвращением к неопределяемому уровню After confirmed undetectable VL an isolated detectable VL level followed by a return to an undetectable level	Невозможность достижения или поддержания ВН < 200 копий/мл The inability to achieve or maintain VL < 200 copies/ml

исследовании осуществляли с использованием следующей описательной статистики: размера выборки (*n*), медианы и межквартильного интервала (IQR; в виде 25% и 75% процентилей). Статистическую значимость различий между наблюдаемыми параметрами оценивали с помощью двустороннего точного критерия Фишера. Уровень значимости (*p*), принятый в данной работе, составил 0,05 (или 5,0%). Визуализацию выполняли в программе GraphPad Prism v. 5.0 (GraphPad Software Inc., США).

Результаты

В каждую группу вошли 23 пациента (табл. 2).

Большинство пациентов принимали FTC + TDF + EFV: 30,4% (7/23) в 1-й группе и 52,2% (12/23) во 2-й группе. ВН исходно была выше в 1-й группе (медиана 5,4 копий РНК/мл), чем во 2-й группе (4,6 копий РНК/мл). В 1-й группе больные ранее были инфицированы суб-субтипом А6 (87,0%), а во 2-й группе – субтипом В (82,6%). В среднем пациенты без А62V проходили более длительную терапию (168 нед).

Проанализированы результаты измерений ВН через 4 ± 2, 12 ± 4 и 24 ± 4 нед после начала АРТ. В табл. 3 представлены результаты измерения ВН у пациентов обеих групп. Значения ВН через 4 нед после начала АРТ были доступны у 36 пациентов

Таблица 2. Характеристика пациентов, принявших участие в исследовании

Table 2. Characteristics of the patients who participated in the study

Схема первого ряда АРТ ART first-line regimen	A62V+ (n=23)	A62V- (n=23)	<i>p</i>
3TC + TDF + DTG, <i>n</i> (%)	1 (4,3)	–	0,98
FTC + TAF + DRV, <i>n</i> (%)	1 (4,3)	–	0,98
3TC + TDF + EFV, <i>N</i> (%)	1 (4,3)	–	0,98
FTC + TDF + DRV/rtv, <i>n</i> (%)	1 (4,3)	2 (8,7)	0,97
FTC + TDF + RPV, <i>n</i> (%)	2 (8,7)	1 (4,3)	0,97
FTC + TDF + LPV/rtv, <i>n</i> (%)	2 (8,7)	1 (4,3)	0,97
FTC + TDF + FPV/rtv, <i>N</i> (%)	2 (8,7)	–	0,5
FTC + TDF + EFV, <i>n</i> (%)	7 (30,4)	12 (52,2)	0,48
FTC + TDF + DTG, <i>n</i> (%)	3 (13,0)	–	0,27
FTC + TAF + BIC, <i>n</i> (%)	1 (4,3)	–	0,98
FTC + TDF + ATV, <i>n</i> (%)	1 (4,3)	3 (13,0)	0,66
FTC + TAF + DRV + cob, <i>n</i> (%)	1 (4,3)	2 (8,7)	0,97
FTC + TDF + NVP, <i>n</i> (%)	–	1 (4,3)	0,97
FTC + TDF + RAL, <i>n</i> (%)	–	1 (4,3)	0,97
3TC + TDF + LPV/rtv, <i>n</i> (%)	–	1 (4,3)	0,97
Медиана [IQR] ВН на исходном уровне, log10 копий РНК/мл Median [IQR] VL at baseline, log10 RNA copies/ml	5,4 [2,9–6,3]	4,6 [1,7–5,6]	0,99
Медиана [IQR] продолжительности терапии, нед Median [IQR] duration of therapy, weeks	86,0 [46,0–152,0]	168,0 [128,0–176,0]	0,33
Субтип Subtype			
A6	20 (87,0)	1 (4,3)	0,001
B	–	19 (82,6)	0,003
G	2 (8,7)	–	0,5
CRF01_AE	1 (4,3)	–	0,98
CRF09_cpx	–	1 (4,3)	0,97
F	–	1 (4,3)	0,97
CRF02_AG	–	1 (4,3)	0,97

Примечание. TDF – тенофовира дизопроксила фумарат; TAF – тенофовира алафенамид; FTC – эмтрицитабин; 3TC – ламивудин; DRV – дарунавир; RPV – рилпивирин; LPV – лопинавир; FPV – фосампренавир; EFV – эфавиренц; DTG – долутегравир; BIC – биктегравир; ATV – атазанавир; NVP – невирапин; RAL – ралтегравир; RTV – ритонавир; cob – кобицистат; IQR – межквартильный размах; ВН – вирусная нагрузка.

Note. TDF – tenofovir disoproxil fumarate; TAF – tenofovir alafenamide; FTC – emtricitabine; 3TC – lamivudine; DRV – darunavir; RPV – rilpivirine; LPV – lopinavir; FPV – fosamprenavir; EFV – efavirenz; DTG – dolutegravir; BIC – bictegravir; ATV – atazanavir; NVP – nevirapine; RAL – raltegravir; rtv – ritonavir; cob – cobicistat; IQR – interquartile range; VL – viral load.

Таблица 3. Результаты измерения вирусной нагрузки (ВН)

Table 3. Results of viral load (VL) measurement

Номер пациента Patient No.	ВН на исходном уровне, копий РНК/мл VL at baseline, RNA copies/ml	Срок наблюдения, мес Follow-up period, months	Срок наблюдения, нед Follow-up period, weeks	Число измерений ВН за период наблюдения Number of VL measurements during the observation period	ВН через 4 нед, копий РНК/мл VL in 4 weeks, RNA copies/ml	ВН через 4 нед (ΔLog_{10}) VL decrease in 4 weeks (ΔLg)	ВН через 12 нед, копий РНК/мл VL in 12 weeks, RNA copies/ml	ВН через 24 нед, копий РНК/мл VL in 24 weeks, RNA copies/ml
A62V+								
1v	4683	4	16	2	–	–	40	–
2v	7852	6	24	2	–	–	–	69 200
3v	726	5	20	2	–	–	–	40
4v	6520	23	92	5	40	2,2	40	–
5v	5817	45	180	12	–	–	5817	99
6v	6660	80	320	19	0	> 1 lg	0	130
7v	77 006	94	376	31	587	2,1	40	40
8v	157 783	2	8	2	–	–	40	–
9v	64 201	63	252	19	528	2,1	275	40
10v	32 200	7	28	4	315	2,0	10	10
11v	92 000	28	112	9	830	2,0	33	15
12v	49 437	130	520	37	597	1,9	–	40
13v	7286	15	60	5	1	3,8	130 120	–
14v	16 200	5	20	3	0	> 1 lg	0	–
15v	42 400	3	12	3	459	1,9	34	–
16v	12 454	2	8	2	–	–	50	–
17v	41 225	30	120	29	330	2,1	–	40
18v	211 000	27	108	7	469	2,6	6 150 000	–
19v	209 136	6	24	3	25	3,9	–	20
20v	2 080 000	58	232	15	233	3,9	38	40
21v	160 000	43	172	14	478	2,5	0	0
22v	1 740 000	61	244	11	2180	2,9	–	0
23v	155 707	45	180	20	1579	1,9	219	40
A62V–								
1a	78 000	28	112	5	–	–	–	25
2a	69 000	51	204	10	390	2,2	50	25
3a	134 896	22	88	7	1413	2,0	813	129
4a	61 000	30	120	15	50	3,1	50	25
5a	67 000	40	160	14	990	1,8	50	50
6a	34 000	32	128	7	3900	0,9	50	50
7a	230 000	35	140	16	57	3,6	50	50
8a	910 000	23	92	4	3700	2,4	–	150
9a	398 107	20	80	6	2754	2,1	282	63
10a	360 000	49	196	10	850	2,6	–	25
11a	490 000	56	224	14	850	2,7	50	50
12a	425 187	7	28	2	1191	2,5	–	40
13a	3000	31	124	6	50	1,8	50	25
14a	9900	15	60	5	140	1,9	50	50
15a	50	77	308	13	–	–	–	–
16a	3000	50	200	11	50	1,8	50	50
17a	6600	29	116	9	50	2,1	50	50
18a	490	53	212	11	–	–	50	50
19a	14 000	17	68	4	–	–	50	50
20a	14 000	60	240	15	50	1,6	50	50
21a	26 915	3	12	4	631	1,6	65	–
22a	4100	33	132	8	50	1,9	–	25
23a	17 000	45	180	9	56	2,5	–	25

(у 17 в 1-й группе у 19 во 2-й группе). У всех пациентов 1-й группы и у 18 из 19 пациентов 2-й группы наблюдалось снижение ВН более чем на 1 lg. Только у одного пациента (6а) во 2-й группе было зарегистрировано снижение Δ Lg ВН менее чем на 1 lg, составившее 0,9. Статистической разницы между двумя группами не было найдено ($p = 0,95$).

Через 12 нед результаты измерений ВН были получены у 33 пациентов (у 17 в 1-й группе, у 16 во 2-й группе). В 1-й группе у 14 из 17 больных ВН была менее 400 копий/мл, во 2-й группе – у 15/16. Статистической разницы между двумя группами не было найдено ($p = 0,6$).

Через 24 нед результаты измерения ВН были получены у 36 пациентов (у 15 в 1-й группе, у 21 во 2-й группе). В 1-й группе у 12 из 15 пациентов ВН была менее 50 копий/мл, во 2-й группе – у 18/21. Статистической разницы между двумя группами не было найдено ($p = 0,7$).

Динамика ВН у пациентов двух групп за весь период наблюдения представлена на **рисунке**.

На основании динамики ВН в период наблюдения выявлены и проанализированы случаи вирусологической неудачи в обеих группах.

Так, в когорте А62V+ у 16 пациентов (1v, 3v, 4v, 6v, 7v, 8v, 10v, 11v, 13v, 14v, 15v, 16v, 19v, 20v, 21v, 22v) ВН достигла неопределяемого уровня (< 50 копий/мл). У 3 пациентов (5v, 9v, 12v) наблюдалась вирусологическая супрессия, за которой последовали всплески ВН. У 2 пациентов (17v, 23v) ВН достигла неопределяемого уровня с последующим подтвержденным вирусологическим неуспехом. У 2 пациентов (2v, 18v) ВН не достигла неопределяемого уровня. Следовательно, в когорте А62V+ вирусологическая неудача была выявлена у 4 (2v, 17v, 18v, 23v) из 23 пациентов.

В когорте А62V– у 19 пациентов (2а, 4а, 5а, 6а, 7а, 8а, 9а, 10а, 11а, 12а, 13а, 14а, 15а, 16а, 17а, 18а, 19а, 20а, 23а) была достигнута вирусологическая супрессия. У одного пациента (1а) ВН достигла неопределяемого уровня с последующим неподтвержденным всплеском ВН. У одного пациента (21а) ВН не достигла неопределяемого уровня. При этом через 12 нед ВН снизилась до 65 копий/мл, что соответствует вирусологической эффективности, а в последующий период наблюдения результаты измерения ВН не были доступны. Этот результат не был интерпретирован как вирусологическая неудача. У 2 пациентов (3а, 22а) ВН упала ниже порогового уровня с последующим подтвержденным восстановлением. Следовательно, в когорте А62V– вирусологическая неудача была выявлена у 2 (3а, 22а) из 23 пациентов.

Многофакторный логистический регрессионный анализ в обеих группах не обнаружил связи между вирусологической неудачей и такими переменными, как состав АРТ, субтип ВИЧ-1 и продолжительность АРТ.

Статистической разницы в случаях вирусологической неудачи в двух группах не было найдено ($p = 0,66$; двусторонний критерий Фишера).

Обсуждение

Варианты ВИЧ-1, распространенные в России, отличаются от вариантов вируса, циркулирующих в Европе, Азии и Северной Америке [12]. Примечательно, что наиболее распространенным вариантом ВИЧ-1 в России является суб-субтип А6, выявляемый в 78,6% случаев [9]. Суб-субтип А6 имеет ряд типичных полиморфных мутаций, связанных с ЛУ: E138A и A62V в ОТ, L74I в интегразе [8, 9, 13]. В одной из предыдущих работ мы изучали влияние ранее существовавшей мутации E138A в ОТ на эффективность схем АРТ первой линии [14]. Настоящее исследование сосредоточено на А62V в ОТ.

В более ранних исследованиях в России А62V в ОТ суб-субтипа А6 была обнаружена в 63% случаев у наивных пациентов и в 78% случаев у пациентов, имеющих опыт АРТ [15, 16]. Несмотря на то что в настоящее время наблюдается тенденция, указывающая на снижение частоты встречаемости А62V, ее распространенность остается относительно высокой. Так, в эпиднадзорном исследовании, проведенном в России на основе клинических образцов, собранных от ВИЧ-инфицированных пациентов до начала лечения в 2017–2019 гг., А62V была обнаружена в 37,1% случаев [17].

Недавнее исследование в России выявило потенциальную связь между А62V и вирусологическим прорывом «virological breakthrough» [18], что коррелирует с результатами предыдущего исследования [5]. Это первое исследование, в котором эффективность терапии первой линии, включающей TDF/TAF, сравнивали в двух группах: ЛЖВ с ранее существовавшей А62V в ОТ на исходном уровне до начала терапии первой линии и без нее.

В России генотипирование ВИЧ перед началом АРТ не является обязательным и, как правило, не проводится в плановом порядке [10]. В связи с этим для формирования двух групп пациентов мы обратились к общеевропейской интегрированной базе данных EIDB.

Результаты показали, что между двумя группами не было статистических различий по вирусологической эффективности через 4, 12 и 24 нед после начала АРТ, а также по частоте вирусологических неудач. Однако вирусологическая неудача наблюдалась у 4 пациентов в группе А62V+ и у 2 – в группе А62V–.

Основным ограничением настоящего исследования являлось отсутствие генотипов вируса в конце терапии первой линии у пациентов с вирусологической неудачей. Таким образом, не было возможности оценить, была ли вирусологическая неудача связана с появлением основных мутаций ЛУ ВИЧ, ассоциированных с А62V, или она была связана с другими мутациями ЛУ ВИЧ, а также недостаточной приверженностью пациентов. Кроме того, среди 4 пациентов с вирусологической неудачей в группе А62V+ один пациент (2v) принимал ЗТС + TDF + EFV и 3 пациента (17v, 18v, 23v) получали АРТ на основе ИП: FTC + TAF + DRV + cob, FTC + TDF + FPV/rtv и FTC + TDF + LPV/rtv соответственно. Два пациента с вирусологической неудачей

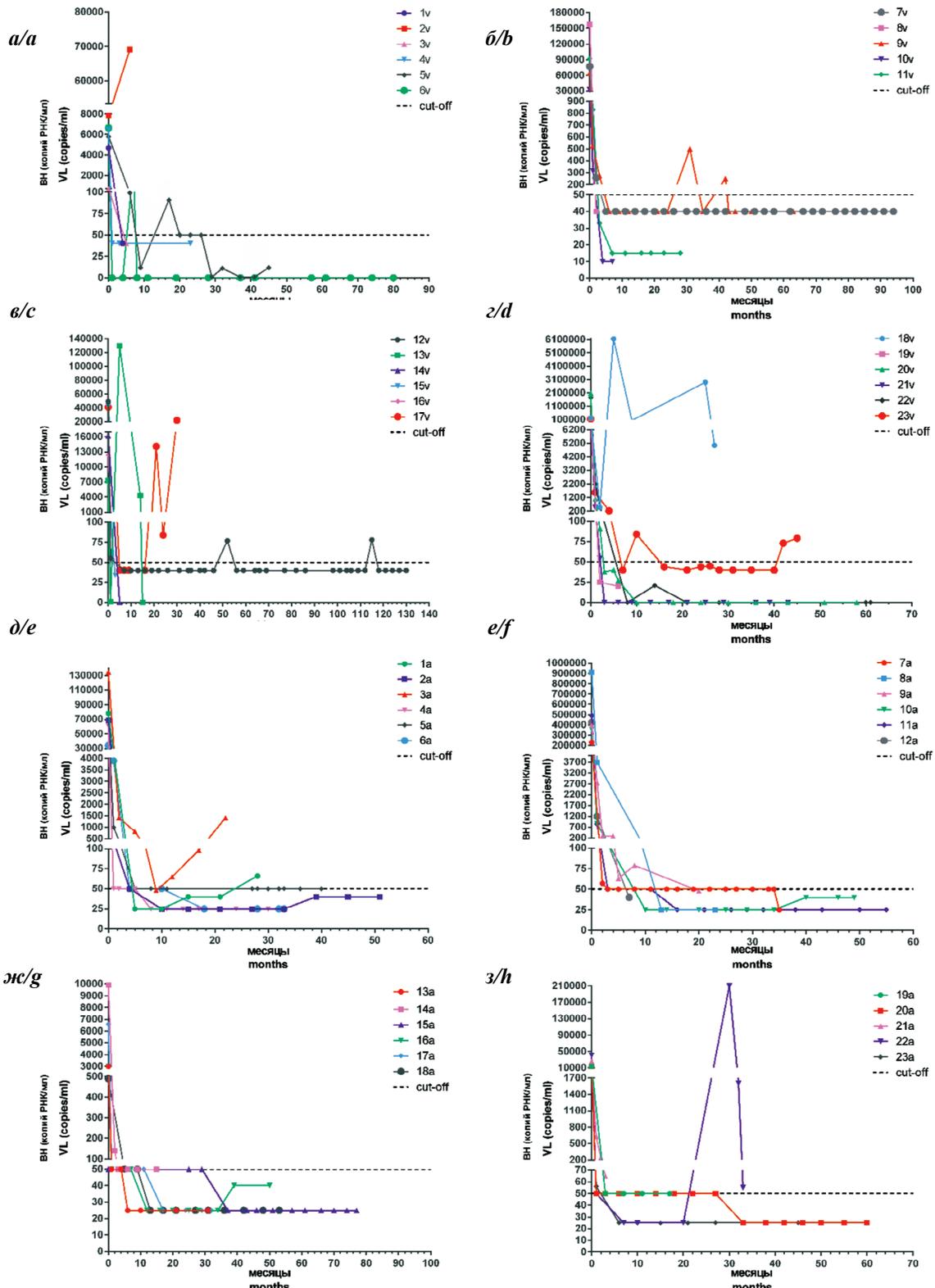


Рисунок. Динамика ВН в период наблюдения.

Уровень ВН ниже 50 копий/мл определялся как пороговый. *a-z* (группа A62V+): *a* – пациенты 1v, 2v, 3v, 4v, 5v, 6v; *b* – пациенты 7v, 8v, 9v, 10v, 11v; *c* – пациенты 12v, 13v, 14v, 15v, 16v, 17v; *d* – пациенты 18v, 19v, 20v, 21v, 22v, 23v; *d-z* (группа A62V-): *d* – пациенты 1a, 2a, 3a, 4a, 5a, 6a; *e* – пациенты 7a, 8a, 9a, 10a, 11a; *ж* – пациенты 12a, 13a, 14a, 15a, 16a, 17a; *з* – пациенты 18a, 19a, 20a, 21a, 22a, 23a.

Figure. The dynamics of VLs during the follow-up period.

The VL level below 50 copies/ml was defined as a cut-off. *a-d* (A62V+ group): *a* – patients 1v, 2v, 3v, 4v, 5v, 6v; *b* – patients 7v, 8v, 9v, 10v, 11v; *c* – patients 12v, 13v, 14v, 15v, 16v, 17v; *d* – patients 18v, 19v, 20v, 21v, 22v, 23v; *e-h* (A62V- group): *e* – patients 1a, 2a, 3a, 4a, 5a, 6a; *f* – patients 7a, 8a, 9a, 10a, 11a; *g* – patients 12a, 13a, 14a, 15a, 16a, 17a; *h* – patients 18a, 19a, 20a, 21a, 22a, 23a.

в группе A62V– (3а, 22а) принимали FTC + TDF + EFV. При этом примерно у 50% пациентов EFV вызывает нейropsychиатрические побочные эффекты [19], что может повлиять на приверженность к лечению. Наиболее распространенным проявлением токсичности ИП является воздействие на желудочно-кишечный тракт, в частности диарея; более того, предпочтительный режим приема ИП – 2 раза в день, что может создать потенциальные проблемы для пациентов с точки зрения приверженности [20].

Еще одним ограничением настоящего исследования является то, что пациенты двух групп были инфицированы разными типами ВИЧ-1: в группе A62V+ – в 87,0% (20/23) случаев суб-субтипом A6, а в группе A62V– – в 82,6% (19/23) случаев субтипом B. В настоящее время имеются противоречивые данные о влиянии субтипа ВИЧ-1 на патогенез и развитие ЛУ. Результаты ряда исследований подтвердили гипотезу о том, что разные варианты ВИЧ-1 могут иметь разные клинические характеристики [21]. Кроме того, поскольку исследование носило ретроспективный характер, измерение ВН и последующее наблюдение за пациентами не были запланированы последовательно и на всех контрольных точках можно было наблюдать ограниченное число участников.

Заключение

Проведено первое пилотное исследование, направленное на оценку эффективности схем АРТ первой линии на основе TDF у ВИЧ-инфицированных пациентов с уже существующей мутацией A62V в ОТ. Результаты этого исследования позволяют приблизиться к пониманию риска вирусологической неудачи в присутствии A62V в ОТ. Показано, что A62V в ОТ на исходном уровне неочевидно снижает эффективность схем первой линии, содержащих TDF или TAF. Однако роль этой мутации заслуживает дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

- Stanford University HIV Drug Resistance Database. Available at: <http://hivdb.stanford.edu>
- Wensing A.M., Calvez V., Ceccherini-Silberstein F., Charpentier C., Günthard H.F., Paredes R., et al. 2022 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top. Antivir. Med.* 2022; 30(4): 559–74.
- Maldonado J.O., Mansky L.M. The HIV-1 reverse transcriptase A62V mutation influences replication fidelity and viral fitness in the context of multi-drug-resistant mutations. *Viruses*. 2018; 10(7): 376. DOI: <https://doi.org/10.3390/v10070376>
- Svarovskaia E.S., Feng J.Y., Margot N.A., Myrick F., Goodman D., Ly J.K., et al. The A62V and S68G mutations in HIV-1 reverse transcriptase partially restore the replication defect associated with the K65R mutation. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2008; 48(4): 428–36. DOI: <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31817bbe93>
- Rhee S.Y., Varghese V., Holmes S.P., Van Zyl G.U., Steegen K., Boyd M.A., et al. Mutational correlates of virological failure in individuals receiving a WHO-recommended Tenofovir-containing first-line regimen: an international collaboration. *EBioMedicine*. 2017; 18: 225–35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.024>
- Wagner T., Zuckerman N.S., Halperin T., Chemtob D., Levy I., Elbirt D., et al. Epidemiology and transmitted HIV-1 drug resistance among treatment-naïve individuals in Israel, 2010–2018. *Viruses*. 2021; 14(1): 71. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14010071>
- Zhukova A., Dunn D., Gascuel O. Modeling drug resistance emergence and transmission in HIV-1 in the UK. *Viruses*. 2023;

- 15(6): 1244. DOI: <https://doi.org/10.3390/v15061244>
8. Казеннова Е.В., Лаповок И.А., Лага В.Ю., Васильев А.В., Бобкова М.Р. Естественные полиморфизмы гена pol варианта ВИЧ-1 IDU-A. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2012; 4(4): 44–51. EDN: <https://elibrary.ru/pjowuj>
9. Кириченко А.А., Киреев Д.Е., Шлыкова А.В., Лопатухин А.Э., Лаповок И.А., Салеева Д.В. и др. Лекарственная устойчивость ВИЧ-1 у пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ в России (2013–2021 гг.). *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2021; 11(3): 53–62. DOI: <https://doi.org/10.18565/epidem.2021.11.3.53-62> EDN: <https://elibrary.ru/uqiumi>
10. Минздрав России. Клинические рекомендации «ВИЧ-инфекция у взрослых»; 2020. Available at: <http://rushiv.ru/wp-content/uploads/2022/11/KR79.pdf>
11. Clinicalinfo. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents with HIV. Available at: <https://clinicalinfo.hiv.gov/sites/default/files/guidelines/documents/adult-adolescent-arv/guidelines-adult-adolescent-arv.pdf>
12. Bbosa N., Kaleebu P., Ssemwanga D. HIV subtype diversity worldwide. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2019; 14(3): 153–60. DOI: <https://doi.org/10.1097/coh.0000000000000534>
13. Kirichenko A., Lapovok I., Baryshev P., van de Vijver D., van Kampen J.J.A., Boucher C.A.B., et al. Genetic features of HIV-1 integrase sub-subtype A6 predominant in Russia and predicted susceptibility to INSTIs. *Viruses*. 2020; 12(8): 838. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12080838>
14. Kuznetsova A., Lebedev A., Gromov K., Kazennova E., Zazzi M., Incardona F., et al. Pre-existing singleton E138A mutations in the reverse transcriptase gene do not affect the efficacy of first-line ART regimens using rilpivirine in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin. Case Rep.* 2022; 10(2): e05373. DOI: <https://doi.org/10.1002/ccr3.5373>
15. Суханова А.Л., Рудинский Н.И., Богословская Е.В., Круглова А.И., Башкирова Л.Ю., Цыганова Г.М. и др. Полиморфизм области генома, кодирующей протеазу и обратную транскриптазу, вариантов ВИЧ-1 подтипа А, распространенных на территории СНГ. *Молекулярная биология*. 2005; 39(6): 1063–71. EDN: <https://elibrary.ru/hsjkol>
16. Kolomeets A.N., Varghese V., Lemey P., Bobkova M.R., Shafer R.W. A uniquely prevalent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutation in Russian subtype A HIV-1 viruses. *Aids*. 2014; 28(17): F1–8. DOI: <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000000485>
17. Kirichenko A., Kireev D., Lopatukhin A., Murzakova A., Lapovok I., Saleeva D., et al. Prevalence of HIV-1 drug resistance in Eastern European and Central Asian countries. *PLoS One*. 2022; 17(1): e0257731. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257731>
18. Щемелев А.Н., Останкова Ю.В., Валутите Д.Э., Серикова Е.Н., Зуева Е.Б., Семенов А.В. и др. Риск неэффективности терапии первой линии у пациентов с ВИЧ в Северо-Западном федеральном округе России. *Инфекция и иммунитет*. 2023; 13(2): 302–8. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-RAO-2122> EDN: <https://elibrary.ru/ciclmh>
19. Costa B., Vale N. Efavirenz: history, development and future. *Biomolecules*. 2022; 13(1): 88. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom13010088>
20. Lv Z., Chu Y., Wang Y. HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV AIDS (Auckl.)*. 2015; 7: 95–104. DOI: <https://doi.org/10.2147/hiv.S79956>
21. Salvaña E.M.T., Dungca N.T., Arevalo G., Li K., Francisco C., Penalosa C., et al. HIV-1 subtype shift in the Philippines is associated with high transmitted drug resistance, high viral loads, and fast immunologic decline. *Int. J. Infect. Dis.* 2022; 122: 936–43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.06.048>

REFERENCES

1. Stanford University HIV Drug Resistance Database. Available at: <http://hivdb.stanford.edu>
2. Wensing A.M., Calvez V., Ceccherini-Silberstein F., Charpentier C., Günthard H.F., Paredes R., et al. 2022 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top. Antivir. Med.* 2022; 30(4): 559–74.
3. Maldonado J.O., Mansky L.M. The HIV-1 reverse transcriptase A62V mutation influences replication fidelity and viral fitness in the context of multi-drug-resistant mutations. *Viruses*. 2018; 10(7): 376. DOI: <https://doi.org/10.3390/v10070376>

4. Svarovskaia E.S., Feng J.Y., Margot N.A., Myrick F., Goodman D., Ly J.K., et al. The A62V and S68G mutations in HIV-1 reverse transcriptase partially restore the replication defect associated with the K65R mutation. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2008; 48(4): 428–36. DOI: <https://doi.org/10.1097/QAI.0b013e31817bbe93>
5. Rhee S.Y., Varghese V., Holmes S.P., Van Zyl G.U., Steegen K., Boyd M.A., et al. Mutational correlates of virological failure in individuals receiving a WHO-recommended Tenofovir-containing first-line regimen: an international collaboration. *EBioMedicine*. 2017; 18: 225–35. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.03.024>
6. Wagner T., Zuckerman N.S., Halperin T., Chemtob D., Levy I., Elbirt D., et al. Epidemiology and transmitted HIV-1 drug resistance among treatment-naïve individuals in Israel, 2010–2018. *Viruses*. 2021; 14(1): 71. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14010071>
7. Zhukova A., Dunn D., Gascuel O. Modeling drug resistance emergence and transmission in HIV-1 in the UK. *Viruses*. 2023; 15(6): 1244. DOI: <https://doi.org/10.3390/v15061244>
8. Kazennova E.V., Lapovok I.A., Laga V.Y., Vasilyev A.V., Bobkova M.R. Natural polymorphisms of HIV-1 IDU-A variant pol gene. *VICh-infektsiya i immunosuppressii*. 2012; 4(4): 44–51. EDN: <https://elibrary.ru/pjowuj> (in Russian)
9. Kirichenko A.A., Kireev D.E., Shlykova A.V., Lopatukhin A.E., Lapovok I.A., Saleeva D.V., et al. HIV-1 drug resistance in patients with virological inefficiency on ART in Russia in 2013–2021. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2021; 11(3): 53–62. DOI: <https://doi.org/10.18565/epidem.2021.11.3.53-62> EDN: <https://elibrary.ru/uqiuni> (in Russian)
10. Ministry of Health of the Russian Federation. Clinical Guidelines «HIV Infection in Adults»; 2020. Available at: <http://rushiv.ru/wp-content/uploads/2022/11/KR79.pdf> (in Russian)
11. Clinicalinfo. Guidelines for the Use of Antiretroviral Agents in Adults and Adolescents with HIV. Available at: <https://clinicalinfo.hiv.gov/sites/default/files/guidelines/documents/adult-adolescent-arv/guidelines-adult-adolescent-arv.pdf>
12. Bbosa N., Kaleebu P., Ssemwanga D. HIV subtype diversity worldwide. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2019; 14(3): 153–60. DOI: <https://doi.org/10.1097/coh.0000000000000534>
13. Kirichenko A., Lapovok I., Baryshev P., van de Vijver D., van Kampen J.J.A., Boucher C.A.B., et al. Genetic features of HIV-1 integrase sub-subtype A6 predominant in Russia and predicted susceptibility to INSTIs. *Viruses*. 2020; 12(8): 838. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12080838>
14. Kuznetsova A., Lebedev A., Gromov K., Kazennova E., Zazzi M., Incardona F., et al. Pre-existing singleton E138A mutations in the reverse transcriptase gene do not affect the efficacy of first-line ART regimens using rilpivirine in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin. Case Rep.* 2022; 10(2): e05373. DOI: <https://doi.org/10.1002/ccr3.5373>
15. Sukhanova A.L., Rudinskii N.I., Bogoslovskaya E.V., Kruglova A.I., Bashkirova L.Yu., Tsyganova G.M., et al. Polymorphism of the genome region coding for protease and reverse transcriptase in HIV type 1 subtype a variants prevailing in CIS countries. *Molekulyarnaya biologiya*. 2005; 39(6): 934–41. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11008-005-0115-8> EDN: <https://elibrary.ru/ljarpmp>
16. Kolomeets A.N., Varghese V., Lemey P., Bobkova M.R., Shafer R.W. A uniquely prevalent nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor resistance mutation in Russian subtype A HIV-1 viruses. *Aids*. 2014; 28(17): F1–8. DOI: <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000000485>
17. Kirichenko A., Kireev D., Lopatukhin A., Murzakova A., Lapovok I., Saleeva D., et al. Prevalence of HIV-1 drug resistance in Eastern European and Central Asian countries. *PLoS One*. 2022; 17(1): e0257731. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257731>
18. Shchemelev A.N., Ostankova Yu.V., Valutite D.E., Serikova E.N., Zueva E.B., Semenov A.V., et al. Risk assessment of first-line treatment failure in untreated HIV patients in Northwestern federal district of the Russian Federation. *Infektsiya i immunitet*. 2023; 13(2): 302–8. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-RAO-2122> EDN: <https://elibrary.ru/ciclmu> (in Russian)
19. Costa B., Vale N. Efavirenz: history, development and future. *Biomolecules*. 2022; 13(1): 88. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom13010088>
20. Lv Z., Chu Y., Wang Y. HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV AIDS (Auckl.)*. 2015; 7: 95–104. DOI: <https://doi.org/10.2147/hiv.S79956>
21. Salvaña E.M.T., Dungca N.T., Arevalo G., Li K., Francisco C., Penalosa C., et al. HIV-1 subtype shift in the Philippines is associated with high transmitted drug resistance, high viral loads, and fast immunologic decline. *Int. J. Infect. Dis.* 2022; 122: 936–43. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.06.048>

Информация об авторах:

Ожмегова Екатерина Никитична  – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории вирусов лейкозов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: ozhmegova.eka@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-3110-0843>

Кузнецова Анна Игоревна – канд. биол. наук, заведующая лабораторией вирусов лейкозов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: a-muznikova@list.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3110-0843>

Лебедев Алексей Владимирович – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории вирусов лейкозов подразделения Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: lebedevalsha236@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-6787-9345>

Антонова Анастасия Александровна – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории вирусов лейкозов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: anastaseika95@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9180-9846>

Ким Кристина Вячеславовна – младший научный сотрудник лаборатории вирусов лейкозов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: kimsya99@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-4150-2280>

Мунчак Яна Михайловна – младший научный сотрудник лаборатории вирусов лейкозов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: yanka.zabavnaa@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4792-8928>

Туманов Александр Сергеевич – научный сотрудник лаборатории вирусов лейкозов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: desep@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6221-5678>

Казеннова Елена Валерьевна – д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусов лейкозов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: kazennova@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7912-4270>

Участие авторов: Ожмегова Е.Н. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Кузнецова А.И. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Лебедев А.В. – интерпретация данных; Антонова А.А. – интерпретация данных; Ким К.В. – интерпретация данных; Мунчак Ю.М. – интерпретация данных; Туманов А.С. – интерпретация данных; Казеннова Е.В. – окончательное одобрение статьи к публикации.

Information about the authors:

Ekaterina N. Ozhmegova  – PhD, researcher at the laboratory of leukemia viruses of the department of the Institute of Virology named after. DI. Ivanovsky, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: ozhmegova.eka@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-3110-0843>

Anna I. Kuznetsova – PhD, Head of the Laboratory of Leukemia Viruses of the Department of the Institute of Virology named after. DI. Ivanovsky, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: a-myznikova@list.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3110-0843>

Alexey V. Lebedev – PhD, researcher at the Laboratory of Leukemia Viruses of the Department of the Institute of Virology named after. DI. Ivanovsky, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: lebedevalesha236@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-6787-9345>

Anastasia A. Antonova – PhD, researcher at the Laboratory of Leukemia Viruses of the Department of the Institute of Virology named after. DI. Ivanovsky, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: anastaseika95@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9180-9846>

Kristina V. Kim – junior researcher at the laboratory of leukemia viruses, division of the Institute of Virology named after. DI. Ivanovsky, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: kimsya99@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-4150-2280>

Yana M. Munchak – junior researcher at the laboratory of leukemia viruses, division of the Institute of Virology named after. DI. Ivanovsky, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: yanka.zabavnaya@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4792-8928>

Alexander S. Tumanov – researcher at the laboratory of leukemia viruses of the department of the Institute of Virology named after. DI. Ivanovsky, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: desep@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6221-5678>

Elena V. Kazennova – doctor of science, leading researcher at the Laboratory of Leukemia Viruses of the Department of the Institute of Virology named after. DI. Ivanovsky National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: kazennova@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7912-4270>

Contribution: Ozhmegova E.N. – the study concept and design, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Kuznetsova A.I. – the study concept and design, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Lebedev A.V. – interpretation of the data; Antonova A.A. – interpretation of the data; Kim K.V. – interpretation of the data; Munchak Y.M. – interpretation of the data; Tumanov A.S. – interpretation of the data; Kazennova E.V. – final approval of the article for publication.

Received 21 February 2024
Accepted 15 April 2024
Published 30 June 2024

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-231>

© ЧЕРНЫШЕВ Р.С., ИГОЛКИН А.С., ШОТИН А.Р., ЗИНЯКОВ Н.Г., КОЛБИН И.С., САДЧИКОВА А.С., ЛАВРЕНТЬЕВ И.А., ГРУЗДЕВ К.Н., МАЗЛУМ А., 2024



Пространственно-временной кластерный анализ циркуляции вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus*) в Калининградской области на основе трех генетических маркеров

Чернышев Р.С., Иголкин А.С., Шотин А.Р., Зиняков Н.Г., Колбин И.С., Садчикова А.С., Лаврентьев И.А., Груздев К.Н., Мазлум А.✉

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

Резюме

Введение. Стремительное распространение африканской чумы свиней (АЧС) в Калининградской области обуславливает необходимость использования методов молекулярной эпизоотологии для определения динамики и вектора распространения инфекции в данном субъекте России.

Цель работы – установить характер однонуклеотидного полиморфизма генов *K145R*, *O174L*, *MGF 505-5R* у изолятов вируса АЧС, выделенных в Калининградской области, и изучить циркуляцию возбудителя в странах Восточной Европы методом субгенотипирования и пространственно-временного кластерного анализа.

Материалы и методы. В качестве образцов биологического материала использовали пробы крови от живых и органов от павших домашних свиней и диких кабанов, отобранные в Калининградской области в 2017–2022 гг. Выделение вируса АЧС и идентификацию изолятов проводили в первичной культуре клеток костного мозга свиньи. Подготовку ампликонов целевых маркерных областей генома выполняли методом ПЦР с электрофоретической детекцией и последующей экстракцией фрагментов из агарозного геля. Секвенирование осуществляли по методу Сэнгера.

Результаты. Установлена циркуляция на территории субъекта-эксклава Российской Федерации вируса АЧС, принадлежащего двум генетическим кластерам: эпизоотическому (*K145R-III*, *MGF 505-5R-II*, *O174L-I* – 94,3% от изученных изолятов) и спорадическому (*K145R-II*, *MGF 505-5R-II*, *O174L-I* – 5,7%).

Заключение. Необходимо совершенствование молекулярно-эпизоотологического мониторинга генетических вариантов вируса АЧС в странах евро-азиатского континента на основе маркерных фрагментов генома внутри генотипа II, что позволит проводить наиболее детальный анализ распространения АЧС.

Ключевые слова: африканская чума свиней; генетические маркеры распространения; пространственно-временной анализ; генетические варианты; Калининградская область

Для цитирования: Чернышев Р.С., Иголкин А.С., Шотин А.Р., Зиняков Н.Г., Колбин И.С., Садчикова А.С., Лаврентьев И.А., Груздев К.Н., Мазлум А. Пространственно-временной кластерный анализ циркуляции вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus*) в Калининградской области на основе трех генетических маркеров. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(3): 241–254. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-231> EDN: <https://elibrary.ru/lbevz>

Финансирование. Исследование выполнено за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

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

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

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-231>

Spatio-temporal clustering of African swine fever virus (Asfarviridae: *Asfivirus*) circulating in the Kaliningrad region based on three genome markers

Roman S. Chernyshev, Alexey S. Igolkin, Andrey R. Shotin, Nikolay G. Zinyakov, Ivan S. Kolbin, Anastasia S. Sadchikova, Ivan A. Lavrentev, Konstantin N. Gruzdev, Ali Mazloum[✉]

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

Abstract

Introduction. The rapid spread of African swine fever in the Kaliningrad region makes it necessary to use the methods of molecular epidemiology to determine the dynamics and direction of ASF spread in this region of Russia. **The aim** of the study was to determine single nucleotide polymorphisms within molecular markers *K145R*, *O174L* and *MGF 505-5R* of ASFVs isolated in Kaliningrad region and to study the circulating of the pathogen in European countries by subgenotyping and spatio-temporal clustering analysis.

Materials and methods. Blood samples from living domestic pigs and organs from dead domestic pigs and wild boars, collected in the Kaliningrad region between 2017 and 2022 were used. Virus isolation was carried out in porcine bone-marrow primary cell culture. Amplicons of genome markers were amplified by PCR with electrophoretic detection and subsequent extraction of fragments from agarose gel. Sequencing was performed using the Sanger method.

Results. The circulation of two genetic clusters of ASFV isolates on the territory of the Kaliningrad has been established: epidemic (K145R-III, MGF 505-5R-II, O174L-I – 94.3% of the studied isolates) and sporadic (K145R-II, MGF 505-5R-II, O174L-I – 5.7%).

Conclusion. The broaden molecular genetic surveillance of ASFV isolates based on sequencing of genome markers is necessary in the countries of the Eurasian continent to perform a more detailed analysis of ASF spread between countries and within regions.

Keywords: African swine fever; genome markers of spread; spatio-temporal analysis; genetic variants, Kaliningrad region

For citation: Chernyshev R.S., Igolkin A.S., Shotin A.R., Zinyakov N.G., Kolbin I.S., Sadchikova A.S., Lavrentev I.A., Gruzdev K.N., Mazloum A. Spatio-temporal clustering of African swine fever virus (Asfarviridae: *Asfivirus*) circulating in the Kaliningrad region based on three genome markers. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(3): 241–254. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-231> EDN: <https://elibrary.ru/lbevvpz>

Funding. The study was funded by the Federal Centre for Animal Health as a part of research activities «Veterinary Welfare».

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

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). The research protocol was approved by the Bioethics Commission of the Federal State Budgetary Institution «ARRIAH» (protocol b/n of30.04.2020).

Введение

Масштабное трансграничное распространение африканской чумы свиней (АЧС) на территории Евразии требует новых подходов к изучению циркуляции вируса. С этими целями рекомендовано проведение молекулярно-эпизоотологической кластеризации и мультигенного анализа вновь выделенных изолятов [1]. Вследствие значительной длины генома возбудителя (189 т.п.н.) возможно использование различных маркеров распространения в пространственно-временном исследовании. Большинство маркеров определяются при выявлении однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) или различий в числе тандемных повторов (TRS), наблюдаемых в сравнительном анализе полногеномных последовательностей изолятов вируса АЧС, выделенных из биологического материала

ла от инфицированных животных (домашних свиней или диких кабанов) [2].

Мишенью для генотипирования вируса АЧС является нуклеотидная последовательность длиной 475 п.н. С-терминальной области гена *B646L*, которая традиционно использовалась для идентификации 24 генотипов [3, 4]. Вспышки АЧС в Европе и Азии вызваны генотипом II, за исключением энзоотичной ситуации на острове Сардиния (Италия), где генотип I регистрировался с 1978 г., и Китайской Народной Республики, на территории которой в 2021 г. установлен эпизоотический очаг среди домашних свиней, вызванный генотипом I [5, 6]. В 2023 г. в Китае впервые описан рекомбинантный вариант между I и II генотипами с 20 сайтами рекомбинации [7].

В связи с преобладающей циркуляцией генотипа II вируса АЧС в Евразии и обнаружением различных

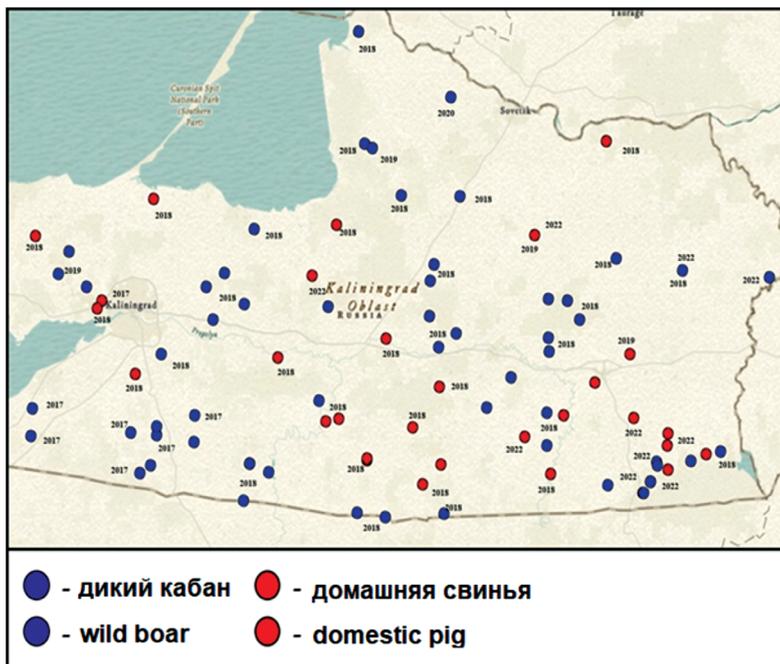


Рис. 1. Распространение АЧС на территории Калининградской области (2017–2022 гг.).
Fig. 1. Spread of ASF in the Kaliningrad region (2017–2022).

генетических вариантов, С. Gallardo и соавт. (2023) рекомендован метод, позволяющий на основе различных маркеров выделить 24 кластера (субгенотипа, генетических группы) распространения [1]. А. Mazloum и соавт. (2023) предложено 6 основных (локус *B646L*, центральная варибельная область (CVR) гена *B602L*, межгенные области *I73R/I329L* и *MGF 505-9R/10R*, гены *K145R* и *O174L*) и 7 альтернативных (межгенные области *A179L/A137R* и *C315R/C147L*, локусы *I267L*, *MGF 505-5R*, *MGF 110-7L*, *MGF 505-9R*, *MGF 360-10L*) геномных маркеров для дифференциации изолятов, принадлежащих генотипу II [2].

Кластерный генетический анализ распространения – сравнительно новый и поисковый подход для изучения АЧС в Российской Федерации. В связи с этим наиболее интересным показателем объектом исследования является эпизоотия на территории Калининградской области.

Калининградская область – субъект-эксклав России, географически расположенный в Восточной Европе. На юге граничит с Польшей, на севере и востоке – с Литвой, признанными неблагополучными по АЧС с 2014 г. [8, 9]. Первые случаи АЧС в Калининградской области отмечены в популяции дикого кабана в начале ноября 2017 г. В течение ноября–декабря 2017 г. на территории региона нотифицировано 6 эпизоотических очагов среди дикого кабана (Багратионовский район) и 1 – среди домашних свиней в личном подсобном хозяйстве (ЛПХ) гражданина, проживающего в дачном поселке Сосновка (Полесский район). В зимне-весенний период 2018 г. на территории субъекта в приграничных с Польшей районах обнаружены 6 трупов кабанов с лабораторно подтвержденным диагнозом на АЧС. С июня по сентябрь 2018 г. инфекция широко распространи-

лась среди домашних свиней в ЛПХ и нескольких свинокомплексах Калининградской области, затронув 7 ранее благополучных районов: Гвардейский (п. Суворово), Правдинский (п. Пруды, п. Новобийское, п. Белый Яр, п. Извилино, п. Красное, п. Сергеевка, п. Белкино), Черняховский (п. Пеньки, п. Глушково) и др. С ноября 2018 г. по январь 2020 г. регистрировали единичные случаи болезни [10]. В конце июля 2022 г. после 2,5 лет отсутствия вспышек зарегистрирован эпизоотический очаг АЧС в ЛПХ Нестеровского района. Всего за 2022 г. нотифицировано 16 случаев. За весь период эпизоотии на территории Калининградской области официально подтверждено 87 случаев АЧС (56 у дикого кабана и 31 у домашних свиней) (рис. 1)¹.

Ранее проведенные исследования по анализу 9 полногеномных последовательностей изолятов, выделенных в 2017–2019 гг. в Калининградской области, показали клональное развитие вспышек АЧС [11]. Так, в начале эпизоотии на территории данного региона произошла дополнительная мутация в гене *K145R*. Длительная циркуляция генетического варианта вируса с уникальным ОНП среди восприимчивых животных (диких кабанов) сформировала дивергентный пространственно-временной кластер (пул) АЧС в восточной Европе.

Энзоотичная ситуация по АЧС в Калининградской области России и дискуссия о происхождении возбудителя в восточноевропейских государствах обуслов-

¹Россельхознадзор. Эпизоотическая ситуация по АЧС в Российской Федерации, 2007–2024 г. Available at: <https://fsvps.gov.ru/wp-content/uploads/2024/02/карта-вспышек-за-2007-2024-на-05.02.png>

ливают необходимость привлечения методов молекулярной эпизоотологии в расследование вспышек.

Цель исследования – установить распространение генетических вариантов *K145R*, *MGF 505-5R*, *O174L* у статистически значимого числа изолятов вируса АЧС, циркулирующих на территории Калининградской области, и провести оценку эпизоотической ситуации на основе молекулярной кластеризации.

Материалы и методы

Изоляты вируса АЧС. Биологическим материалом для выделения вируса служили пробы органов (трубчатые кости, селезенка, лимфатические узлы) от павших домашних и диких свиней, а также кровь от живых домашних свиней, отобранные на территории Калининградской области Российской Федерации в 2017–2022 гг. и оказавшиеся положительными при исследовании методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Выделение вируса проводили в первичной культуре клеток костного мозга свињи (КМС), полученной от доноров на договорной основе [12]. После идентификации 26 изолятов их накапливали в культуре клеток КМС в титре не менее $6,5 \lg \text{ГДЕ}_{50}/\text{см}^3$.

Выделение ДНК и амплификация целевых фрагментов. Экстракцию тотальной ДНК выполняли из вирусодержащего культурального материала с использованием набора реагентов «ДНК-сорб В» (ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Амплификацию нуклеотидных участков генов *K145R*, *MGF 505-5R*, *O174L* осуществляли методом ПЦР с электрофоретической детекцией согласно ранее разработанному протоколу [13]. Выделение фрагментов из слайсов агарозного геля проводили с применением набора GeneJET Gel Extraction Kit (ThermoFisher Scientific, США).

Секвенирование. Реакцию проводили с использованием наборов Big Dye Terminator Kit версия 1.1 или 3.1 (Applied Biosystems, США) на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130/3130xl (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя.

Выравнивание и филогенетический анализ. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей и сравнительный анализ с другими изолятами, импортированными из Genbank (**приложение**), выполняли с применением алгоритма CLUSTAL W в программе Bioedit v. 7.2.5. При анализе учитывали последовательности целевых генов у 9 изолятов вируса АЧС из Калининградской области, опубликованных ранее [11]. Филогенез изолятов изучали с использованием компьютерной программы Mega X по рекомендованной модели методом присоединения соседей (Neighbor-Joining) с Bootstrap 1000 итерациями начальной загрузки [14].

Графическое отображение молекулярно-эпизоотических карт осуществляли в программе ArcGIS.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 Ju-

ly 2010). Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике ФГБУ «ВНИИЗЖ» (протокол № Б-3/2021 от 24.05.2021).

Результаты

K145R. По результатам секвенирования по Сэнгеру получен фрагмент гена *K145R* (длиной 501 п.н.) для всех 26 изолятов. Выявлено, что все идентифицированные изоляты из Калининградской области (35) имеют точечные мутации (замены) в данном фрагменте и отличаются от референтного штамма *Georgia 2007/1* (NC_044959.2) (**рис. 2 а**).

Как видно из **рис. 2 (а)**, на основе нуклеотидного выравнивания частичной последовательности гена *K145R* все исследуемые изоляты вируса АЧС можно разделить на три генетических варианта: *K145R-I*, аналогичный *Georgia 2007/1*; *K145R-II* с одной заменой $C > A$ в положении 434; *K145R-III* с двумя заменами ($C > T$ в положении 291 и $C > A$ в положении 434). Установлено, что большинство – 33 из 35 (94,3%) – изолятов, выделенных в исследуемом регионе, отнесены к генетическому варианту *K145R-III*, исключительному для этого региона. При этом 2 (5,7%) изолята *ASFV/Kaliningrad/DP2017/15355* и *ASFV/Kaliningrad/DP2022/9201* относились к *K145R-II*, ранее не регистрируемому варианту на всей территории России и характерному для стран Восточной Европы (Польша, Литва, Украина, Германия). Пространственно-временной анализ распространения вируса АЧС на основе маркера *K145R* показан на **рис. 3 (а)**.

O174L. Анализ последовательностей в 673 п.н., полученных при секвенировании фрагмента гена *O174L*, показал, что ни один (100%) из изолятов, выделенных в Калининградской области, не имел 14-нуклеотидной инсерции в положении 50–63 гена *O174L* и был идентичен референс-последовательности штамма *Georgia 2007/1* (**рис. 2 б**). Абсолютная энзоотичность варианта *O174L-I* вируса АЧС на территории Калининградской области показана на **рис. 3 (б)**.

MGF 505-5R. На основании анализа последовательности фрагмента длиной 641 п.н. у всех исследуемых образцов показано, что 100% изученных в настоящем исследовании изолятов относились к восточноевропейскому варианту *MGF 505-5R-II*, для которого была характерна несинонимичная замена $G > A$ в позиции 988 гена при сравнении с референтным штаммом II генотипа *Georgia 2007/1* (**рис. 2 в**). Географическое распространение геновариантов *MGF 505-5R* вируса АЧС в Европе представлено на **рис. 3 (в)**.

Филогенетическое родство изолятов вируса АЧС из Калининградской области РФ, Польши, Литвы, Германии, Румынии и Украины представлено на укорененном дереве, выполненном комплексно на основе конкатенированной последовательности 3 маркеров: *K145R*, *MGF 505-5R* и *O174L* (**рис. 4**).

Как показано на **рис. 4**, идентифицировано две группы внутри генотипа II. Группа 1 полностью гомологична штамму *Georgia 2007/1*. Группа 2 включает 3 подгруппы: собственно 2 (соответствует генетическим вариантам *K145R-I*, *O174L-II*); 2.1 (*K145R-II*,



Рис. 2. Множественное нуклеотидное выравнивание маркерных фрагментов генов *K145R* (а), *O174L* (б) и *MGF 505-5R* (в) изолятов вируса АЧС, полученных при секвенировании по методу Сэнгера.

На рисунках показан пример выявленных ОНП или TRS и их позиции в открытой рамке считывания.

Fig. 2. Multiple nucleotide alignment of genome marker fragments *K145R* (a), *O174L* (b) and *MGF 505-5R* (c) of ASFV isolates obtained by Sanger sequencing.

The figures show an example of identified SNPs or TRSs and their position in the open reading frame.

MGF 505-5R-II, O174L-I или O174L-II) и 2.2 (K145R-III, MGF 505-5R-II, O174L-I). Для Калининградской области преимущественно характерна группа 2.2 (94,3%). В форме спорадии зарегистрирована группа 2.1 (5,7%).

Эпизоотологические данные с указанием географической локации места отбора образца, наименования изолята, даты вспышки, источника возбудителя инфекции, маркерной генетической группы представлены в **таблице** и приложении.

Обсуждение

Проведение в ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир) референтных диагностических исследований на АЧС обеспечило изучение изолятов, выделенных из биологического материала от домашних и диких свиней, отобранного в 35 (40,2%) очагах АЧС из 87 нотифицированных на территории Калининградской области (последовательности опубликованы в Genbank, номе-

ра доступа представлены в приложении). Большой размер статистической выборки позволяет использовать полученные результаты точечного (локального) секвенирования по Сэнгеру маркерных областей генома для анализа циркуляции вируса и формирования пространственно-временных генетических кластеров в субекте-эксclave.

Начиная с 2016 г., вирус АЧС II генотипа, циркулирующий в странах Восточной Европы (Польша, Литва, Украина и др.), а также в Калининградской области РФ, по данным сравнительного анализа с исходным штаммом *Georgia 2007/1*, обладает нуклеотидной гетерогенностью [1]. Точечные мутации в открытых рамках считывания и межгенных областях (замены/инсерции/делеции) у вируса АЧС незначительно влияют на культуральные и иммунобиологические свойства [15–17]. При этом прикладное значение генетических изменений в молекулярной эпизоотологии

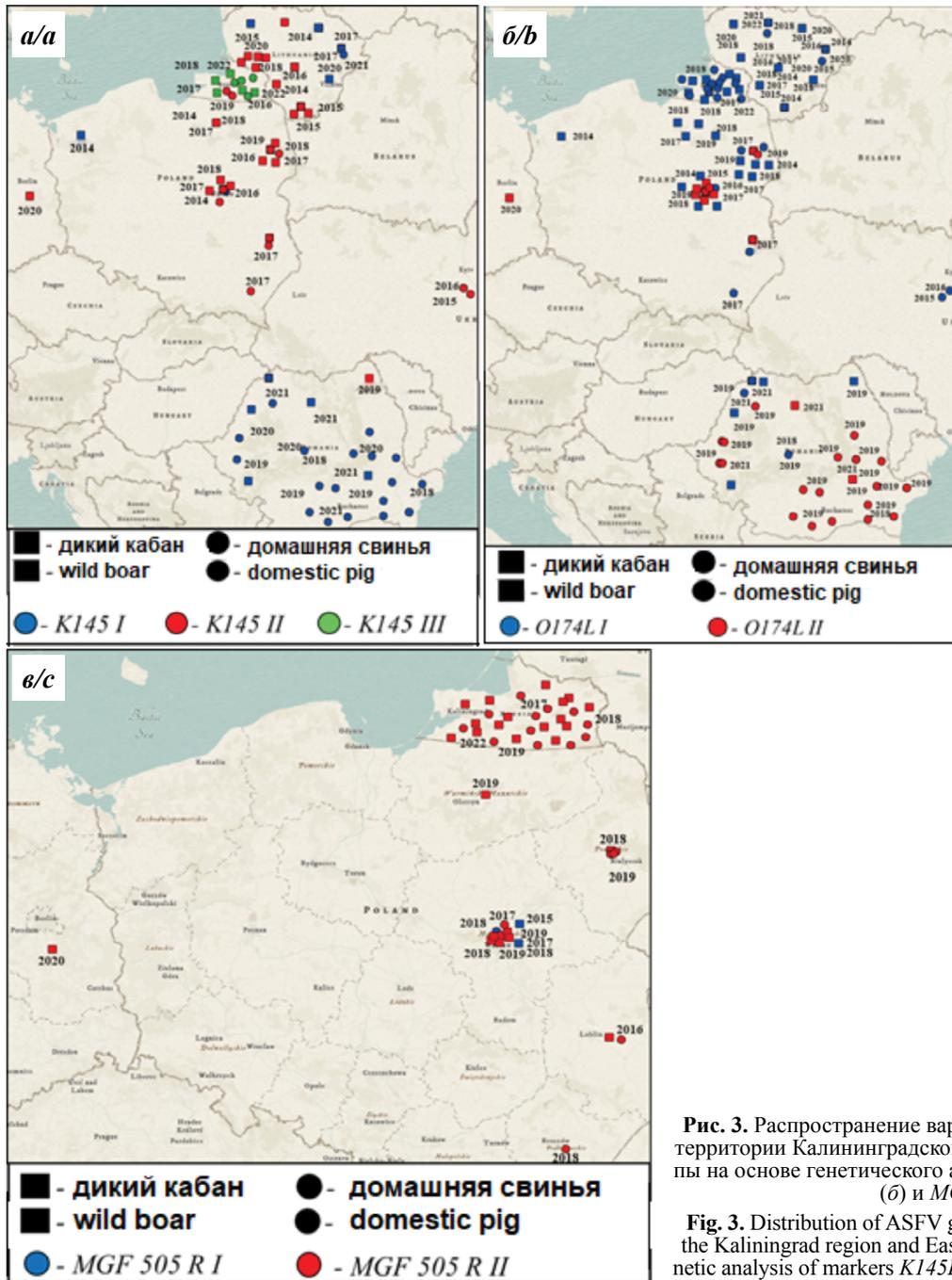


Рис. 3. Распространение вариантов вируса АЧС генотипа II на территории Калининградской области и стран Восточной Европы на основе генетического анализа маркеров *K145R* (а), *O174L* (б) и *MGF 505-5R* (в).

Fig. 3. Distribution of ASFV genotype II variants in the territory of the Kaliningrad region and Eastern European countries based on genetic analysis of markers *K145R* (a), *O174L* (b) and *MGF 505-5R* (c).

АЧС достаточно велико и постоянно актуализируется [18]. Проведение комплексного анализа таких локусов, как *K145R*, *MGF 505-5R*, *O174L*, *MGF 110-7L*, *IGR I73R/I329L*, необходимо для изучения кластеров вируса АЧС в Европе.

Ранее представленные данные показывают, что формирование генетической группы *K145R-II*, *MGF 505-5R-II*, *MGF 110-7L-II* началось в 2016 г. на территории Украины и Польши [19, 20]. Пространственно-временной массив этого кластера наблюдался в период с 2016 по 2020 г. в Польше, с июля 2017 г. по март 2022 г. в Литве. Параллельно в 2016 г. в Польше был зарегистрирован вариант

O174L-II с инсерцией в одноименном гене, которому всегда соответствует *MGF 505-5R-II* [21, 22]. При этом в отдельных случаях *O174L-II* сочетается с *K145R-II* (2016–2020 гг.), а в других – с *K145R-I* (2018–2019 гг.). Однако в Литве, Украине и Калининградской области *O174L-II* не зарегистрирован [1, 11, 20]. Десять вспышек АЧС в Румынии (2019 г.) соответствуют группе *O174L-II*, *K145R-I*, и лишь один изолят в 6 км от украинской границы отнесен к *K145R-II* и *O174L-I* [1]. В дальнейшем аналогичные изменения в геноме (*O174L-II*, *K145R-II*) отмечены у изолята вируса АЧС, выделенного от дикого кабана в Германии (2020 г.) [2].

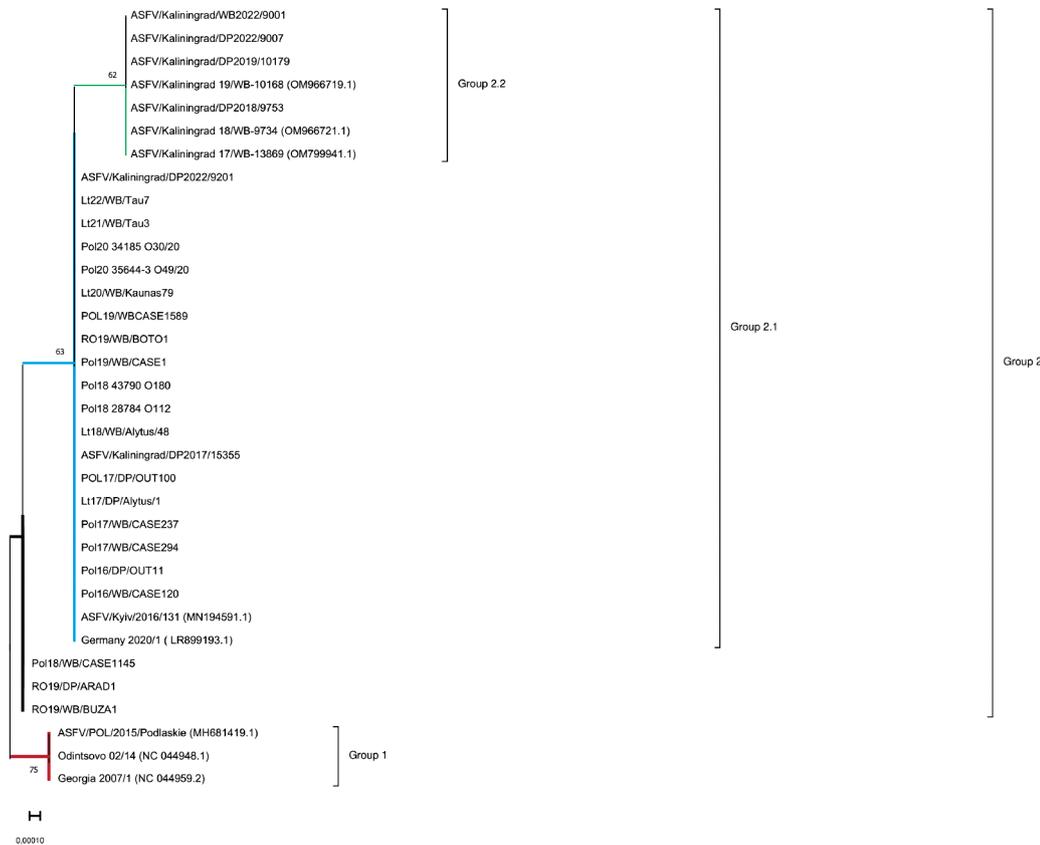


Рис. 4. Дендрограмма, построенная методом присоединения соседей (Neighbor-joining) и отображающая филогенетическое родство изолятов вируса АЧС из Восточной Европы на основе кластерного анализа.

Fig. 4. Neighbor-joining dendrogram showing phylogenomic of ASFV isolates from eastern Europe based on clustering analysis.

Вариант MGF 505-5R-II характерен для изолятов с K145R-II или K145R-III и никогда не встречался у вируса АЧС с K145R-I. Наоборот, изоляты с MGF 505-5R-I параллельно принадлежали K145R-I [21]. Появление и циркуляция вируса, принадлежащего вариантам K145R-I, O174L-II в Польше и Румынии в 2018–2019 гг., могут быть связаны с точечной репарацией гена *K145R*, имеющей тенденцию для вируса АЧС из-за наличия Pol X ДНК-полимеразы, или рекомбинацией [7, 23]. Для более глубокого изучения молекулярной эволюции вируса АЧС на территории Румынии необходимо полногеномное секвенирование изолятов с анализом гена *MGF 505-5R*.

Следует отметить, что синонимичная замена G на A в позиции 60 гена *MGF 110-7L* всегда сочеталась с вышеописанным ОНП в области MGF 505-5R [1, 11, 19, 20]. В связи с этим экономически целесообразно исследование одного из этих локусов на выбор [2].

В Калининградской области России в период с 2017 по 2022 г. сформировался уникальный кластер K145R-III, MGF 505-5R-II, O174L-I вируса АЧС. При этом замена в положении 434 гена *K145R* соответствовала обоим вариантам K145R-III и K145R-II. Однако K145R-III имел дополнительную трансверсию в позиции 291 исходного гена, следовательно являлся дочерним геновариантом от материнского K145R-II.

В проведенном исследовании установлено, что изолят *ASFV/Kaliningrad/DP2017/15355*, впервые

выделенный из биоматериала от домашних свиней в изучаемом регионе (декабрь 2017 г., Полесский р-н, п. Сосновка), относится к K145R-II, несмотря на то что первая вспышка АЧС в регионе была вызвана вирусом с K145R-III (изолят *ASFV/Kaliningrad 17/WB-13869*, полученный из биоматериала от павшего дикого кабана, обнаруженного в ноябре 2017 г. на территории Багратионовского района) [11]. Интересно, что первые случаи АЧС в Литве, вызванные вирусом с K145R-II, были зарегистрированы в июле 2017 г., а Польша и Украина в 2017 г. признаны стационарно неблагополучными [24].

В 2018–2019 гг. на территории Калининградской области зарегистрировано 65 вспышек АЧС, а все изоляты принадлежали геногруппе K145R-III, MGF 505-5R-II и O174L-I. При этом вариант K145R-II не получил распространения ввиду успешной ликвидации вспышки 2017 г. в ЛПХ гражданина Полесского района, что лимитировало переход вируса АЧС в дикую фауну. Таким образом, временем образования уникальной для региона генетической группы является осень 2017 г., а системой – европейский кабан *Sus scrofa*. При этом возможность заноса вируса АЧС в Калининградскую область в 2017 г. из других регионов России, где никогда до этого не регистрировали варианты, отличные по таким маркерам, как *K145R*, *MGF 505-5R* и *MGF 110-7L*, от штамма *Georgia 2007/1*, маловероятна [25, 26].

Таблица. Молекулярно-эпизоотологические данные об изолятах вируса АЧС, выделенных в Калининградской области 2017–2022 гг.

Table. Molecular and epizootological data on ASFVs isolated in the Kaliningrad region from 2017 to 2022

№	Наименование изолята Isolate	Место отбора образцов Place of collection	Дата регистра- ции вспышки Date of outbreak registration	Источник возбудителя инфекции Source of isolation	K145R	MGF 505-5R	O174L
1	ASFV/Kaliningrad/DP2017/15355	ЛПХ, п.Сосновка, Полесский район Private household plot, Sosnovka village, Polesky district	18.11.2017	Домашняя свинья Domestic pig	II	II	I
2	ASFV/Kaliningrad/WB2018/9737	Охотничье хозяйство, Гвардейский район Hunting farm, Gvardeysky district	03–04.07.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
3	ASFV/Kaliningrad/WB2018/9767	Лесной массив, п. Ильичево, Полесский район Forest area, Ilyichevo village, Polesky district	07–08.07.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
4	ASFV/Kaliningrad/DP2018/9716	ЛПХ, Правдинский район, п. Сергеевка Private household plot, Pravdinsky district, Sergeevka village	22.06.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
5	ASFV/Kaliningrad/DP2018/12537	КФХ, Неманский район, п. Жилино, ул. Дорожная, 1 Peasant farm, Nemansky district, Zhilino village, st. Dorozhnaya, 1	06–10.07.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
6	ASFV/Kaliningrad/WB2018/12513	Охотничье хозяйство, Черняховский район Hunting farm, Chernyakhovsky district	18.07.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
7	ASFV/Kaliningrad/DP2018/9729	ЛПХ, Правдинский район, п. Белкино Private household plot, Pravdinsky district, Belkino village	22.06.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
8	ASFV/Kaliningrad/WB2018/9732	п. Жаворонково, Черняховский район Zhavoronkovo village, Chernyakhovsky district	25.06.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
9	ASFV/Kaliningrad/DP2018/9728	ЛПХ, Черняховский район, п. Пеньки Private household plot, Chernyakhovsky district, Penki village	22.06.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
10	ASFV/Kaliningrad/WB2017/16199	Лесной массив, п. Новоселово, Багратионовский район Forest, Novoselovo settlement, Bagrationovsky district	27.11.2017	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
11	ASFV/Kaliningrad/WB2018/12518	Лесной массив, п. Краснопо- лье, Гусевский район Forest, Krasnopolye village, Gusevsky district	30.07– 07.08.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
12	ASFV/Kaliningrad/DP2018/9723	ЛПХ, Правдинский район, п. Белый Яр Private household plot, Pravdinsky district, Bely Yar village	22.06.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
13	ASFV/Kaliningrad/WB2018/14814	Охотничье хозяйство, Гурьев- ский район, п. Курганы Hunting farm, Guryevsky district, Kurgany village	24.08– 03.09.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
14	ASFV/Kaliningrad/DP2018/6809	ЛПХ, Правдинский район, п. Ново-Бийское Private household plot, Pravdinsky district, Novo-Biiskoye village	08.06.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I

Продолжение таблицы см. на стр. 249

№	Наименование изолята Isolate	Место отбора образцов Place of collection	Дата регистрации вспышки Date of outbreak registration	Источник возбудителя инфекции Source of isolation	<i>K145R</i>	<i>MGF 505-5R</i>	<i>O174L</i>
15	ASFV/Kaliningrad/DP2018/9753	Свинокомплекс IV компартмента, Правдинский район, п. Ново-Бийское Pig farm of IV compartment, Pravdinsky district, Novo-Biiskoye village	10.07.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
16	ASFV/Kaliningrad/DP2018/9724	ЛПХ, Правдинский район, п. Пруды Private household plot, Pravdinsky district, Prudy village	22.06.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
17	ASFV/Kaliningrad/DP2018/9741	Племенной завод, Славский район Breeding farm, Slavsky district	10.07.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
18	ASFV/Kaliningrad/DP2018/9727	ЛПХ, Правдинский район, п. Красное Private household plot, Pravdinsky district, Krasnoe village	22.06.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
19	ASFV/Kaliningrad/DP2018/12528	Свинокомплекс III компартмента, г. Калининград, пгт. им. А. Космодемьяненко Pig farm of compartment III, Kaliningrad, town. Them. A. Kosmodemyanenko	06–10.07.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
20	ASFV/Kaliningrad/DP2018/14812	ЛПХ, Гусевский район, п. Маяковское Private household plot, Gusevsky district, Mayakovskoye village	21–23.08.2018	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
21	ASFV/Kaliningrad/DP2019/10179	Свинокомплекс IV компартмента, Гусевский район, п. Таманское Pig farm of compartment IV, Gusevsky district, Tamanskoye village	23.08.2019	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
22	ASFV/Kaliningrad/WB2019/10169	Охотничье хозяйство, Зеленоградский район Hunting farm, Zelenogradsky district	18.05.2019	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
23	ASFV/Kaliningrad/WB2022/8997	Охотничье хозяйство, Нестеровский район Hunting farm, Nesterovsky district	27.07.2022	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
24	ASFV/Kaliningrad/WB2022/9001	Лесной массив вблизи п. Токаревка, Нестеровский район Forest area near the village of Tokarevka, Nesterovsky district	01.08.2022	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
25	ASFV/Kaliningrad/DP2022/9007	ЛПХ, Нестеровский район, п. Калинино Private household plot, Nesterovsky district, Kalinino village	04.08.2022	Домашняя свинья Domestic pig	III	II	I
26	ASFV/Kaliningrad/DP2022/9201	Племенная ферма, Черняховский район, п. Покровское Breeding farm, Chernyakhovsky district, Pokrovskoye village	15.08.2022	Домашняя свинья Domestic pig	II	II	I
27	ASFV/Kaliningrad 17/WB-13869	Лесной массив, п. Красноармейское, Багратионовский район Forest, Krasnoarmeyskoye settlement, Bagrationovsky district	07.11.2019	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
28	ASFV_Kaliningrad_18_WB-12523	Охотничье хозяйство, Славский район Hunting farm, Slavsky district	07.08.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I

Продолжение таблицы см. на стр. 250

№	Наименование изолята Isolate	Место отбора образцов Place of collection	Дата регистрации вспышки Date of outbreak registration	Источник возбудителя инфекции Source of isolation	<i>K145R</i>	<i>MGF 505-5R</i>	<i>O174L</i>
29	ASFV_Kaliningrad_18_WB-12524	Лесной массив, п. Широкое, Правдинский район Forest, Shirokoe village, Pravdinsky district	30.07.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
30	ASFV_Kaliningrad_18_WB-9735	Лесной массив, Правдинский район Forest area, Pravdinsky district	03.07.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
31	ASFV_Kaliningrad_18_WB-9763	Лесной массив, п. Осиновка, Гвардейский район Forest, Osinovka village, Gvardeysky district	07.07.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
32	ASFV_Kaliningrad_18_WB-9766	Охотничье хозяйство, Полесский район Hunting farm, Polesky district	08.07.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
33	ASFV_Kaliningrad_19_WB-10168	Лесной массив, п. Заповедное, Славский район Forest, Zapovednoe village, Slavsky district	13.05.2019	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
34	ASFV_Kaliningrad_18_WB-9734	Лесной массив, п. Каменское, Черняховский район Forest area, Kamenskoye village, Chernyakhovsky district	25.06.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I
35	ASFV_Kaliningrad_18_WB-12516	Лесной массив, п. Шувалово, Черняховский район Forest area, p. Shuvalovo, Chernyakhovsky district	13.05.2018	Дикий кабан Wild boar	III	II	I

Примечание. В анализе использованы последовательности 26 изолятов, описанных впервые в текущем исследовании, и данные о 9 изолятах вируса АЧС, опубликованные ранее и импортированные из GenBank. Красным цветом выделены изоляты с генетическим вариантом *K145R-II*, зеленым цветом – с *K145R-III*.

Note. The analysis used sequences of 26 isolates described for the first time in the current study and data on 9 ASFV isolates published previously and retrieved from GenBank. Isolates with the genetic variant *K145R-II* are highlighted in red, isolates with *K145R-III* are highlighted in green.

После продолжительного отсутствия вируса с *K145R-II* (2018–2021 гг.) в Калининградской области, в 2022 г. был выделен изолят *ASFV/Kaliningrad/DP2022/9201* на крупной свиноводческой племенной ферме в поселке Покровское Черняховского района, относящийся к данному варианту. Однако в регионе *K145R-II* не был обнаружен среди зараженных диких кабанов, являющихся одним из характерных факторов распространения АЧС, включая изоляты 2022 г. [27–31]. При этом болезнь регистрировали на протяжении второй половины 2022 г. в Литве/Польше/Украине, а генетическая последовательность возбудителя в отдельных странах (Литве) соответствовала *K145R-II* и *O174L-I²* [1].

Важнейшим маркером распространения АЧС также является межгенная область *IGR I73R/I329L*. Так, на территории Польши, Калининградской области РФ и Литвы встречаются два варианта *IGR-I* (2 инсерции 10-нуклеотидных tandemных повторов, идентичные штамму *Georgia 2007/1*) и *IGR-II* (3 инсерции tandemных повторов) [1, 11]. У 7 изолятов из Вар-

миньско-Мазурского воеводства (восточный субъект Польши, граничащий с Калининградской областью), выделенных в 2019–2020 гг., обнаружены 5 инсерций tandemных повторов в межгенной области (*IGR-IV*). Все 7 образцов с *IGR-IV* принадлежали геновариантам *K145R-II*, *MGF 505-5R-II*, *O174L-I* [21]. Последующий анализ локуса *IGR I73R/I329L* у изолятов из Калининградской области актуален для подтверждения отсутствия *IGR-IV*.

Анализ данных секвенирования объективно доказывает пути молекулярной эволюции возбудителя АЧС на евро-азиатском континенте. Тенденция развития эпизоотии проявлялась смещением вспышек с юго-востока (Грузия, Армения, Азербайджан, центральная Россия) на запад (Украина, Беларусь, Польша, Литва, Латвия, Эстония, Германия, Калининградская область) в период с 2007 по 2017 г. [18]. Схема территориального происхождения и циркуляции вируса АЧС в Калининградской области, предложенная на основе пространственно-временного и филогенетического исследований, представлена на **рис. 5**. Молекулярно-эпизоотологическую кластеризацию на основе данных локального секвенирования также подтверждают результаты полногеномного филогенетического анализа евроазиатских изолятов, выполненного Y. Zhang и соавт. [18].

²Россельхознадзор. Количество вспышек АЧС в странах Европы 2012–2024 гг. Available at: <https://fsvps.gov.ru/files/kolichestvo-vspyshkek-achs-v-stranah-evropy-2012-2023-gg-na-05-09-2023/?ysclid=ls0x29ofky735423172>

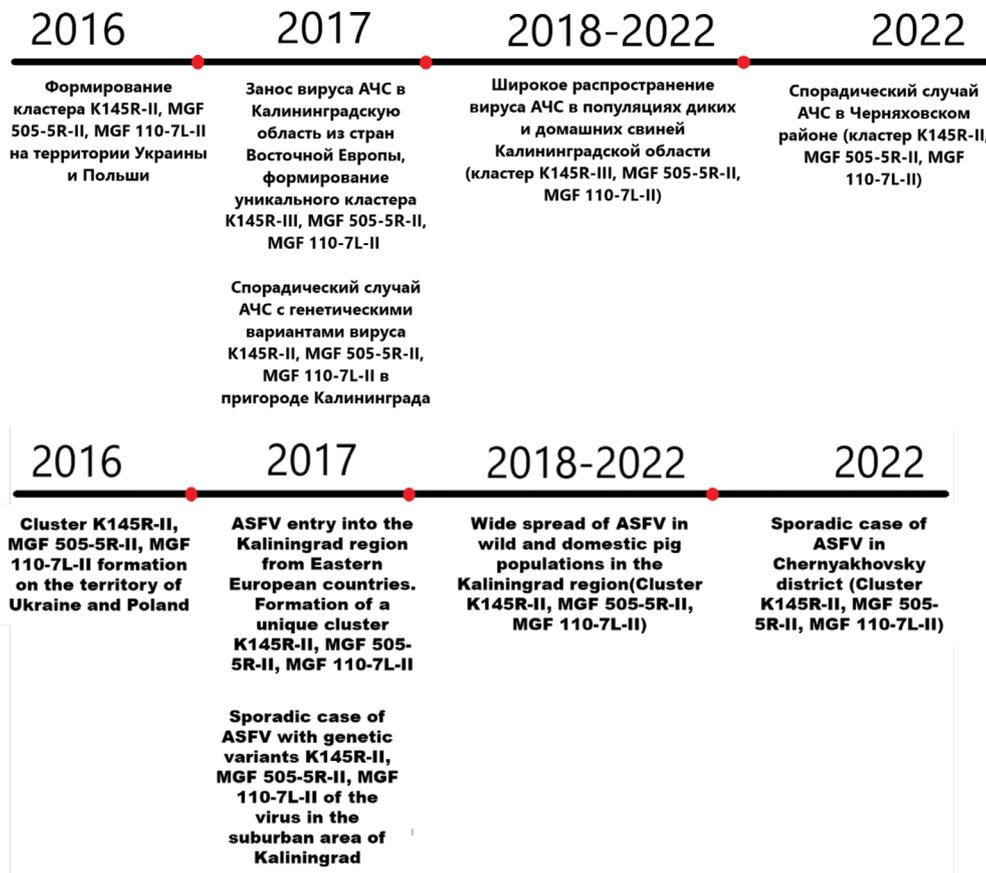


Рис. 5. Схема территориального происхождения и циркуляции вируса АЧС в Калининградской области на основе анализа опубликованных и полученных данных.

Fig. 5. The pattern of territorial origin and circulation of ASFV in Kaliningrad region based on analyses of published and original data.

Заключение

Случаи АЧС в Калининградской области Российской Федерации регистрировали в течение 2017–2022 гг. Молекулярно-генетический анализ 35 изолятов вируса, выделенных от домашних и диких свиней, продемонстрировал наличие циркуляции на территории субъекта-эксклава вируса, принадлежащего двум генетическим кластерам: эпизоотическому (K145R-III, MGF 505-5R-II, O174L-I – 94,3% от изученных изолятов) и спорадическому (K145R-II, MGF 505-5R-II, O174L-I – 5,7%). При этом второй кластер, широко распространенный в Польше и Литве, впервые описан в Калининградской области только в декабре 2017 г. – первая вспышка АЧС у домашних свиней в ЛПИХ (изолят *ASFV/Kaliningrad/DP2017/I5355*), и в августе 2022 г. – эпизоотический очаг на племенной свиноводческой ферме (*ASFV/Kaliningrad/DP2022/9201*). Показано отсутствие 14-нуклеотидной инсерции в гене *O174L* у изолятов вируса АЧС, выделенных среди восприимчивых животных Калининградской области.

Результаты проведенного пространственно-временного анализа демонстрируют маловероятную возможность заноса возбудителя АЧС в Калининградскую область в 2017 г. из центральных субъектов России, в которых наблюдается генетическая гетерогенность изолятов вируса по трем изученным маркерам.

Дальнейший мониторинг субгенотипов вируса АЧС в Евразии – весьма актуальное направление в молеку-

лярной эпизоотологии, которое может стать базовым методом и иметь прикладное значение в расследовании вспышек АЧС.

ЛИТЕРАТУРА

- Gallardo C., Casado N., Soler A., Djadjovski I., Krivko L., Madoño E., et al. A multi gene-approach genotyping method identifies 24 genetic clusters within the genotype II-European African swine fever viruses circulating from 2007 to 2022. *Front. Vet. Sci.* 2023; (10): 1112850. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1112850>
- Mazloum A., van Schalkwyk A., Chernyshev R., Igolkin A., Heath L., Sprygin A. A guide to molecular characterization of genotype II African swine fever virus: essential and alternative genome markers. *Microorganisms.* 2023; 11(3): 642. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030642>
- Bastos A.D., Penrith M.L., Crucière C., Edrich J.L., Hutchings G., Roger F., et al. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch. Virol.* 2003; 148(4): 693–706. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0946-8>
- Achenbach J.E., Gallardo C., Nieto-Pelegrín E., Rivera-Arroyo B., Degefa-Negi T., Arias M., et al. Identification of a new genotype of African swine fever virus in domestic pigs from Ethiopia. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64(5): 1393–404. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.12511>
- Fiori M.S., Sanna D., Scarpa F., Floris M., Di Nardo A., Ferretti L., et al. A deeper insight into evolutionary patterns and phylogenetic history of ASFV epidemics in Sardinia (Italy) through extensive genomic sequencing. *Viruses.* 2021; 13(10): 1994. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13101994>
- Sun E., Huang L., Zhang X., Zhang J., Shen D., Zhang Z., et al. Genotype I African swine fever viruses emerged in domestic pigs in China and caused chronic infection. *Emerg. Microbes Infect.* 2021; 10(1): 2183–93. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1999779>

7. Zhao D., Sun E., Huang L., Ding L., Zhu Y., Zhang J., et al. Highly lethal genotype I and II recombinant African swine fever viruses detected in pigs. *Nat. Commun.* 2023; 14(1): 3096. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38868-w>
8. World Organisation for Animal Health. World Animal Health Information System. Report (2023). Available at: <https://wahis.woah.org/#/dashboards/qd-dashboard>
9. Śmietanka K., Woźniakowski G., Kozak E., Niemczuk K., Frączyk M., Bocian L., et al. African Swine Fever Epidemic, Poland, 2014–2015. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(7): 1201–7. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2207.151708>
10. Мазлум А., Шевченко И.В., Иголкин А.С., Шотин А.Р. Распространение африканской чумы свиней на территории Калининградской области. *Ветеринария Кубани.* 2022; (1): 14–8. DOI: <https://doi.org/10.33861/2071-8020-2022-1-14-18> EDN: <https://elibrary.ru/dbdygf>
11. Mazloun A., van Schalkwyk A., Shotin A., Zinyakov N., Igolkin A., Chernishev R., et al. Whole-genome sequencing of African swine fever virus from wild boars in the Kaliningrad region reveals unique and distinguishing genomic mutations. *Front. Vet. Sci.* 2023; 9: 1019808. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1019808>
12. Puzankova O., Gavrilova V., Chernyshev R., Kolbin I., Igolkin A., Sprygin A., et al. Novel protocol for the preparation of porcine bone marrow primary cell culture for African swine fever virus isolation. *Methods Protoc.* 2023; 6(5): 73. DOI: <https://doi.org/10.3390/mps6050073>
13. Чернышев Р.С., Сидоренкова М.С., Садчикова А.С., Иголкин А.С., Мазлум А. Разработка протокола ПЦР с электрофоретической детекцией с целью амплификации маркерных областей генома изолятов вируса африканской чумы свиней. В кн.: *Труды XI Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2023»*. М.; 2023: 576–8.
14. Kumar S., Stecher G., Li M., Niyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
15. Шотин А.Р., Иголкин А.С., Мазлум А., Шевченко И.В., Аронова Е.В., Груздев К.Н. Изучение биологических свойств изолята вируса африканской чумы свиней ASFV/KALININGRAD 17/WB-13869. *Сельскохозяйственная биология.* 2023; 58(4): 773–83. DOI: <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2023.4.773rus> EDN: <https://elibrary.ru/gwcomm>
16. Власов М.Е., Иматдинов А.Р., Титов И.А., Моргунов С.Ю., Малооголовкин А.С., Балышев В.М. Биологические свойства и молекулярно-генетическая характеристика вируса африканской чумы свиней, выделенного в 2016–2017 гг. в различных регионах Российской Федерации. *Российская сельскохозяйственная наука.* 2018; (4): 54–7. DOI: <https://doi.org/10.31857/S250026270000536-4> EDN: <https://elibrary.ru/yamjtn>
17. Gabriel C., Blome S., Blome S., Malogolovkin A., Parilov S., Kolbasov D., Teifke J.P., et al. Characterization of African swine fever virus Caucasus isolate in European wild boars. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(12): 2342–5. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1712.110430>
18. Zhang Y., Wang Q., Zhu Z., Wang S., Tu S., Zhang Y., et al. Tracing the origin of genotype II African swine fever virus in China by genomic epidemiology analysis. *Transbound. Emerg. Dis.* 2023; 4820809. DOI: <https://doi.org/10.1155/2023/4820809>
19. Mazur-Panasiuk N., Woźniakowski G., Niemczuk K. The first complete genomic sequences of African swine fever virus isolated in Poland. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 4556. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36823-0>
20. Kovalenko G., Ducluzeau A.L., Ishchenko L., Sushko M., Sapachova M., Rudova N., et al. Complete genome sequence of a virulent African swine fever virus from a domestic pig in Ukraine. *Microbiol. Resour. Announc.* 2019; 8(42): e00883-19. DOI: <https://doi.org/10.1128/MRA.00883-19>
21. Mazur-Panasiuk N., Walczak M., Juszkiewicz M., Woźniakowski G. The spillover of African swine fever in Western Poland revealed its estimated origin on the basis of O174L, K145R, MGF 505-5R and IGR I73R/I329L genomic sequences. *Viruses.* 2020; 12(10): 1094. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12101094>
22. Mazur-Panasiuk N., Woźniakowski G. The unique genetic variation within the O174L gene of Polish strains of African swine fever virus facilitates tracking virus origin. *Arch. Virol.* 2019; 164(6): 1667–72. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04224-x>
23. Redrejo-Rodríguez M., Rodríguez J.M., Suárez C., Salas J., Salas M.L. Involvement of the reparative DNA polymerase Pol X of African swine fever virus in the maintenance of viral genome stability in vivo. *J. Virol.* 2013; 87(17): 9780–7. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.01173-13>
24. Schulz K., Oļševskis E., Viltrop A., Masiulis M., Staubach C., Nurmoja I., et al. Eight Years of African Swine Fever in the Baltic States: Epidemiological Reflections. *Pathogens.* 2022; 11(6): 711. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens11060711>
25. Malogolovkin A., Yelsukova A., Gallardo C., Tsybanov S., Kolbasov D. Molecular characterization of African swine fever virus isolates originating from outbreaks in the Russian Federation between 2007 and 2011. *Vet. Microbiol.* 2012; 158(3-4): 415–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.002>
26. Mazloun A., van Schalkwyk A., Shotin A., Igolkin A., Shevchenko I., Gruzdev K.N., et al. Comparative analysis of full genome sequences of African swine fever virus isolates taken from wild boars in Russia in 2019. *Pathogens.* 2021; 10(5): 521. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens10050521>
27. Sauter-Louis C., Conraths F.J., Probst C., Blohm U., Schulz K., Sehl J., et al. African swine fever in wild boar in Europe – a review. *Viruses.* 2021; 13(9): 1717. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13091717>
28. Martínez-Avilés M., Iglesias I., De La Torre A. Evolution of the ASF infection stage in wild boar within the EU (2014–2018). *Front. Vet. Sci.* 2020; 7: 155. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00155>
29. Pautienius A., Schulz K., Staubach C., Grigas J., Zagrabskaite R., Buitkuviene J., et al. African swine fever in the Lithuanian wild boar population in 2018: a snapshot. *Virol. J.* 2020; 17(1): 148. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01422-x>
30. Pautienius A., Grigas J., Pilevičienė S., Zagrabskaite R., Buitkuviene J., Pridotkas G., et al. Prevalence and spatiotemporal distribution of African swine fever in Lithuania, 2014–2017. *Virol. J.* 2018; 15(1): 177. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1090-8>
31. Захарова О.И., Блохин А.А., Торопова Н.Н., Бурова О.А., Яшин И.В., Коренной Ф.И. Плотность популяции дикого кабана и распространение африканской чумы свиней в Российской Федерации. *Ветеринария сегодня.* 2022; 11(2): 104–13. DOI: <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-2-104-113> EDN: <https://elibrary.ru/dczmjk>

REFERENCES

1. Gallardo C., Casado N., Soler A., Djadjovski I., Krivko L., Madoño E., et al. A multi gene-approach genotyping method identifies 24 genetic clusters within the genotype II-European African swine fever viruses circulating from 2007 to 2022. *Front. Vet. Sci.* 2023; (10): 1112850. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1112850>
2. Mazloun A., van Schalkwyk A., Chernyshev R., Igolkin A., Heath L., Sprygin A. A guide to molecular characterization of genotype II African swine fever virus: essential and alternative genome markers. *Microorganisms.* 2023; 11(3): 642. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030642>
3. Bastos A.D., Penrith M.L., Crucière C., Edrich J.L., Hutchings G., Roger F., et al. Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch. Virol.* 2003; 148(4): 693–706. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0946-8>
4. Achenbach J.E., Gallardo C., Nieto-Pelegrín E., Rivera-Arroyo B., Degefa-Negi T., Arias M., et al. Identification of a new genotype of African swine fever virus in domestic pigs from Ethiopia. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64(5): 1393–404. DOI: <https://doi.org/10.1111/tbed.12511>
5. Fiori M.S., Sanna D., Scarpa F., Floris M., Di Nardo A., Ferretti L., et al. A deeper insight into evolutionary patterns and phylogenetic history of ASFV epidemics in Sardinia (Italy) through extensive genomic sequencing. *Viruses.* 2021; 13(10): 1994. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13101994>
6. Sun E., Huang L., Zhang X., Zhang J., Shen D., Zhang Z., et al. Genotype I African swine fever viruses emerged in domestic pigs in China and caused chronic infection. *Emerg. Microbes Infect.* 2021; 10(1): 2183–93. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1999779>
7. Zhao D., Sun E., Huang L., Ding L., Zhu Y., Zhang J., et al. Highly lethal genotype I and II recombinant African swine fever viruses detected in pigs. *Nat. Commun.* 2023; 14(1): 3096. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38868-w>

8. World Organisation for Animal Health. World Animal Health Information System. Report (2023). Available at: <https://wahis.woah.org/#/dashboards/qd-dashboard>
9. Śmietanka K., Woźniakowski G., Kozak E., Niemczuk K., Frączyk M., Bocian Ł., et al. African Swine Fever Epidemic, Poland, 2014–2015. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(7): 1201–7. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2207.151708>
10. Mazloun A., Shevchenko I.V., Igolkin A.S., Shotin A.R. Spread of African swine fever on the territory of the Kaliningrad region. *Veterinariya Kubani.* 2022; (1): 14–8. DOI: <https://doi.org/10.33861/2071-8020-2022-1-14-18> EDN: <https://elibrary.ru/dbdygf> (in Russian)
11. Mazloun A., van Schalkwyk A., Shotin A., Zinyakov N., Igolkin A., Chernishev R., et al. Whole-genome sequencing of African swine fever virus from wild boars in the Kaliningrad region reveals unique and distinguishing genomic mutations. *Front. Vet. Sci.* 2023; 9: 1019808. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.1019808>
12. Puzankova O., Gavrilova V., Chernyshev R., Kolbin I., Igolkin A., Sprygin A., et al. Novel protocol for the preparation of porcine bone marrow primary cell culture for African swine fever virus isolation. *Methods Protoc.* 2023; 6(5): 73. DOI: <https://doi.org/10.3390/mps6050073>
13. Chernyshev R.S., Sidorenkova M.S., Sadchikova A.S., Igolkin A.S., Mazloun A. Development of a PCR protocol with electrophoretic detection to amplify marker fragments of the genome of ASFV isolates. In: *Proceedings of the XI International Scientific and Practical Conference «Molecular Diagnosis 2023»*. Moscow; 2023: 57–8. (in Russian)
14. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
15. Shotin A.R., Igolkin A.S., Mazloun A., Shevchenko I.V., Aronova E.V., Gruzdev K.N. Biological properties of African swine fever virus ASFV/Kaliningrad 17/WB-13869. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya.* 2023; (4): 773–83. DOI: <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2023.4.773eng>
16. Vlasov M.E., Imatdinov A.R., Titov I.A., Morgunov S.Yu., Malogolovkin A.S., Balyshev V.M. Biological properties and molecular genetic characterization of African swine fever virus isolated in 2016–2017 in different regions of the Russian Federation. *Rossiyskaya sel'skokhozyaystvennaya nauka.* 2018; (4): 54–7. DOI: <https://doi.org/10.31857/S250026270000536-4> EDN: <https://elibrary.ru/yamjtn> (in Russian)
17. Gabriel C., Blome S., Malogolovkin A., Parilov S., Kolbasov D., Teifke J.P., et al. Characterization of African swine fever virus Caucasus isolate in European wild boars. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(12): 2342–5. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1712.110430>
18. Zhang Y., Wang Q., Zhu Z., Wang S., Tu S., Zhang Y., et al. Tracing the origin of genotype II African swine fever virus in China by genomic epidemiology analysis. *Transbound. Emerg. Dis.* 2023; 4820809. DOI: <https://doi.org/10.1155/2023/4820809>
19. Mazur-Panasiuk N., Woźniakowski G., Niemczuk K. The first complete genomic sequences of African swine fever virus isolated in Poland. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 4556. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36823-0>
20. Kovalenko G., Ducluzeau A.L., Ishchenko L., Sushko M., Sapachova M., Rudova N., et al. Complete genome sequence of a virulent African swine fever virus from a domestic pig in Ukraine. *Microbiol. Resour. Announc.* 2019; 8(42): e00883-19. DOI: <https://doi.org/10.1128/MRA.00883-19>
21. Mazur-Panasiuk N., Walczak M., Juskiewicz M., Woźniakowski G. The spillover of African swine fever in Western Poland revealed its estimated origin on the basis of O174L, K145R, MGF 505-5R and IGR 173R/I329L genomic sequences. *Viruses.* 2020; 12(10): 1094. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12101094>
22. Mazur-Panasiuk N., Woźniakowski G. The unique genetic variation within the O174L gene of Polish strains of African swine fever virus facilitates tracking virus origin. *Arch. Virol.* 2019; 164(6): 1667–72. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04224-x>
23. Redrejo-Rodríguez M., Rodríguez J.M., Suárez C., Salas J., Salas M.L. Involvement of the reparative DNA polymerase Pol X of African swine fever virus in the maintenance of viral genome stability in vivo. *J. Virol.* 2013; 87(17): 9780–7. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.011173-13>
24. Schulz K., Olševskis E., Viltrop A., Masiulis M., Staubach C., Nurmoja I., et al. Eight Years of African Swine Fever in the Baltic States: Epidemiological Reflections. *Pathogens.* 2022; 11(6): 711. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens11060711>
25. Malogolovkin A., Yelsukova A., Gallardo C., Tsybanov S., Kolbasov D. Molecular characterization of African swine fever virus isolates originating from outbreaks in the Russian Federation between 2007 and 2011. *Vet. Microbiol.* 2012; 158(3–4): 415–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.002>
26. Mazloun A., van Schalkwyk A., Shotin A., Igolkin A., Shevchenko I., Gruzdev K.N., et al. Comparative analysis of full genome sequences of African swine fever virus isolates taken from wild boars in Russia in 2019. *Pathogens.* 2021; 10(5): 521. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens10050521>
27. Sauter-Louis C., Conraths F.J., Probst C., Blohm U., Schulz K., Sehl J., et al. African swine fever in wild boar in Europe – a review. *Viruses.* 2021; 13(9): 1717. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13091717>
28. Martínez-Avilés M., Iglesias I., De La Torre A. Evolution of the ASF infection stage in wild boar within the EU (2014–2018). *Front. Vet. Sci.* 2020; 7: 155. DOI: <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00155>
29. Pautienius A., Schulz K., Staubach C., Grigas J., Zagrabskaite R., Buitkuvienė J., et al. African swine fever in the Lithuanian wild boar population in 2018: a snapshot. *Virol. J.* 2020; 17(1): 148. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01422-x>
30. Pautienius A., Grigas J., Pileviciene S., Zagrabskaite R., Buitkuvienė J., Pridotkas G., et al. Prevalence and spatiotemporal distribution of African swine fever in Lithuania, 2014–2017. *Virol. J.* 2018; 15(1): 177. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1090-8>
31. Zakharova O.I., Blokhin A.A., Toropova N.N., Burova O.A., Yashin I.V., Korennoy F.I. Density of wild boar population and spread of African swine fever in the Russian Federation. *Veterinariya segodnya.* 2022; 11(2): 104–13. DOI: <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2022-11-2-104-113> EDN: <https://elibrary.ru/dczmjnk> (in Russian)

Информация об авторах:

Чернышев Роман Сергеевич – аспирант, ветеринарный врач референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: chernishev_rs@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3604-7161>

Иголкин Алексей Сергеевич – канд. вет. наук, заведующий референтной лабораторией по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: igolkin_as@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>

Шотин Андрей Романович – канд. вет. наук, научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: shotin@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9884-1841>

Зиняков Николай Геннадьевич – канд. биол. наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: zinyakov@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3015-5594>

Колбин Иван Сергеевич – аспирант, ветеринарный врач референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: kolbin@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4692-1297>

Садчикова Анастасия Сергеевна – аспирант, ветеринарный врач референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: sadchikova@arriah.ru; <https://orcid.org/0009-0001-0801-2394>

Лаврентьев Иван Андреевич – аспирант, ведущий ветеринарный врач референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: lavrentev@arriah.ru; <https://orcid.org/0009-0003-0552-3812>

Груздев Константин Николаевич – д-р биол. наук, профессор, главный научный сотрудник информационно-аналитического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: gruzdev@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3159-1969>

Мазлум Али  – канд. биол. наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: mazlum@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5982-8393>

Участие авторов: Чернышев Р.С., Иголкин А.С., Мазлум А. – концепция и дизайн исследования; Чернышев Р.С., Зиняков Н.Г., Колбин И.С., Садчикова А.С. – проведение экспериментов; Чернышев Р.С., Иголкин А.С., Шотин А.Р., Лаврентьев И.А., Мазлум А. – сбор и обработка материала; Чернышев Р.С., Мазлум А. – написание текста; Иголкин А.С., Шотин А.Р., Зиняков Н.Г., Груздев К.Н. – редактирование.

Поступила 16.02.2024
Принята в печать 12.04.2024
Опубликована 30.06.2024

Information about the authors:

Roman S. Chernyshev – postgraduate student, reference laboratory for ASF FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: chernishev_rs@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3604-7161>

Alexey S. Igolkin – Head of reference laboratory for ASF FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: igolkin_as@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>

Andrey R. Shotin – researcher, reference laboratory for ASF FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: shotin@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9884-1841>

Nikolay G. Zinyakov – senior researcher, reference laboratory for avian influenza FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: zinyakov@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3015-5594>

Ivan S. Kolbin – postgraduate student, reference laboratory for ASF FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: kolbin@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4692-1297>

Anastasia S. Sadchikova – postgraduate student, reference laboratory for ASF FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: sadchikova@arriah.ru; <https://orcid.org/0009-0001-0801-2394>

Ivan A. Lavrentev – postgraduate student, reference laboratory for ASF FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: lavrentev@arriah.ru; <https://orcid.org/0009-0003-0552-3812>

Konstantin N. Gruzdev – Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief Researcher of the Information and Analytical Center FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: gruzdev@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3159-1969>

Ali Mazloun  – Senior researcher, reference laboratory for ASF FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: mazlum@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5982-8393>

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

Received 16 February 2024
Accepted 12 April 2024
Published 30 June 2024

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-233>

© ЯШИНА Л.Н., ЖИГАЛИН А.В., АБРАМОВ С.А., ЛУЧНИКОВА Е.М., СМЕТАННИКОВА Н.А., ДУПАЛ Т.А., КРИВОПАЛОВ А.В., ВДОВИНА Е.Д., СВИРИН К.А., ГАДЖИЕВ А.А., МАЛЫШЕВ Б.С., 2024



Выявление коронавирусов (*Coronaviridae*) у рукокрылых на территории Северного Кавказа и юга Западной Сибири

Яшина Л.Н.^{1✉}, Жигалин А.В.^{2,3}, Абрамов С.А.⁴, Лучникова Е.М.⁵, Сметанникова Н.А.¹, Дупал Т.А.⁴, Кривоपालов А.В.⁴, Вдовина Е.Д.⁵, Свиринов К.А.¹, Гаджиев А.А.³, Малышев Б.С.¹

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия;

²ФГАОУ «Национальный исследовательский Томский государственный университет», 634050, г. Томск, Россия;

³ФГБОУ «Дагестанский государственный университет», 367000, г. Махачкала, Россия;

⁴ФГБУН «Институт систематики и экологии животных» СО РАН, 630091, г. Новосибирск, Россия;

⁵ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650099, г. Кемерово, Россия

Резюме

Введение. Рукокрылые являются природным резервуаром коронавирусов (*Coronaviridae*), вызвавших за последнее десятилетие три вспышки заболевания людей: SARS, MERS и COVID-19, или SARS-2.

Цель работы – исследование многообразия коронавирусов среди рукокрылых, населяющих предгорные и горные районы республик Дагестан, Алтай и Кемеровской области.

Материалы и методы. Образцы ротовых смывов и фекалии рукокрылых исследовали на присутствие РНК коронавирусов с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Результаты. Показано, что большие подковоносы (*Rhinolophus ferrumequinum*), обитающие в Республике Дагестан, являются носителями двух разных коронавирусов. Один из двух коронавирусов входит в состав подрода *Sarbecovirus* рода *Betacoronavirus*, включающего возбудителей SARS и COVID-19. Второй коронавирус отнесен к подроду *Decacovirus* рода *Alphacoronavirus* и наиболее близок вирусам, выявленным среди *Rhinolophus* spp. из европейских и ближневосточных стран. В Республике Алтай и Кемеровской области у гладконосых летучих мышей, ночницы Иконникова (*Myotis ikonnikovi*) и восточной ночницы (*Myotis petax*), обнаружены коронавирусы, входящие в род *Alphacoronavirus*, подрод *Pedacovirus*. Вирус от *M. ikonnikovi* из Республики Алтай близок вирусам из Японии и Кореи, а также вирусам от *Myotis* spp. из европейских стран. Вирус из Кемеровской области от *M. petax* группируется с коронавирусами от *Myotis* spp. из азиатских стран и значительно отличается от коронавирусов, ранее обнаруженных в том же природном носителе.

Ключевые слова: коронавирус; рукокрылые; филогенетический анализ

Для цитирования: Яшина Л.Н., Жигалин А.В., Абрамов С.А., Лучникова Е.М., Сметанникова Н.А., Дупал Т.А., Кривоपालов А.В., Вдовина Е.Д., Свиринов К.А., Гаджиев А.А., Малышев Б.С. Выявление коронавирусов (*Coronaviridae*) у рукокрылых на территории Северного Кавказа и юга Западной Сибири. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(3): 255–265. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-233> EDN: <https://elibrary.ru/konejo>

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта РФФИ № 22-24-00377. Отбор проб на территории Республики Дагестана выполнен при поддержке Российского научного фонда № 22-74-00047, <https://rscf.ru/project/22-74-00047/>

Благодарности. Авторы выражают благодарность куратору коллекции рукокрылых ИСИЭЖ СО РАН А.А. Маслову за помощь в установлении видовой принадлежности летучих мышей.

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). Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по отлову животных в соответствии с протоколом и рекомендациями по безопасной работе МУ 3.1.0211-20 (утв. 03.09.2020). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом Института систематики и экологии животных СО РАН (Протокол № 2020-02 от 14.05.2020) и Дагестанского государственного университета (Протокол № 2 от 13.05.2021).

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-233>

Coronaviruses (*Coronaviridae*) of bats in the northern Caucasus and south of western Siberia

Liudmila N. Yashina^{1✉}, Alexander V. Zhigalin^{2,3}, Sergey A. Abramov⁴, Ekaterina M. Luchnikova⁵, Natalia A. Smetannikova¹, Tamara A. Dupal⁴, Anton V. Krivopalov⁴, Evgenia D. Vdovina⁵, Kirill A. Svirin¹, Alimurad A. Gadzhiev³, Boris S. Malyshev¹

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

²National Research Tomsk State University, 634050, Tomsk, Russia;

³Dagestan State University, 367000, Makhachkala, Russia;

⁴Institute of Systematics and Ecology of Animals, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630091, Novosibirsk, Russia;

⁵Kemerovo State University, 650099 Kemerovo, Russia

Abstract

Introduction. Bats are natural reservoirs of coronaviruses (*Coronaviridae*), which have caused three outbreaks of human disease SARS, MERS and COVID-19 or SARS-2 over the past decade. The purpose of the work is to study the diversity of coronaviruses among bats inhabiting the foothills and mountainous areas of the Republics of Dagestan, Altai and the Kemerovo region.

Materials and methods. Samples of bat oral swabs and feces were tested for the presence of coronavirus RNA by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results. It has been shown that the greater horseshoe bats (*Rhinolophus ferrumequinum*), inhabiting the Republic of Dagestan, are carriers of two different coronaviruses. One of the two coronaviruses is a member of the *Sarbecovirus* subgenus of the *Betacoronavirus* genus, which includes the causative agents of SARS and COVID-19. The second coronavirus is assigned to the *Decacovirus* subgenus of the *Alphacoronavirus* genus and is most similar to viruses identified among *Rhinolophus* spp. from European and Middle Eastern countries. In the Altai Republic and Kemerovo region, coronaviruses belonging to the genus *Alphacoronavirus*, subgenus *Pedacovirus*, were found in the smooth-nosed bats: Ikonnikov's bat (*Myotis ikonnikovi*) and the eastern bat (*Myotis petax*). The virus from the Altai Republic from *M. ikonnikovi* is close to viruses from Japan and Korea, as well as viruses from *Myotis* spp. from European countries. The virus from the Kemerovo region from *M. petax* groups with coronaviruses from *Myotis* spp. from Asian countries and is significantly different from coronaviruses previously discovered in the same natural host.

Keywords: coronavirus; bats; phylogenetic analysis

For citation: Yashina L.N., Zhigalin A.V., Abramov S.A., Luchnikova E.M., Smetannikova N.A., Dupal T.A., Krivopalov A.V., Vdovina E.D., Svirin K.A., Gadzhiev A.A., Malyshev B.S. Coronaviruses (*Coronaviridae*) of bats in the northern Caucasus and south of western Siberia. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(3): 255–265. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-233> <https://elibrary.ru/konejo>

Funding. The research was funded by the Russian Science Foundation, grant number 22-24-00377. Sampling on the territory of the Republic of Dagestan was carried out with the support of the Russian Science Foundation, grant number 22-74-00047, <https://rscf.ru/project/22-74-00047/>.

Acknowledgement. The authors express their gratitude to the curator of the bat collection at the Institute of Systematics and Ecology of Animals, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences A.A. Maslov for help in establishing the species identity of bats.

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). Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of wild animals in accordance with Russian guideline 3.1.0211-20 issued on 03.09.2020. The research protocols were approved by the Ethics Committee of the Institute of Systematics and Ecology of Animals (Protocol No 2020-02 dated 14.04.2020) and Dagestan State University (Protocol No 2 dated 13.05.2021).

Введение

Коронавирусы (*Coronaviridae*: *Betacoronavirus*) относятся к числу опасных вирусных патогенов, вызвавших за последние 20 лет три вспышки тяжелых респираторных заболеваний у человека: SARS,

MERS, COVID-19 [1–3]. Возбудители заболевания получили названия SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 соответственно. Показано, что природным резервуаром этих коронавирусов являются рукокрылые, хотя заражение человека инфекциями SARS и MERS произошло через промежуточного хозяина [4–7].

Среди рукокрылых из Юго-Восточной Азии и Японии были обнаружены коронавирусы, наиболее близкие к SARS-CoV и SARS-CoV-2, а наиболее близкие к MERS-CoV были выявлены Евразии в регионах возникновения вспышек [8–11].

Близкородственные вирусы, входящие вместе с SARS-CoV и SARS-CoV-2 в подрод *Sarbecovirus* рода *Betacoronavirus*, были выявлены среди разных видов подковоносных летучих мышей (*Rhinolophidae*) как в азиатских, так и в африканских и европейских странах [12, 13]. Наиболее близкие к SARS-CoV-2 вирусы были обнаружены в Китае среди *Rhinolopus affinis* (штамм RaTG13, уровень гомологии геномов 96%) и в Лаосе среди *Rh. malayanus* (штамм BANAL-52, уровень гомологии 97%) [13]. Многочисленные изоляты SARS-CoV-2 подобных коронавирусов, найденные в европейских, африканских и ближневосточных странах среди *Rhinolopus* spp., отличаются от SARS-CoV-2 значительно сильнее, гомология геномов не превышает 79%, также существенно отличается и рецептор-связывающий домен поверхностного гликопротеина (S), отвечающий за связывание с клетками-мишенями [14–17]. Коронавирусы, входящие в подрод *Merbecovirus* рода *Betacoronavirus*, включающий возбудителя MERS, выявлены в Евразии, Африке, Южной Америке среди разных видов рукокрылых [10, 12]. В европейских странах MERS-подобные коронавирусы найдены среди гладконосых летучих мышей (семейство *Vespertilionidae*) [18, 19]. Что еще более важно, многие недавно открытые коронавирусы циркулируют у нескольких видов летучих мышей, а некоторые из них способны связываться с рецепторами поверхности клеток человека ACE2 (рецепторы SARS-CoV и SARS-CoV-2) или DPP4 (рецепторы MERS-CoV) [10, 13, 19, 20].

Эпидемиологические исследования по выявлению коронавирусов в природных резервуарах и их типированию в России начались во время пандемии COVID-19. В 2020 г. были открыты SARS-подобные коронавирусы в двух видах летучих мышей рода подковоносов (PHK-изоляты Khosta-1 от *Rh. ferrumequinum* и Khosta-2 от *Rh. hipposideros*) в Краснодарском крае РФ и изучены их полноразмерные геномы [17]. Уровень гомологии российских изолятов составил 76–78% со штаммами SARS-CoV и SARS-CoV-2 из Китая и был наибольшим (89%) с европейским штаммом BM48-31/BGR/2008 из Болгарии для Khosta-1 и с африканским штаммом VtKY72 (80%) для Khosta-2. MERS-подобный коронавирус выявлен среди гладконосов *Pipistrellus nathusii* (изолят MOW-BatCoV/15-22) в центральной части европейской территории России [21]. Уровень гомологии российского изолята с возбудителями MERS составил 81–82%. До настоящего времени исследований коронавирусов среди рукокрылых на территории Северного Кавказа и азиатской части страны не проводилось. В ходе проведенного исследования в Дагестане выявлена циркуляция двух коронавирусов, относящихся к подроду *Sarbecovirus* рода *Betacoronavirus* и подроду *Decacovirus* рода *Alphacoronavirus*. На юге Западной Си-

бири обнаружены коронавирусы, входящие в подрод *Pedacovirus* рода *Alphacoronavirus*.

Материалы и методы

Экспедиционные работы, направленные на сбор биоматериала, были проведены в августе 2020 г. в Республике Алтай, в июне 2023 г. в Кемеровской области, в декабре 2022 г. и апреле 2023 г. в Республике Дагестан (рис. 1). Отловы в Республике Алтай и Кемеровской области проводили летом специализированными сетями, размещенными в местах пролета животных. В Республике Дагестан материал отбирали в период гибернации рукокрылых в местах зимовок. Для обеспечения безопасности исследователей при работе с потенциально зараженными животными соблюдали рекомендации, приведенные в МУ 3.1.0211-20 (утв. 03.09.2020).

При исследовании соблюдали институциональные и национальные стандарты по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010), а также институциональные и национальные стандарты по отлову животных в соответствии с протоколом и рекомендациями по безопасной работе МУ 3.1.0211-20 (утв. 03.09.2020). Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом Института систематики и экологии животных СО РАН (Протокол № 2020-02 от 14.05.2020) и Дагестанского государственного университета (Протокол № 2 от 13.05.2021).

Отобранные ротоглоточные смывы и фекалии помещали в жидкий азот либо в стабилизирующий раствор RNAlater (QIAGEN GmbH, Германия) для последующего выделения РНК и ее анализа методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Подтверждение таксономической принадлежности животных, определенной на основе морфологических признаков, было проведено путем анализа фрагмента гена *COI*, кодирующего первую субъединицу цитохромоксидазы митохондриальной ДНК с праймерами, описанными ранее [22].

Выделение РНК проводили с использованием набора «РИБО-преп» (ЦНИИ Эпидемиологии, Россия). Скрининг образцов выполняли методом ОТ-ПЦР с использованием обратной транскриптазы M-MuLV-RN («Диа-М», Россия), Taq ДНК-полимеразы Hot Start («Диа-М», Россия) по протоколу и с праймерами на консервативную область гена РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp) коронавируса (фрагмент 397 н.о.), описанными ранее [23]. На основе вновь сконструированного набора праймеров получали полноразмерный ген поверхностного гликопротеина шипа (S) а также фрагменты гена *nsp16*. Определение нуклеотидных последовательностей каждой из цепей ампликонов выполняли на автоматическом анализаторе ABI Prism 310, используя набор BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, США).

Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью алгоритма MUSCLE в программе MEGA X. Для построения филогенетических

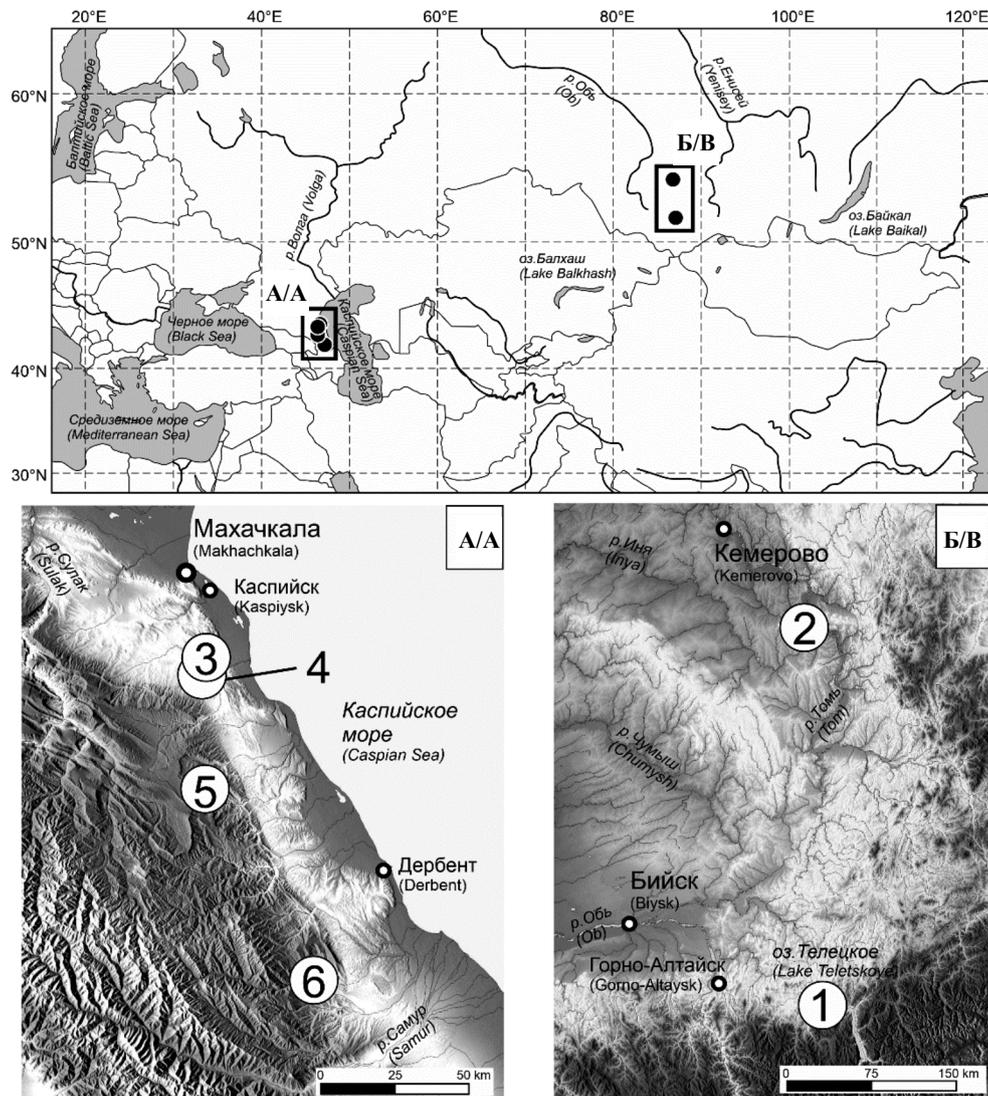


Рис. 1. Расположение мест отлова рукокрылых на территории России.

А – точки отлова на территории Северного Кавказа: 4 – пещера «Большая глиняная», 3 – пещера «Карабудахкентская», 5 – штольни у села Ханцкаркамахи, 6 – пещера у села Куг; Б – точки отлова на территории юга Западной Сибири: 1 – Артыбаш, 2 – урочище Ажendarово.

Fig. 1. Map showing the locations of bat trapping sites in Russia.

A – capture points in the North Caucasus: 4 – Bolshaya Glinyanaya cave, 3 – Karabudakhkentskaya cave, 5 – adits near the village Khantskarkamahi, 6 – cave near the village of Kug; B – capture points in the south of Western Siberia: 1 – Artybash, 2 – Azhendarovo tract.

деревьев использовали метод Neighbor-joining с моделью эволюции Kimura 2. Вычисления проводили для 1000 итераций.

Результаты

В период 2020–2023 гг. в северо-восточной части Горного Алтая вблизи Телецкого озера, в предгорных районах западного макросклона Кузнецкого Алатау, пещерах и штольнях северо-восточной части Большого Кавказа была отловлена 101 особь рукокрылых 11 видов, входящих в состав семейств подковоносые (*Rhinolophidae*) и гладконосые (*Vespertilionidae*). Все образцы были протестированы методом ОТ-ПЦР с использованием праймеров к гену коронавирусного генома RdRp. Вирусная РНК была выявлена в образ-

цах от 11 больших подковоносов (*Rh. ferrumequinum* (Schreber, 1774)) из Республики Дагестан и 2 образцах от гладконосых летучих мышей, восточной ночницы (*Myotis petax* (Hollister, 1912)) из предгорных районов Кузнецкого Алатау и ночнице Иконникова (*Myotis ikonnikovi* (Ognev, 1912)) из Горного Алтая (таблица). Три РНК-положительных образца из Республики Дагестан дополнительно анализировали с использованием праймеров к фрагменту гена *nsp16*, а для одного из образцов был получен полноразмерный ген оболочечно-го белка S. Новые нуклеотидные последовательности вирусов были депонированы в банке данных GenBank под номерами PP265313–PP265325.

Филогенетический анализ, основанный на фрагментах гена RdRp, выявил среди новых РНК-изо-

Таблица. Выявление инфицированных коронавирусами рукокрылых методом ОТ-ПЦР и идентифицированные вирусы в республиках Дагестан, Алтай и Кемеровской области

Table. Detection of coronavirus infection in bats by RT-PCR and viruses identified in bats in Republics of Dagestan, Altai and Kemerovo region

Регион Region	Место отлова Collection Site	Вид Species	Год Year	Коронавирус РНК+/исследованы Coronavirus RNA Positive/Tested	Род/подрод коронавируса Coronavirus Genus/Subgenus
Республика Дагестан Dagestan Republic	Пещера «Большая глиняная» Cave Big Clay	<i>Myotis blythii</i>	2022	0/9	
		<i>Myotis blythii</i>	2022	0/4	
	Штольни у села Ханцаркамахи Adits near the village of Khants- karkamahi	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	2022	3/11	<i>Beta/Sarbecovirus</i>
		<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	2023	2/4	<i>Alpha/Decacovirus</i>
		<i>Rhinolophus hipposideros</i>	2023	0/1	
	Пещера «Карабудажкентская» Cave Karabudakhkent	<i>Rhinolophus mehelyi</i>	2023	0/9	
Пещера «Большая глиняная» Cave Big Clay	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	2023	8/25	<i>Alpha/Decacovirus</i>	
Республика Алтай Altai Republic	Поселок Артыбаш Artybash	<i>Myotis ikonnikovi</i>	2020	1/4	<i>Alpha/Pedacovirus</i>
		<i>Myotis dasycneme</i>	2020	0/2	
		<i>Plecotus ognevi</i>	2020	0/4	
		<i>Eptesicus nilssonii</i>	2020	0/4	
		<i>Myotis petax</i>	2020	0/2	
		<i>Myotis sibiricus</i>	2020	0/5	
Кемеровская область Kemerovo region	Урочище Ажendarово Azhendarovo tract	<i>Myotis petax</i>	2023	1/3	<i>Alpha/Pedacovirus</i>
		<i>Myotis dasycneme</i>	2023	0/2	
		<i>Vespertilio murinus</i>	2023	0/3	
		<i>Myotis ikonnikovi</i>	2023	0/1	
		<i>Eptesicus nilssonii</i>	2023	0/1	

лятов 3 вида коронавирусов (рис. 2 а). Два вида коронавирусов были обнаружены у больших подковоносов (*Rh. ferrumequinum*). Первый коронавирус, выявленный у трех особей из одной заброшенной штольни, входит в состав подрода *Sarbecovirus* рода *Betacoronavirus* и наиболее близок (99,5% гомологии) доступным из банка данных GenBank последовательностям вируса, обнаруженного недавно у гладконосых мышей, остроухих ночниц (*M. blythii*), из граничащий с Дагестаном Грузии (GE_CoV146_Myo_bly). Другие коронавирусы, формирующие общий кластер на филогенетическом дереве, ранее выявлены от разных видов подковоносов (*Rhinolophus* spp.) из сопредельных регионов: Грузии (GE_CoV93_Rhi_eur), Болгарии (BV99-04/BGR/2009, BM48-31/BGR/2008), Ливана (LBN/LB20-CO-BAT-19A), Краснодарского края РФ (BtCoV/Khosta-1/Rh/Russia/2020), Италии (Rfer4675_IT_2016) с уровнем гомологии 95,2–97,3% для нуклеотидных и 99,2–100% для аминокислотных последовательностей. Второй коронавирус, выявленный у 2 из 4 особей *Rh. ferrumequinum* в расположенной рядом штольне, а также у 6 из 25 особей из пе-

щеры, удаленной на 45 км, по результатам филогенетического анализа отнесен к роду *Alphacoronavirus*, подрод *Decacovirus*. Наиболее близкие вирусы (гомология 98,3–99,0% нуклеотидных и 100% аминокислотных последовательностей) обнаружены среди *Rh. euryale* из соседней Грузии (GE_CoV153_Rhi_eur). Другие близкие варианты коронавирусов ранее выявлены от *Rhinolophus* spp. из европейских и африканских стран: Италии (Bat Rfer4015_IT_16), Франции (FRA_EPI6_Rhfer999_5C_P23), Руанды (PREDICT_CoV-42). Уровень их гомологии с новыми изолятами составил 86,7–88,4% для нуклеотидных и 96,9–99,2% для аминокислотных последовательностей. Менее близки к новым изолятам были последовательности *Alphacoronavirus* от того же носителя из Китая (менее 77,3% нуклеотидных и менее 93,2% аминокислотных). Различия нуклеотидных последовательностей новых РНК-изолятов *Alphacoronavirus* из двух пещер составило 1,0%.

Анализ последовательностей фрагмента вирусного генома от особей, отловленных в одной штольне или пещере, показал их идентичность друг другу

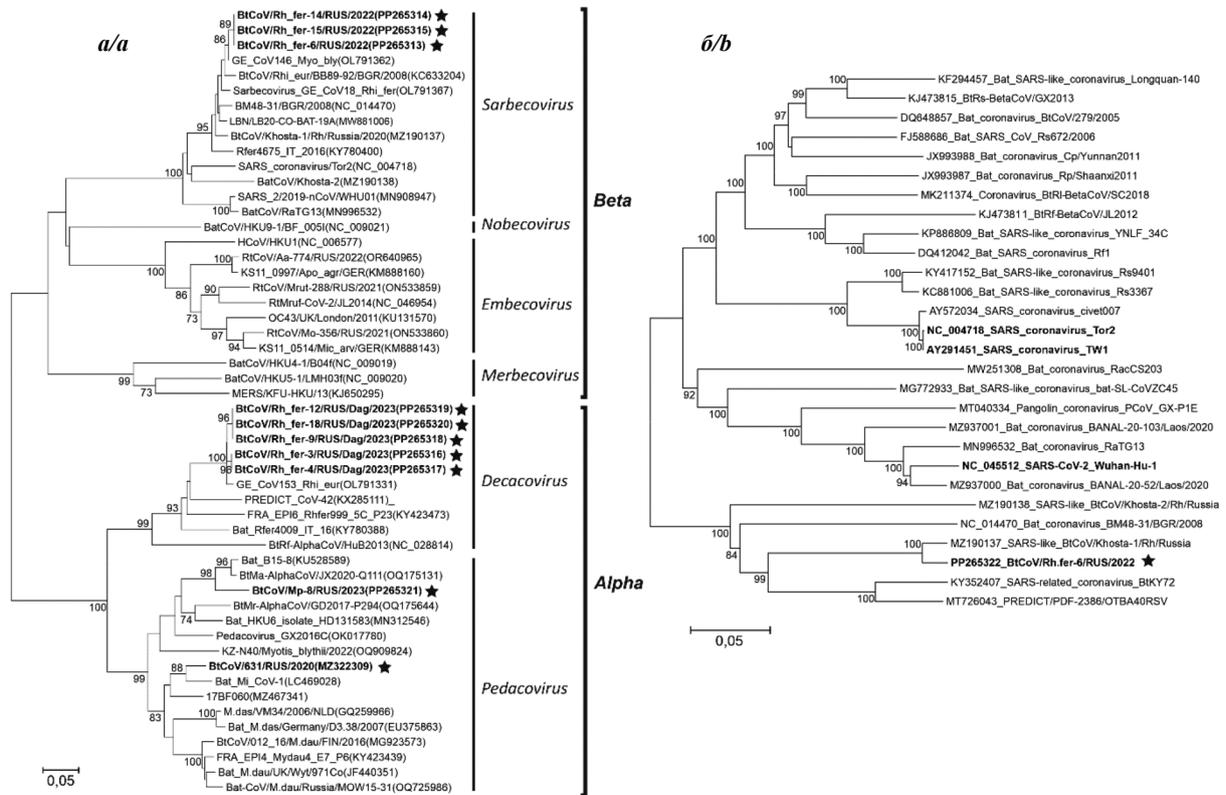


Рис. 2. Филогенетические деревья, отображающие взаимосвязи новых РНК-изолятов коронавирусов, ассоциированных с рукокрылыми на Северном Кавказе и юге Западной Сибири, и изолятов коронавирусов из других регионов мира.

Деревья построены на основе фрагмента гена RdRp (а), гена белка S (б) с использованием метода ближайших соседей (NJ). Индексы поддержки рассчитаны для 1000 повторов, индексы поддержки (> 70%) отображены в соответствующих узлах. Масштабная линейка указывает количество нуклеотидных замен на сайт. Новые изоляты выделены жирным шрифтом и звездочкой, жирным шрифтом выделены также возбудители SARS и COVID-19 (б). В анализ включены по две/три идентичных последовательности РНК-изолятов из Республики Дагестан (а).

Fig. 2. Phylogenetic tree showing relationships of new coronavirus strains, associated with bats in North Caucasus and Altai-Sayan regions, with strains from other regions.

The trees were generated based on the partial RdRp gene (a), S gene (b), using a neighbor-joining method (NJ) with 1000 bootstrap replicates; bootstrap values (> 70%) are shown at relevant nodes. The scale bar depicts the number of nucleotide substitutions per site. Detected coronaviruses are labeled in bold font and by asterisk, coronaviruses which caused SARS and COVID-19 are also labeled in bold font (b). Two or three identical sequences of strains from the Republic of Dagestan were used for analysis (a).

в каждом из трех мест отлова, где были обнаружены инфицированные *Rh. ferrumequinum*. Поскольку анализ проведен с использованием консервативного гена RdRp, для подтверждения полученных данных был проведен анализ фрагмента более вариабельного гена *nsp16* для РНК-изолятов SARS-подобного *Betacoronavirus* (BtCoV/Rf-6/RUS/2022, BtCoV/Rf-14/RUS/2022, BtCoV/Rf-15/RUS/2022). Показано, что и в этом случае последовательности анализируемого фрагмента генома коронавируса от трех инфицированных особей из одной штольни были идентичны. Эти данные, а также сравнительно низкий уровень различия (менее 4,0%) географически удаленных изолятов *Betacoronavirus* из Дагестана, Болгарии, Ливана, Италии и Краснодарского края РФ свидетельствуют о высокой стабильности геномов у природных носителей.

Поскольку один из выявленных нами вариантов вируса из Республики Дагестан входит в состав подрода *Sarbecovirus* рода *Betacoronavirus*, включающего как

возбудителей эпидемии SARS, так и возбудителей пандемии COVID-19, был получен и проведен филогенетический анализ полноразмерного гена поверхностного гликопротеина шипа (S) для изолята BtCoV/Rf-6/RUS/2022 (рис. 2 б). Наиболее близкие из опубликованных в GenBank нуклеотидных последовательностей с уровнем гомологии 96,9% оказались у изолята Khosta-1 из Краснодарского края, выявленного в том же природном носителе. При этом гомология кодируемых аминокислотных последовательностей белков S составила 99,1%. У других, более близких по анализу гена RdRp РНК-изолятов вируса из Грузии, европейских стран и Ливии, в GenBank были доступны лишь короткие фрагменты гена RdRp и отсутствовали гены белков S. Исключением являлся полноразмерный геном изолята из Болгарии (BM48-31/BGR/2008). При сравнимом уровне различия фрагмента гена RdRp изолятов из Республики Дагестан, Болгарии и Краснодарского края (3,3–3,5%), уровень различия более вариабельных генов белков S был сравним для

a/a

			442		472	479-80	487	491
PP265322_BtCoV/Rh.fer-6	Россия	NTKSIDK----	GGQFYR	LRFRHGKIKPYERDTSNVPYNAQGGTCTDTSQ	LN	QYPL	KSY	DFDTETVGIGYQPY
MZ190137_BtCoV/Khosta-1	Россия
NC_014470_BM48-31/BGR	Болгария	..N.L.S----	SNE.F.RG.L..LF.PSS.AEGK.A..G..QSSF
KY352407_BtKY72	Кения	..N.V.SKS--	NNI..L.SASSIG.E...G..P..VV
MT726043_PREDICT/PDF-2386	Уганда	..N.V.SK--	QGNI..L.SASSIG.E...G..P..VV
MZ190138_BtCoV/Khosta-2	Россия	..RT..S----	KRN.RANQPGTHEQD.G.S.S.V
NC_045512_SARS-CoV-2	Китай	..SNNL	SKVGGNYNYLKSNLFI.TEI.Q.GSTPNGVEGFF.Q..G.QP.N.V
NC_004718_SARS-CoV	Китай	..RN	..ATSTGNYNYKYLLR.FIFSPG.KPPP-A
							W.ND.G.YT.T

b/b

сайт гидролиза S1/S2

↓

	666			696
SARS-CoV-2	IGAGICASYQTQNTS	PRRA	ARSVASQSIIAYT	
SARS-CoVH.VSLL	----	TSQK.V	...
BtCoV/Rh.fer-6V..KFGST-KT	----	---Q...L	...
BtCoV/Khosta-1V..KFGST-KT	----	---Q...L	...
BM48-31/BGRK.TNVSST	--LV	--GGH.L	...
BtKY72KFGSD-KI	----	M-GQE.V	...
BtCoV/Khosta-2	V...V..KF	--TT	--A-KQS.L	...

Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей рецептор-связывающего участка рецептор-связывающего домена (RBD) коронавируса BtCoV/Rh.fer-6 из Республики Дагестан и других коронавирусов подрода *Sarbecovirus*.

Шесть позиций (442, 472, 479, 480, 487, 491; нумерация по штамму AY278741), важных для адаптации SARS-CoV-подобных вирусов к рецептору человека ACE2 [24], выделены жирным шрифтом (a). Сравнение аминокислотных последовательностей, окружающих сайт гидролиза SARS-CoV-2, SARS-CoV, BtCoV/Rh.fer-6, и других SARS-CoV-подобных вирусов (b).

Fig. 3. Amino acid sequence alignment of the receptor-binding motif of the receptor-binding domain (RBD) of the S protein of BtCoV/Rh.fer-6 from the North Caucasus and certain coronaviruses of subgenus *Sarbecovirus*.

Six positions (442, 472, 479, 480, 487, and 491; SARS-CoV #AY278741 numbering) that are thought to be important for adaptation of SARS-CoV-like viruses to the human ACE2 receptor [24] are shown in bold (a). Amino acid sequence alignment of the region around the S1/S2 cleavage site in SARS-CoV-2, SARS-CoV, BtCoV/Rh.fer-6 and certain bat SARS-CoV-like viruses. Four amino acid insertion (PRRA) that forms polybasic furin cleavage site in SARS-CoV-2 is highlighted in bold (b).

пары Дагестан – Краснодарский край (3,1%) и значительно выше (22,7%) для изолятов из Дагестана и Болгарии, что свидетельствует о формировании отличающегося варианта *Sarbecovirus* на территории южной части РФ (Республика Дагестан и Краснодарский край) и, возможно, Грузии. Анализ кодируемой последовательности поверхностного белка S показал (рис. 3), что у нового РНК-изолята BtCoV/Rf-6/RUS/2022 отсутствуют 4 аминокислотных остатка (PRRA) в N-терминальной области рецепторного участка, расположенных на стыке S1- и S2-субъединиц шипа и формирующих сайт гидролиза фуриновой протеазы, характерных для возбудителей пандемического варианта SARS-CoV-2 [3, 5]. Из 6 позиций: 442(L), 472(F), 479(Q), 480(S), 487(N), 491(Y) – в рецептор-связывающем домене, существенно влияющих на связывание с рецептором ACE2, совпадали 3 позиции (442, 480, 491) с соответствующими позициями белка S возбудителя COVID-19 [24] (рис. 3 a). Общая гомология нуклеотидных и аминокислотных последовательностей поверхностных белков S составила 78,6 и 71,8% соответственно.

В Республике Алтай и Кемеровской области у гладконосых летучих мышей, восточной ночницы (*M. petax*) из предгорных районов Кузнецкого Алатау и ночницы Иконникова (*M. ikonnikovi*) из Горного Алтая, обнаружены коронавирусы, входящие в подрод *Pedacovirus* рода *Alphacoronavirus*. Уровень

гомологии между географически близкими изолятами от двух видов ночниц, входящих в состав одного подрода, относительно невысок и составил 80,6% для нуклеотидных и 96,9% для аминокислотных последовательностей. На филогенетическом дереве (рис. 2) вирус из Республики Алтай (BtCoV/631/RUS/2020) группируется с изолятом из Японии (Mi-CoV-1), выявленным также в ночнице Иконникова, изолятом из Южной Кореи (17BF060) от неидентифицированного вида рукокрылых и с изолятами от *Myotis* spp. (BtCoV/012_16/M.dau/FIN/2016, M.das/VM34/2006/NLD, M.daubentonii/UK/Wyt/971Co, M.das/Germany/D3.38/2007, FRA_EPI4_Myda4_E7_P6, Bat-CoV/M.daubentonii/Russia/MOW15-31/1) из Европы и европейской части РФ. Наиболее близкий вирус из Японии имел гомологию 93,9% для нуклеотидных и 99,0% для аминокислотных последовательностей. В отличие от изолятов из Республики Дагестан, новый сибирский изолят из Республики Алтай имел относительно невысокий уровень гомологии со всеми остальными опубликованными в GenBank последовательностями от других видов носителей, который не превышал 89,7% для нуклеотидных и 97,0% для аминокислотных последовательностей.

Вирус из Кемеровской области от *M. petax* (Bt-CoV/Мр-8/RUS/2023) на филогенетическом дереве (рис. 2) входит в группу изолятов от *Myotis* spp. из азиатских стран: Кореи, Китая, Казахстана (Bat-

CoV/KZ-N40/Myotis_blythii/2022). Сибирский РНК изолят от *M. petax* имеет более высокий по сравнению с вирусом от *M. ikonnikovi* уровень гомологии с коронавирусами, выявленными среди *Myotis* spp. из Республики Корея (B15-8) и Китая (Bt-AlfaCoV/JX2020-Q111, HD131583B, BtMr-AlfaCoV/GD2017-P294), он составляет 86,4–92,6% для нуклеотидных и 97,7–100% для аминокислотных последовательностей. При этом значительно меньше его сходство с изолятами от аналогичного хозяина, *M. petax*, обнаруженными в Республике Корея (73,3–79,3 и 81,8–87,5% соответственно).

Обсуждение

В ходе проведенного исследования циркуляция 3 видов коронавирусов среди рукокрылых установлена в трех административных регионах РФ. Исследование коронавирусов и их природных резервуаров ранее в выбранных для изучения регионах не проводилось, однако они существенно различаются по степени изученности близлежащих территорий. В Грузии и европейской части России, граничащих с Республикой Дагестан, а также в европейских и ближневосточных странах выявлено большое разнообразие коронавирусов, ассоциированных с рукокрылыми [12, 14–17]. Территория, окружающая юг Западной Сибири, практически не исследована, за исключением доступных в GenBank нескольких последовательностей от рукокрылых из Казахстана (№№ OQ909823, OQ909824).

Выявление близкородственных вирусов от разных видов природных носителей, так же как и циркуляция существенно различных коронавирусов в одном виде носителя, описана ранее [10, 20] и была выявлена нами среди РНК-изолятов из Республики Дагестан. Близкие варианты SARS-подобного вируса (менее 0,5% различий) обнаружены у представителей двух семейств: *Rh. ferrumequinum* в Дагестане и *M. blythii* в граничащей с ним Грузии. В то же время среди *Rh. ferrumequinum*, отловленных в двух соседних штольнях, расположенных на расстоянии не более 300 м друг от друга, были выявлены коронавирусы, относящиеся к разным родам и отличающиеся на 41,1–41,5% по нуклеотидным и на 58,3% по аминокислотным последовательностям.

Во время размножения и зимовки рукокрылые образуют крупные скопления в укрытиях, таких как пещеры и штольни. При этом одни и те же укрытия используются разными видами, которые не взаимодействуют между собой за их пределами. Совместное использование укрытий способствует циркуляции и поддержанию вирусов в разных видах рукокрылых, а также облегчает смену хозяина вируса, а заражение может происходить при непосредственном контакте особей, например при укусах или при спаривании. Полученные данные показывают, что в каждой из локальных групп *Rh. ferrumequinum* циркулирует один генетический вариант коронавируса, с практически идентичными последовательностями генома у разных особей.

Из результатов мечения известно, что летучие мыши способны мигрировать на значительные расстоя-

ния [25, 26]. Такие дальние перелеты могут способствовать передаче вирусов или их вариантов между локальными популяциями летучих мышей [27], а заражение больших подковоносов разными вирусами могло происходить при совместном заселении укрытий особями из различных локальных группировок.

Объединение на филогенетическом дереве новых изолятов коронавирусов из Дагестана в общие кластеры с РНК-изолятами из европейских стран свидетельствует об их общем эволюционном происхождении. При этом можно предполагать, что эволюционная история изолятов *Alphacoronavirus* в Дагестане/Грузии значительно более продолжительна по сравнению с изолятами *Betacoronavirus*, т.к. уровни различия нуклеотидных последовательностей из Дагестана/Грузии с наиболее близкими южноевропейскими вариантами составляет 11,4–14,2 и 2,3–3,3% соответственно.

Уровень инфицированности животных (более 24%), обитающих в каждом из мест отлова в Республике Дагестан, сопоставим с опубликованными данными по инфицированности больших подковоносов в Краснодарском крае [17]. Напрямую сравнивать инфицированность рукокрылых в Дагестане и сибирских регионах невозможно, т.к. значительно различаются численность исследованных животных, сроки и методы сбора материала. В Республике Дагестан отбор проб проводили в зимнее время в пещерах и штольнях, в местах совместного обитания больших колоний рукокрылых и их интенсивных контактов. В Горном Алтае и предгорных районах Кузнецкого Алатау животных отлавливали в летнее время сетями в местах охоты на низкогорных участках. В этих местах не отмечено крупных пещер, и рукокрылые не образуют больших колоний, используя в качестве убежища дупла деревьев или небольшие по размеру другие укрытия по типу небольших скальных трещин. Вне массовых скоплений резко снижается интенсивность контактов между животными, ограничивая их взаимодействия краткими контактами в период спаривания и контактами между матерью и детенышами в гнездовом периоде. Возможно, именно отсутствие крупных колоний в этих районах обусловило не только относительно низкую численность рукокрылых в целом, но и их общую низкую зараженность.

Проведенное исследование является первой работой по выявлению коронавирусов среди рукокрылых в азиатской части России, причем один из новых РНК-изолятов *Alphacoronavirus* обнаружен в малоисследованном природном носителе, ночнице Иконникова. Установлено более значительное отличие РНК-изолятов из Западной Сибири от ранее известных европейских и азиатских коронавирусов, что, наиболее вероятно, связано с большей удаленностью их мест обитания. Значительно более изученные в отношении коронавирусов, ассоциированных с рукокрылыми, территории юго-востока Китая, Республики Корея, Японии и европейских стран разделены с местами отловов более чем на 2800 км.

Фауна рукокрылых юга Западной Сибири включает виды, имеющие как исключительно азиатское распространение (восточная ночница, ночница Иконникова, ушан Огнева (*Plecotus ognevi*)), так и виды значительная часть ареала которых расположена в европейской части континента (прудовая ночница (*Myotis dasycneme*), северный кожанок (*Eptesicus nilssonii*)) [28]. Следствием этого может быть объединение в общие кластеры вирусных последовательностей, обнаруженных на территории как европейских, так и восточноазиатских стран. Более ясное представление о происхождении сибирских изолятов коронавируса могут дать только данные по новым изолятам коронавируса, которые, несомненно, будут обнаружены в процессе дальнейших исследований на территории Сибири и Дальнего Востока России.

ЛИТЕРАТУРА

- Drosten C., Günther S., Preiser W., van der Werf S., Brodt H.R., Becker S., et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348(20): 1967–76. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030747>
- Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367(19): 1814–20. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211721>
- Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.M., Wang W., Song Z.G., et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature.* 2020; 579(7798): 265–9. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
- Cui J., Li F., Shi Z.L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019; 17(3): 181–92. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
- Львов Д.К., Альховский С.В. Истоки пандемии COVID-19: экология и генетика коронавируса (Betacoronavirus: Coronaviridae) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (подрод Sarbecovirus), MERS-CoV (подрод Merbecovirus). *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(2): 62–70. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-62-70> EDN: <https://elibrary.ru/hnounc>
- Guan Y., Zheng B.J., He Y.Q., Liu X.L., Zhuang Z.X., Cheung C.L., et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science.* 2003; 302(5643): 276–8. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1087139>
- Mohd H.A., Al-Tawfiq J.A., Memish Z.A. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) origin and animal reservoir. *Virol. J.* 2016; 13: 87. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0544-0>
- Hu B., Zeng L.P., Yang X.L., Ge X.Y., Zhang W., Li B., et al. Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLoS Pathog.* 2017; 13(11): e1006698. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006698>
- Murakami S., Kitamura T., Suzuki J., Sato R., Aoi T., Fujii M., et al. Detection and Characterization of bat Sarbecovirus phylogenetically related to SARS-CoV-2, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(12): 3025–9. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2612.203386>
- Ruiz-Aravena M., McKee C., Gamble A., Lunn T., Morris A., Snedden C.E., et al. Ecology, evolution and spillover of coronaviruses from bats. *Nat. Rev. Microbiol.* 2022; 20(5): 299–314. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00652-2>
- Anthony S.J., Gilardi K., Menachery V.D., Goldstein T., Ssebide B., Mbabazi R., et al. Further evidence for bats as the evolutionary source of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *mBio.* 2017; 8(2): e00373-17. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.00373-17>
- Wong A.C.P., Li X., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. Global epidemiology of bat coronaviruses. *Viruses.* 2019; 11(2): 174. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11020174>
- Temmam S., Vongphayloth K., Baquero E., Munier S., Bonomi M., Regnault B., et al. Bat coronaviruses related to SARS-CoV-2 and infectious for human cells. *Nature.* 2022; 604(7905): 330–6. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04532-4>
- Drexler J.F., Gloza-Rausch F., Glende J., Corman V.M., Muth D., Goettsche M., et al. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J. Virol.* 2010; 84(21): 11336–49. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00650-10>
- Balboni A., Palladini A., Bogliani G., Battilani M. Detection of a virus related to betacoronaviruses in Italian greater horseshoe bats. *Epidemiol. Infect.* 2011; 139(2): 216–9. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0950268810001147>
- Monchatre-Leroy E., Boué F., Boucher J.M., Renault C., Moutou F., Ar Gouilh M., et al. Identification of alpha and beta Coronavirus in wildlife species in France: bats, rodents, rabbits, and hedgehogs. *Viruses.* 2017; 9(12): 364. DOI: <https://doi.org/10.3390/v9120364>
- Alkhovsky S., Lenshin S., Romashin A., Vishnevskaya T., Vyshemirsky O., Bulycheva Y., et al. SARS-like coronaviruses in horseshoe bats (*Rhinolophus* spp.) in Russia, 2020. *Viruses.* 2022; 14(1): 113. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14010113>
- Moreno A., Lelli D., de Sabato L., Zaccaria G., Boni A., Sozzi E., et al. Detection and full genome characterization of two beta CoV viruses related to Middle East respiratory syndrome from bats in Italy. *Virol. J.* 2017; 14(1): 239. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0907-1>
- Lau S.K.P., Fan R.Y.Y., Zhu L., Li K.S.M., Wong A.C.P., Luk H.K.H., et al. Isolation of MERS-related coronavirus from lesser bamboo bats that uses DPP4 and infects human-DPP4-transgenic mice. *Nat. Commun.* 2021; 12(1): 216. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20458-9>
- Wong A.C.P., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. Interspecies jumping of bat coronaviruses. *Viruses.* 2021; 13(11): 2188. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13112188>
- Speranskaya A.S., Artiushin I.V., Samoilov A.E., Korneenko E.V., Khabudaev K.V., Ilina E.N., et al. Identification and genetic characterization of MERS-related coronavirus isolated from Nathusius' pipistrelle (*Pipistrellus nathusii*) near Zvenigorod (Moscow region, Russia). *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2023; 20(4): 3702. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph20043702>
- Gorobeyko U.V., Kartavtseva I.V., Sheremetyeva I.N., Kazakov D.V., Guskov V.Yu. DNA-barcoding and a new data about the karyotype of *Myotis petax* (Chiroptera, Vespertilionidae) in the Russian Far East. *Comp. Cytogenet.* 2020; 14(4): 483–500. DOI: <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v14.i4.54955>
- Wang W., Lin X.D., Guo W.P., Zhou R.H., Wang M.R., Wang C.Q., et al. Discovery, diversity and evolution of novel coronaviruses sampled from rodents in China. *Virology.* 2015; 474: 19–27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.10.017>
- Wan Y., Shang J., Graham R., Baric R.S., Li F. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: An analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virol.* 2020; 94(7): e00127–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00127-20>
- Панютин К.К. Рукокрылые. В кн.: Кучерук В.В., ред. *Итоги мечения млекопитающих.* М.: Наука; 1980: 23–46.
- Васеньков Д.А., Васильев Н.С., Сидорчук Н.В., Рожнов В.В. Осенняя миграция гигантской вечерницы (*Nyctalus lasiopterus*): через страны и горы к новому рекорду дальности сезонных перелетов летучих мышей. *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни.* 2023; 513(1): 564–9. DOI: <https://doi.org/10.31857/S2686738923700403> EDN: <https://elibrary.ru/gtqdp1>
- Gonzalez V., Banerjee A. Molecular, ecological, and behavioral drivers of the bat-virus relationship. *iScience.* 2022; 25(8): 104779. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104779>
- Павлинов И.Я. *Звери России: справочник-определитель. Часть 1. Насекомоядные, Рукокрылые, Зайцеобразные, Грызуны.* М.: КМК; 2019.

REFERENCES

- Drosten C., Günther S., Preiser W., van der Werf S., Brodt H.R., Becker S., et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348(20): 1967–76. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030747>
- Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Isolation of a novel coronavirus from a man with

- pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367(19): 1814–20. DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1211721>
3. Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.M., Wang W., Song Z.G., et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020; 579(7798): 265–9. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
 4. Cui J., Li F., Shi Z.L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019; 17(3): 181–92. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
 5. L'vov D.K., Al'khovskii S.V. Source of the COVID-19 pandemic: ecology and genetics of coronaviruses (Betacoronavirus: Coronaviridae) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (subgenus Sarbecovirus), and MERS-CoV (subgenus Merbecovirus). *Voprosy virusologii.* 2020; 65(2): 62–70. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-62-70> (in Russian)
 6. Guan Y., Zheng B.J., He Y.Q., Liu X.L., Zhuang Z.X., Cheung C.L., et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science*. 2003; 302(5643): 276–8. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1087139>
 7. Mohd H.A., Al-Tawfiq J.A., Memish Z.A. Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) origin and animal reservoir. *Virology*. 2016; 13: 87. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0544-0>
 8. Hu B., Zeng L.P., Yang X.L., Ge X.Y., Zhang W., Li B., et al. Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLoS Pathog.* 2017; 13(11): e1006698. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006698>
 9. Murakami S., Kitamura T., Suzuki J., Sato R., Aoi T., Fujii M., et al. Detection and Characterization of bat Sarbecovirus phylogenetically related to SARS-CoV-2, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(12): 3025–9. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2612.203386>
 10. Ruiz-Aravena M., McKee C., Gamble A., Lunn T., Morris A., Snedden C.E., et al. Ecology, evolution and spillover of coronaviruses from bats. *Nat. Rev. Microbiol.* 2022; 20(5): 299–314. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00652-2>
 11. Anthony S.J., Gilardi K., Menachery V.D., Goldstein T., Ssebide B., Mbabazi R., et al. Further evidence for bats as the evolutionary source of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *mBio*. 2017; 8(2): e00373-17. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.00373-17>
 12. Wong A.C.P., Li X., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. Global epidemiology of bat coronaviruses. *Viruses*. 2019; 11(2): 174. DOI: <https://doi.org/10.3390/v11020174>
 13. Temmam S., Vongphayloth K., Baquero E., Munier S., Bonomi M., Regnault B., et al. Bat coronaviruses related to SARS-CoV-2 and infectious for human cells. *Nature*. 2022; 604(7905): 330–6. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04532-4>
 14. Drexler J.F., Gloza-Rausch F., Glende J., Corman V.M., Muth D., Goettsche M., et al. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J. Virol.* 2010; 84(21): 11336–49. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.00650-10>
 15. Balboni A., Palladini A., Bogliani G., Battilani M. Detection of a virus related to betacoronaviruses in Italian greater horseshoe bats. *Epidemiol. Infect.* 2011; 139(2): 216–9. DOI: <http://doi.org/10.1017/S0950268810001147>
 16. Monchatre-Leroy E., Boué F., Boucher J.M., Renault C., Moutou F., Ar Gouilh M., et al. Identification of alpha and beta Coronavirus in wildlife species in France: bats, rodents, rabbits, and hedgehogs. *Viruses*. 2017; 9(12): 364. DOI: <https://doi.org/10.3390/v9120364>
 17. Alkhovsky S., Lenshin S., Romashin A., Vishnevskaya T., Vyshemirsky O., Bulychева Y., et al. SARS-like coronaviruses in horseshoe bats (*Rhinolophus* spp.) in Russia, 2020. *Viruses*. 2022; 14(1): 113. DOI: <https://doi.org/10.3390/v14010113>
 18. Moreno A., Lelli D., de Sabato L., Zaccaria G., Boni A., Sozzi E., et al. Detection and full genome characterization of two beta CoV viruses related to Middle East respiratory syndrome from bats in Italy. *Virology*. 2017; 14(1): 239. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0907-1>
 19. Lau S.K.P., Fan R.Y.Y., Zhu L., Li K.S.M., Wong A.C.P., Luk H.K.H., et al. Isolation of MERS-related coronavirus from lesser bamboo bats that uses DPP4 and infects human-DPP4-transgenic mice. *Nat. Commun.* 2021; 12(1): 216. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20458-9>
 20. Wong A.C.P., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. Interspecies jumping of bat coronaviruses. *Viruses*. 2021; 13(11): 2188. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13112188>
 21. Speranskaya A.S., Artiushin I.V., Samoilo A.E., Korneenko E.V., Khabudaev K.V., Ilina E.N., et al. Identification and genetic characterization of MERS-related coronavirus isolated from *Nathusius' pipistrelle* (*Pipistrellus nathusii*) near Zvenigorod (Moscow region, Russia). *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2023; 20(4): 3702. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph20043702>
 22. Gorobeyko U.V., Kartavtseva I.V., Sheremetyeva I.N., Kazakov D.V., Guskov V.Yu. DNA-barcoding and a new data about the karyotype of *Myotis petax* (Chiroptera, Vespertilionidae) in the Russian Far East. *Comp. Cytogenet.* 2020; 14(4): 483–500. DOI: <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v14.i4.54955>
 23. Wang W., Lin X.D., Guo W.P., Zhou R.H., Wang M.R., Wang C.Q., et al. Discovery, diversity and evolution of novel coronaviruses sampled from rodents in China. *Virology*. 2015; 474: 19–27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.viro.2014.10.017>
 24. Wan Y., Shang J., Graham R., Baric R.S., Li F. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: An analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virol.* 2020; 94(7): e00127–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.00127-20>
 25. Panjutin K.K. Bats. In: Kucheruk V.V., ed. *Results of Mammal Tagging [Itogi mecheniya mlekovitayushchikh]*. Moscow: Nauka; 1980: 23–46. (in Russian)
 26. Vasen'kov D.A., Vasil'ev N.S., Sidorchuk N.V., Rozhnov V.V. Migration of the greater noctule bat (*Nyctalus lasiopterus*): across countries and mountains to a new record for the range of seasonal flights of bats. *Doklady Rossiiskoi akademii nauk. Nauki o zhizni.* 2023; 513(1): 564–9. DOI: <https://doi.org/10.31857/S2686738923700403> EDN: <https://elibrary.ru/gtqdp1> (in Russian)
 27. Gonzalez V., Banerjee A. Molecular, ecological, and behavioral drivers of the bat-virus relationship. *iScience*. 2022; 25(8): 104779. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104779>
 28. Pavlinov I.Ya. *Animals of Russia: Reference Guide. Part 1. Insectivores, Chiroptera, Lagomorpha, Rodents [Zveri Rossii: spravochnik-opredelitel'. Chast' 1. Nasekomoyadnye, Rukokrylye, Zaitseobraznye, Gryzuny]*. Moscow: KMK; 2019. (in Russian)

Информация об авторах:

Яшина Людмила Николаевна  – д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: yashina@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2844-7835>

Жигалин Александр Владимирович – канд. биол. наук, заведующий лабораторией мониторинга биоразнообразия ФГАОУ ВО НИ ТГУ, Томск; доцент ФГБОУ ВО ДГУ, Махачкала, Дагестан, Россия. E-mail: alex-zhigalin@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4661-0560>

Абрамов Сергей Александрович – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории экологии сообществ позвоночных животных ИСиЭЖ СО РАН, Новосибирск, Россия. E-mail: gterio@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-7921-6696>

Лучникова Екатерина Михайловна – канд. биол. наук, доцент кафедры экологии и природопользования ФГБОУ ВО КемГУ, Кемерово, Россия. E-mail: lut@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8245-4588>

Сметанникова Наталья Анатольевна – канд. мед. наук, старший научный сотрудник отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия. E-mail: smetannikova@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5082-8071>

Дупал Тамара Александровна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории экологии сообществ позвоночных животных ИСиЭЖ СО РАН, Новосибирск, Россия. E-mail: gf@eco.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4487-1815>

Кривоपालов Антон Викторович – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории паразитологии ИСиЭЖ СО РАН, Новосибирск, Россия. E-mail: krivopalov@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-4824-6061>

Вдовина Евгения Дмитриевна – лаборант биостанции КемГУ «Ажндарово», ФГБОУ ВО КемГУ, Кемерово. E-mail: vdovina_ed@gkl-ke-merovo.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9633-9938>

Свирин Кирилл Андреевич – аспирант ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия. E-mail: svirin_ka@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9083-1649>

Гаджиев Алимурад Ахмедович – канд. биол. наук, проректор по научной работе ФГБОУ ВО ДГУ, Махачкала, Дагестан, Россия. E-mail: ecodgu@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7359-1951>

Малышев Борис Сотиволдиевич – научный сотрудник отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия. E-mail: malyshev@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3004-3020>

Участие авторов: Яшина Л.Н. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Жигалин А.В., Абрамов С.А., Лучникова Е.М. – проведение отловов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Сметанникова Н.А., Свирин К.А., Малышев Б.С. – проведение экспериментов; Дупал Т.А., Кривоपालов А.В., Вдовина Е.Д., Гаджиев А.А. – отлов рукокрылых, сбор образцов, определение видовой принадлежности.

Поступила 18.03.2024

Принята в печать

Опубликована

Information about the authors:

Liudmila N. Yashina  – Doctor of Science (Biol.), Leading Researcher of the Department of Genomic Research, State Research Center of Virology and Biotechnology «VECTOR», Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: yashina@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2844-7835>

Alexander V. Zhigalin – Candidate of Sciences in Biology, Head of Biodiversity Monitoring Laboratory, National Research Tomsk State University, Tomsk; Associate Professor, Dagestan State University, Makhachkala, Russia. E-mail: alex-zhigalin@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4661-0560>

Sergey A. Abramov – Candidate of Sciences in Biology, Senior Researcher, Laboratory of Ecology of Vertebrate Communities, Institute of Systematics and Ecology of Animals of the Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russia. E-mail: gterio@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-7921-6696>

Ekaterina M. Luchnikova – Candidate of Sciences in Biology, Associate Professor, Department of Ecology and Environmental Management, Kemerovo State University, Kemerovo, Russia. E-mail: lut@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8245-4588>

Natalia A. Smetannikova – PhD in Medical Science, Senior Researcher, Department of Genomic Research, State Research Center of Virology and Biotechnology «VECTOR», Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: smetannikova@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5082-8071>

Tamara A. Dupal – Candidate of Sciences in Biology, Senior Researcher, Laboratory of Ecology of Vertebrate Communities, Institute of Systematics and Ecology of Animals of the Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russia. E-mail: gf@eco.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4487-1815>

Anton V. Krivopalov – Candidate of Sciences in Biology, Senior Researcher, Laboratory of Parasitology, Institute of Systematics and Ecology of Animals of the Siberian Branch of the RAS, Novosibirsk, Russia. E-mail: krivopalov@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-4824-6061>

Evgenia D. Vdovina – Laboratory assistant at the biological station of Kemerovo State University Azhendarovo, Kemerovo State University, Kemerovo, Russia. E-mail: vdovina_ed@gkl-ke-merovo.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9633-9938>

Kirill A. Svirin – Graduate student, State Research Center of Virology and Biotechnology «VECTOR», Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: svirin_ka@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9083-1649>

Alimurad A. Gadzhiev – Candidate of Sciences in Biology, Vice-Rector for Research, Dagestan State University, Makhachkala, Russia. E-mail: ecodgu@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7359-1951>

Boris S. Malyshev – Researcher, Department of Genomic Research, State Research Center of Virology and Biotechnology «VECTOR», Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: malyshev@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3004-3020>

Contribution: Yashina L.N. – the study concept and design, conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Zhigalin A.V., Abramov S.A., Luchnikova E.M. – sampling, collection, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Smetannikova N.A., Svirin K.A., Malyshev B.S. – conducting of the experiments; Dupal T.A., Krivopalov A.V., Vdovina E.D., Gadzhiev A.A. – sampling, species identification.

Received 18 March 2024

Accepted

Published

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-236>

© ALKHUZAIE A.A.M., JABBAR E.A.K., ALBADRY B.J., 2024



Electrolytes, Zinc and Vitamin D₃ in COVID-19 Patients with Cardiovascular Complications

Ali Abdel-Moneim Mohammed-Hussain AlKhuzaie^{1,2}✉, Enas Abdul Kareem Jabbar³, Bushra Jabbar Albadry¹

¹Department of Biology, College of Science, University of Thi-Qar, Thi-Qar, 64001, Iraq;

²Ministry of Education, Directorate of Education Thi-Qar, Iraq;

³Faculty of Nursing, University of Thi-Qar, Thi-Qar, 64001, Iraq

Abstract

Introduction. COVID-19 is strongly linked to cardiovascular disease, with direct myocardial injury and systemic inflammation as common mechanisms. Pre-existing or infection-induced cardiovascular disease worsens the outcomes for COVID-19 patients.

Materials and methods. To estimate the serum electrolytes (Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Zn) and vitamin D₃, the study depended on ichroma ii device for Vitamin D₃ and Chemistry Analyzer for electrolytes in patient samples.

Results. A study was conducted on 192 individuals diagnosed with COVID-19, including 35 critical cases, 53 severe cases, 54 moderate cases, and 50 individuals in a control group. The age group with the highest prevalence of infection was between 50–69 years, while the lowest prevalence was observed in those under 30 years. The study found significant decreases in calcium, potassium, sodium, zinc, and vitamin D₃ levels among COVID-19 patients compared to the control group. Zinc and vitamin D₃ levels showed a significant correlation with sex, with males experiencing a decline in zinc levels and females having lower vitamin D₃ levels. The concentration of calcium, sodium, and zinc showed a negative correlation with age, with older patients having the lowest levels. COVID-19 patients with chronic cardiac issues and high blood pressure exhibited the lowest levels of these markers. The severity of the disease also had a detrimental impact on electrolyte levels, zinc, and vitamin D₃, with critical cases showing the lowest levels. The complications such as heart failure were associated with lower levels of potassium, sodium, and zinc.

Conclusion. In conclusion, the study revealed significant associations between COVID-19 and decreased electrolyte levels, zinc, and vitamin D₃. Sex and age were found to be correlated with these markers. Patients with chronic cardiac issues and high blood pressure exhibited the lowest levels of these markers. The severity of the disease was also linked to lower electrolyte levels, zinc, and vitamin D₃. Complications such as heart failure were associated with decreased levels of potassium, sodium, and zinc.

Keywords: COVID-19; Cardiovascular; Vitamin D₃; Zinc; electrolyte

For citation: AlKhuzaie A.A.M., Jabbar E.A.K., Albadry B.J. Electrolytes, Zinc and Vitamin D₃ in COVID-19 Patients with Cardiovascular Complications. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(3): 266–276 DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-236> EDN: <https://elibrary.ru/mjyyjw>

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

Acknowledgement. Thanks and appreciation to Thi-Qar Health Department/Imam Hussein Teaching Hospital and Nasiriyah Heart Center for granting me approvals and completing this research.

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 Institution Department of Biology, College of Science, University of Thi-Qar (Protocol No. 22 dated 2/5/2021).

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-236>

Электролиты, цинк и витамин D₃ у пациентов с COVID-19 с сердечно-сосудистыми осложнениями

Ali Abdel-Moneim Mohammed-Hussain AlKhuzai^{1,2}✉, Enas Abdul Kareem Jabbar³, Bushra Jabbar Albadry¹¹Факультет биологии, Колледж естественных наук, Университет Ти-Кар, Ти-Кар, 64001, Ирак;²Министерство образования, Управление образования Ти-Кар, Ирак;³Факультет сестринского дела, Университет Ти-Кар, Ти-Кар, 64001, Ирак

Резюме

Введение. COVID-19 тесно связан с сердечно-сосудистыми заболеваниями, общими механизмами которых являются прямое повреждение миокарда и системное воспаление. Ранее существовавшие или вызванные инфекцией сердечно-сосудистые заболевания ухудшают исходы для пациентов с COVID-19.

Материалы и методы. В образцах сыворотки крови пациентов проводили количественное определение электролитов (Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Zn) с помощью биохимического анализатора и витамина D₃ с помощью устройства ichroma ii.

Результаты. В исследовании приняли участие 142 пациента с диагнозом COVID-19, включая 35 критических случаев, 53 тяжелых случая, 54 среднетяжелых случая, а также 50 человек в контрольной группе. Возрастная группа с наибольшей распространенностью инфекции составила 50–69 лет, а наименьшая распространенность наблюдалась среди лиц моложе 30 лет. Исследование выявило значительное снижение уровней кальция, калия, натрия, цинка и витамина D₃ среди пациентов с COVID-19 по сравнению с контрольной группой. Уровни цинка и витамина D₃ продемонстрировали значительную корреляцию с полом: у мужчин наблюдалось снижение уровня цинка, а у женщин – более низкий уровень витамина D₃. Концентрация кальция, натрия и цинка имела отрицательную корреляцию с возрастом, при этом у пожилых пациентов наблюдалась самая низкая концентрация. У пациентов с COVID-19 с хроническими заболеваниями сердца и высоким кровяным давлением наблюдались самые низкие уровни этих маркеров. Тяжесть заболевания также оказывала пагубное влияние на уровень электролитов, цинка и витамина D₃, при этом в критических случаях COVID-19 наблюдались самые низкие уровни. Такие осложнения, как сердечная недостаточность, были связаны с более низким уровнем калия, натрия и цинка.

Вывод. Исследование выявило значительную связь между COVID-19 и снижением уровней электролитов, цинка и витамина D₃. Было обнаружено, что пол и возраст коррелируют с этими маркерами. У пациентов с хроническими сердечно-сосудистыми заболеваниями и высоким кровяным давлением наблюдались самые низкие уровни этих маркеров. Тяжесть заболевания COVID-19 также была связана с более низким уровнем электролитов, цинка и витамина D₃. Такие осложнения, как сердечная недостаточность, были связаны со снижением уровней калия, натрия и цинка.

Ключевые слова: COVID-19; сердечно-сосудистые заболевания; витамин D₃; цинк; электролиты

Для цитирования: AlKhuzai A.A.M., Jabbar E.A.K., Albadry B.J. Электролиты, цинк и витамин D₃ у пациентов с COVID-19 с сердечно-сосудистыми осложнениями. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(3): 266–276. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-236> EDN: <https://elibrary.ru/mjyyjw>

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

Благодарность. Авторы благодарят Департамент здравоохранения Ти-Кар, больницу Имама Хусейна, кардиологический центр Насирии за поддержку в 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. Протокол исследования одобрен этическим комитетом факультета биологии Научного колледжа Университета Ти-Кара (Протокол №. 22 от 02.05.2021).

Introduction

Global Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), commonly known as severe acute respiratory syndrome 2, is a serious disease caused by coronavirus SARS-CoV-2, affecting the lives of all people in the world. Several previous studies have shown that SARS-CoV-2 is similar in many biological features to SARS-CoV, including the way it enters host cells, by binding to a spike protein with angioten-

sin-converting enzyme 2 (ACE2) [1]. SARS-CoV is an animal virus that caused the outbreak of severe acute respiratory syndrome in 2002 [2]. COVID-19 infection can lead to long-term difficulties due to many physiological factors, however the specific processes behind these consequences are still not fully understood. SARS-CoV-2 has both a direct and indirect pathogenic impact. Given that the virus depends on ACE2 for infecting the target cell, and as previously stated, ACE2 is present in numerous cells through-

out the body, the virus will directly impact the organs it invades [3, 4]. The virus can directly harm organs that contain cells with the ACE2 enzyme, such as the respiratory system, heart, blood vessels, pancreas, and others, leading to long-term consequences. Furthermore, the indirect impact of infection may be attributed to several factors such as immune system dysfunction, acute infections, blood coagulation, hypoxia, and acid-base imbalance. Additionally, it is worth noting the adverse psychological impacts experienced by the patient [5].

Several clinical studies have reported an association between COVID-19 and cardiovascular disease. Patients with pre-existing chronic cardiovascular disease appear to be closely associated with a worse outcome and an increased risk of dying with COVID-19 [6]. Also, COVID-19 can cause cardiovascular problems including acute coronary syndrome, arrhythmias, venous thromboembolism, and others. This is done through the host cell receptors of the virus, ACE2, which is found in the cells of the heart and blood vessels [7]. Therefore, COVID-19 can exacerbate underlying cardiovascular conditions and even precipitate new heart complications. Mechanistically, the interaction between S protein and ACE2 plays a major role in pathogenesis, particularly in cardiovascular manifestations [8]. Potential interactions between infection with COVID-19, comorbid cardiovascular disease, and medications are of serious concern [9].

Material and method

Study Design

The study was carried out in the Al-Hussein Teaching Hospital, the Nasiriyah Heart Center, and several isolation centers in Thi-Qar Governorate. It was a case-control study that was done at the hospital level. To obtain total of 192 blood samples from patients with 50 as control sample, a basic random sample method was employed. Arterial and venous blood samples were obtained from both COVID-19 patients and the control group in the following manner: Approximately seven milliliters of each sample were taken and then split into two parts. Initially, a volume of 6 ml was transferred into a gel tube and allowed to stand at room temperature for roughly 30 minutes. The remaining portion was transferred to an EDTA tube. The gel tubes were subjected to centrifugation at a speed of 4000 revolutions per minute for a duration of 5 minutes. The resulting serum sample was divided into three separate portions, each containing approximately 500 μ l, and stored in deep freeze at a temperature of -20°C . Blood samples in the EDTA tube were promptly utilized for the determination of complete blood counts after thorough mixing. The serum separated was used for the estimation of Serum electrolytes (Na^+ , K^+ , Ca^{++} , Zn) by using ichroma ii device for Vitamin D_3 and Chemistry Analyze for electrolytes.

Ethics

The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Institution Department of Biology, College of Science, University of Thi-Qar (Protocol No. 22 dated 2/5/2021).

Criteria for Selection and Exclusion

This research project includes individuals who have been diagnosed with COVID-19 and were admitted to Imam Hussein Teaching Hospital, Nasiriyah Heart Center, and some isolation centers in Thi-Qar Governorate, of both sexes and the age up to > 69 years. Patients who did not provide a sufficient sample and the patients whose data we could not obtain well were excluded from the study.

Statistical Analysis

Version 26 of the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) was utilized to conduct the statistical analysis. To compare the groups statistically, independent sample T test for mean comparison between patients and control group and one way ANOVA for mean comparison between groups were employed.

Results

Descriptive of Data Study

This study focuses on individuals diagnosed with COVID-19 and encompasses a total of 192 samples. These samples are categorized based on the degree of the infection, with 35 instances classified as critical, 53 cases as severe and 54 cases as moderate and 50 samples serving as a control group. **Figure 1** illustrates the distribution of samples.

Figure 2 illustrates the distribution of COVID-19 patients in this study based on their age and gender. The age group with the highest prevalence of COVID infection among both males and females is between 50–69 years, whereas the age group with the lowest prevalence is under 30 years.

Imbalances in Electrolytes, Zinc, and Vitamin D_3 in Patients

The findings of the present investigation indicate an imbalance in the concentrations of calcium, potassium, sodium, zinc, and vitamin D_3 among those affected by COVID-19. Patients exhibited a significant decrease in all of these indicators compared to the control group, with a significance level of < 0.05 . **Table 1** displays this information.

Electrolytes, Zinc, and Vitamin D_3 in patient by gender

The findings presented in **Table 2** indicate a statistically significant correlation, with a significance level of > 0.05 , between sex and the levels of zinc and vitamin D_3 in COVID-19 patients. However, no significant differences associated with gender were recorded in this study for the electrolyte group. Males exhibited the most significant decline in zinc levels, whereas females have lower levels of vitamin D_3 compared to males.

Association of Patients' Age with Low Electrolytes, Zinc and Vitamin D_3 during COVID-19 Infection

The present study demonstrated a notable negative correlation between the age of individuals with COVID-19 and their concentrations of calcium, sodium, and zinc, with statistical significance at a level below 0.05. The group of

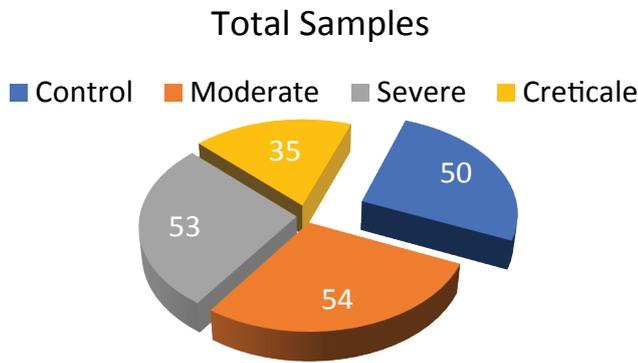


Fig. 1. Distribution of all study samples, including those from patients and the control group.

Рис. 1. Распределение исследованных образцов от пациентов и контрольной группы.

All Patients (Age & Gender)

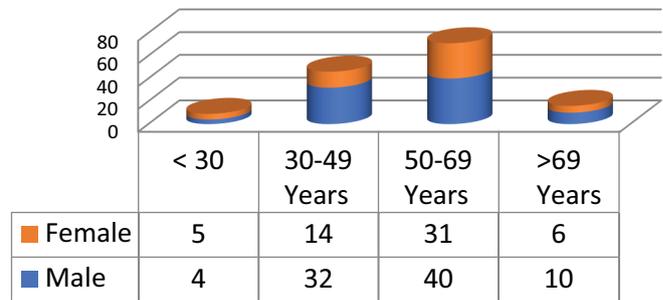


Fig. 2. The distribution of COVID-19 patients by age and gender.

Рис. 2. Распределение пациентов с COVID-19 по возрасту и полу.

Table 1. Calcium, Potassium, Sodium, Zinc and Vitamin D₃ in COVID-19 patients and control group

Таблица 1. Уровни кальция, калия, натрия, цинка и витамина D₃ у пациентов с COVID-19 и в контрольной группе

Parameters	Mean ± standard deviation		T-test Value
	Control	Patients	
Ca ⁺	9.620 ± 0.324	8.660 ± 1.574	0.045
K ⁺	4.537 ± 0.446	3.370 ± 0.712	< 0.001
Na ⁺	140.3 ± 10.83	137.1 ± 17.52	0.004
Zn	110.0 ± 16.39	90.3 ± 24.049	< 0.001
VD ₃	24.28 ± 6.057	14.70 ± 5.406	< 0.001

Table 2. Electrolytes, zinc, and vitamin D₃ in COVID-19 patients by gender

Таблица 2. Уровни электролитов, цинка и витамина D₃ у пациентов с COVID-19 в зависимости от пола

Parameters	Mean ± standard deviation		T-test Value
	Male	Female	
Ca ⁺	8.691 ± 1.631	8.619 ± 1.497	0.791
K ⁺	3.583 ± 0.709	3.274 ± 0.924	0.097
Na ⁺	136.4 ± 9.812	138.3 ± 7.787	0.132
Zn	85.69 ± 25.10	97.54 ± 20.53	0.004
VD ₃	16.79 ± 5.211	11.60 ± 4.048	< 0.001

patients above the age of 69 years had the lowest levels of these markers. The detailed data are shown in **Table 3**.

The Effect of Chronic Diseases on the Levels of Electrolytes, Zinc, and Vitamin D₃ in COVID-19 Patients

Chronic disorders have a substantial impact on the values of some parameters documented in **Table 4**. The present findings demonstrated statistically significant variations at a significance level of < 0.05 for calcium, potassium, sodium, zinc, and vitamin D₃ among patients based on their chronic illnesses. COVID-19 patients with pre-existing conditions of chronic cardiac issues and chronic high blood pressure exhibited the lowest levels of these measures. The highest level was found in patients without any chronic illnesses.

Correlation between the Severity of COVID-19 Infection and the Levels of Electrolytes, Zinc, and Vitamin D₃

The findings of the present study, as presented in **Table 5**, indicate that the severity of the disease has a detrimental impact on the levels of electrolytes, zinc, and vitamin D₃. The group of patients with critical conditions exhibited the lowest levels for all of these parameters, in contrast to those with moderate or severe cases. These results are statistically significant at level of less than 0.05.

Electrolyte, Zinc and Vitamin D₃ Levels According to Disease Complications Resulting from COVID-19 Infection

The current results showed a significant variation in the levels of potassium, sodium, and zinc in COVID-19 patients depending on the disease complications resulting

Table 3. Electrolytes, zinc and vitamin D₃ in COVID-19 patients by age

Таблица 3. Уровни электролитов, цинка и витамина D₃ у пациентов с COVID-19 в зависимости от возраста

Age Groups Parameters		Mean & Std.	ANOVA Sig.	LSD Sig.
Ca ⁺	< 30 Years	10.92 ± 1.620	< 0.001	0.018 ^{1,2} , 0.001 ^{1,3} , 0.001 ^{1,4} , 0.006 ^{2,3} , 0.001 ^{2,4} , 0.001 ^{3,4} .
	30–49 Years	8.843 ± 1.417		
	50–69 Years	8.177 ± 1.385		
	> 69 Years	6.180 ± 1.257		
K ⁺	< 30 Years	3.435 ± 0.275	0.143	NS ^{1,2} , NS ^{1,3} , NS ^{1,4} , N ^{2,3} , NS ^{2,4} , NS ^{3,4}
	30–49 Years	3.564 ± 0.704		
	50–69 Years	3.284 ± 0.738		
	> 69 Years	3.104 ± 0.721		
Na ⁺	< 30 Years	141.2 ± 13.30	0.002	NS ^{1,2} , NS ^{1,3} , 0.001 ^{1,4} , NS ^{2,3} , 0.001 ^{2,4} , 0.001 ^{3,4}
	30–49 Years	137.8 ± 6.747		
	50–69 Years	137.6 ± 16.12		
	> 69 Years	131.0 ± 12.74		
Zn	< 30 Years	109.6 ± 8.688	0.001	NS ^{1,2} , 0.003 ^{1,3} , 0.006 ^{1,4} , 0.005 ^{2,3} , 0.029 ^{2,4} , NS ^{3,4}
	30–49 Years	97.46 ± 19.35		
	50–69 Years	85.04 ± 26.00		
	> 69 Years	82.76 ± 24.04		
VD ₃	< 30 Years	15.51 ± 3.407	0.318	NS ^{1,2} , NS ^{1,3} , NS ^{1,4} , NS ^{2,3} , NS ^{2,4} , NS ^{3,4}
	30–49 Years	15.28 ± 5.323		
	50–69 Years	13.04 ± 5.829		
	> 69 Years	12.81 ± 4.246		

Table 4. Electrolytes, zinc and vitamin D₃ in COVID-19 patients by chronic diseases

Таблица 4. Уровни электролитов, цинка и витамина D₃ у пациентов с COVID-19 в зависимости от хронических заболеваний

Chronic Disease Parameters		Mean & Std.	ANOVA Sig.	LSD Sig.
Ca ⁺	Non	9.932 ± 1.591	0.054	0.024 ^{1,2} , NS ^{1,3} , NS ^{1,4} , NS ^{1,5} , NS ^{2,3} , NS ^{2,4} , NS ^{2,5} , NS ^{3,4} , NS ^{3,5} , NS ^{4,5}
	HBP	7.042 ± 1.551		
	DM	8.925 ± 1.285		
	Heart problems	8.762 ± 1.381		
	Mix	8.808 ± 1.404		
K ⁺	Non	3.691 ± 0.668	<0.001	0.001 ^{1,2} , NS ^{1,3} , 0.001 ^{1,4} , 0.001 ^{1,5} , 0.001 ^{2,3} , NS ^{2,4} , NS ^{2,5} , 0.001 ^{3,4} , 0.001 ^{3,5} , NS ^{4,5}
	HBP	3.091 ± 0.649		
	DM	3.442 ± 1.193		
	Heart problems	3.063 ± 0.611		
	Mix	3.098 ± 0.925		
Na ⁺	Non	139.6 ± 6.291	0.001	0.016 ^{1,2} , NS ^{1,3} , 0.008 ^{1,4} , NS ^{1,5} , 0.025 ^{2,3} , NS ^{2,4} , NS ^{2,5} , 0.016 ^{3,4} , NS ^{3,5} , 0.016 ^{4,5}
	HBP	132.5 ± 6.960		
	DM	137.3 ± 11.23		
	Heart problems	131.3 ± 12.54		
	Mix	137.8 ± 11.02		
Zn	Non	94.10 ± 22.32	<0.001	0.018 ^{1,2} , NS ^{1,3} , 0.003 ^{1,4} , NS ^{1,5} , NS ^{2,3} , NS ^{2,4} , NS ^{2,5} , NS ^{3,4} , NS ^{3,5} , NS ^{4,5}
	HBP	75.60 ± 21.97		
	DM	86.22 ± 22.91		
	Heart problems	69.90 ± 23.86		
	Mix	80.54 ± 37.05		
VD ₃	Non	17.54 ± 5.286	0.008	NS ^{1,2} , NS ^{1,3} , 0.012 ^{1,4} , NS ^{1,5} , NS ^{2,3} , NS ^{2,4} , NS ^{2,5} , NS ^{3,4} , NS ^{3,5} , NS ^{4,5}
	HBP	14.78 ± 6.037		
	DM	14.90 ± 6.301		
	Heart problems	12.12 ± 4.764		
	Mix	15.71 ± 5.589		

Table 5. Electrolytes, zinc and vitamin D₃ in COVID-19 patients by the severity of infection

Таблица 5. Уровни электролитов, цинка и витамина D₃ у пациентов с COVID-19 в зависимости от тяжести инфекции

Severity Parameters		Mean & Std.	ANOVA Sig.	LSD Sig.
Ca ⁺	Moderate	8.338 ± 1.461	0.048	NS ^{1,2} , 0.001 ^{1,3} , 0.001 ^{2,3}
	Severe	8.169 ± 1.524		
	Critical	7.857 ± 1.577		
K ⁺	Moderate	3.497 ± 0.719	NS	NS ^{1,2} , NS ^{1,3} , NS ^{2,3}
	Severe	3.338 ± 0.625		
	Critical	3.264 ± 0.815		
Na ⁺	Moderate	138.9 ± 5.896	0.001	NS ^{1,2} , 0.010 ^{1,3} , NS ^{2,3}
	Severe	136.5 ± 6.485		
	Critical	135.3 ± 10.35		
Zn	Moderate	109.0 ± 10.98	<0.001	0.001 ^{1,2} , 0.001 ^{1,3} , 0.001 ^{2,3}
	Severe	85.28 ± 21.61		
	Critical	69.28 ± 21.09		
VD ₃	Moderate	15.35 ± 5.366	<0.001	NS ^{1,2} , NS ^{1,3} , NS ^{2,3}
	Severe	14.39 ± 4.932		
	Critical	12.37 ± 3,536		

from it, at a level of statistical significance < 0.05. The lowest level of these parameters was recorded in COVID-19 patients who developed heart failure as an outcome of the infection, as shown in **Table 6**.

Discussion

Perhaps more than any other infectious disease, COVID-19 has captured the attention of cardiologists because of its clear association with cardiovascular disease. Direct myocardial injury due to viral involvement of cardiomyocytes and the effect of systemic inflammation appear to be the most common mechanisms responsible for cardiac injury [10, 11]. The presence of pre-existing and/or infection-induced cardiovascular disease has been consistently shown to be associated with a significantly worse outcome in COVID-19 patients [12].

The current study included 142 people with COVID-19 infection and 50 samples as a control group (192 total samples). Infections were distributed among patients according to gender, and the percentage of male patients infected with COVID-19 was 60.6%, while 39.4% were females. The results of the current study are in agreement with most previous studies, including the study by Su et al. [13]. It differs from the results of a study Al-Hijaj et al. [14] in Basra, which recorded a higher infection rate among females instead of males. Moreover, the study Mukherjee and Bahan [15] stated that even if the infection rate was equal between males and females, the infection would be more severe and dangerous in males. Among the most important factors that lead to an increase in infection among males compared to females, are hormonal factors, as scientific research confirms that sex hormones contribute to increasing males' susceptibility to infection with COVID-19 [16]. It is believed that the presence of

ACE2 receptors in testicular tissue in men increases the likelihood of exposure to the virus and the development of infection [17]. Social and professional factors play a major role in increasing infection in males, as males are exposed to the virus, such as work that requires physical presence and interaction with others. In addition, men may have a higher proportion of social gatherings that expose them to the risk of infection than women [18]. It should be noted that these factors vary according to the cultural, social, and demographic context of each region.

Depending on age, the current study recorded that the age group ranging from 50 to 69 years includes the largest number of COVID-19 patients, their percentage to the total study population being 50%, and their infection is more serious. Meanwhile, the lowest percentage of patients is 6.3% within the age group less than 35 years. This result is consistent with Mushtaq et al. [19], and differs with Davies et al. [20], which stated that the most common detection of COVID cases is in age groups under 50 years old, because they are more socially active, which increases the chances of exposure to the virus. The high rate of infection in advanced age groups, as shown in the results of the current study, may be attributed to several important factors, including the immune system and chronic diseases [21]. Older people may have an immune system that is less able to fight infection and thus increases the likelihood of developing serious symptoms resulting from infection. Moreover, the presence of underlying medical conditions such as respiratory diseases, diabetes, and cardiovascular disease can increase the risk of infection.

COVID-19 patients were divided in this study based on the severity of the disease, and among them were 54 moderate cases, 53 severe cases, and 35 critical

Table 6. The relationship between electrolytes, zinc and vitamin D₃ in COVID-19 patients and the disease complications

Таблица 6. Взаимосвязь между уровнями электролитов, цинка и витамина D₃ у пациентов с COVID-19 и осложнениями заболевания

Complication Parameters		Mean & Std.	ANOVA Sig.	LSD Sig.
Ca ⁺	Non	8.993 ± 1.581	NS	NS ^{1,2} , NS ^{1,3} , NS ^{1,4} , NS ^{1,5} , NS ^{1,6} , NS ^{2,3} , NS ^{2,4} , NS ^{2,5} , NS ^{2,6} , NS ^{3,4} , NS ^{3,5} , NS ^{3,6} , NS ^{4,5} , NS ^{4,6} , NS ^{5,6}
	MI	8.662 ± 1.364		
	HF	8.400 ± 1.104		
	Arrhythmia	8.783 ± 2.319		
	PE	8.350 ± 1.034		
	MIX	8.060 ± 2.617		
	K ⁺	Non		
MI		3.953 ± 0.528		
HF		3.060 ± 0.282		
Arrhythmia		2.393 ± 0.344		
PE		3.555 ± 0.967		
MIX		3.302 ± 0.791		
Na ⁺		Non	139.8 ± 7.118	0.003
	MI	137.2 ± 8.972		
	HF	132.0 ± 2.000		
	Arrhythmia	136.0 ± 2.190		
	PE	138.2 ± 6.751		
	MIX	135.0 ± 15.82		
	Zn	Non	95.08 ± 21.62	
MI		77.40 ± 24.01		
HF		66.25 ± 38.60		
Arrhythmia		75.16 ± 15.83		
PE		69.25 ± 29.74		
MIX		67.84 ± 21.19		
VD ₃		Non	16.75 ± 5.442	NS
	MI	14.87 ± 6.895		
	HF	13.50 ± 4.203		
	Arrhythmia	15.33 ± 5.573		
	PE	14.00 ± 1.414		
	MIX	13.40 ± 5.594		

cases (38%, 37.3%, 24.7%, respectively), and there was no statistically significant relationship between them. This may be since these samples were collected in isolation centers, and that most COVID-19 patients who have a mild or moderate infection do not visit hospitals, as do severe and critical cases that require immediate intervention due to shortness of breath and lack of oxygen, as well as severe inflammatory symptoms resulting from their infection. Of course, the percentages of severity of COVID-19 infection vary in different countries, due to many factors such as the health policies, the health care system, circulating strains, the level of vaccination, and demographic factors [22].

According to a study Elham et al. [23], there is a clear decrease in the levels of calcium, potassium, sodium, zinc, and vitamin D₃ in COVID-19 patients, and this was

proven by the results of the current study when comparing these parameters in COVID-19 patients compared to the control group. Calcium plays a critical role in supporting both cellular and humoral immunity, and there is widespread recognition of an increased risk of respiratory virus-related illness in individuals with a low calcium intake, compared to those with a normal calcium intake [24]. Potassium is the most abundant cation within cells with its share approximately 98%. It has several important functions, including transmitting electrical impulses in the heart, acid-base regulation, and fluid balance, and is essential for muscle and nerve function [25]. Blood potassium imbalance results in adverse complications including muscle weakness and arrhythmia [26]. Important causes of hypokalemia in these patients include malnutri-

tion due to anorexia, decreased intake of potassium-rich foods including fruits and vegetables, diarrhea and vomiting due to illness, and of course increased potassium loss due to diuretic therapy [27]. Some medications used to treat COVID-19, such as azithromycin and hydroxymelroquine, lead to hypokalemia. Hyperaldosterism caused by activation of the renin-angiotensin system stimulates the release of potassium through urine [28].

As for the causes of hyponatremia, this may be due to the loss of sodium in the urine [29]. Severe hyponatremia has significant associated morbidity and mortality and is a well-known complication of water intoxication, especially in older patients with an impaired thirst mechanism who are advised to increase fluid intake during chronic illness. Subsequently, all patients were counselled regarding fluid intake, and specific advice was given regarding symptoms that may represent water intoxication, where sodium monitoring on a more frequent than routine basis may be warranted. Although we cannot be certain of the cause of increased urinary sodium loss, it is possible that it represents a stress response, due to increased levels of urinary catecholamine's, heart dysfunction, resulting in hypervolemia and sodium deficiency [30].

Zinc deficiency in COVID-19 patients is due to respiratory infection depleting zinc in the body, as it is consumed in the inflammation and healing processes. In addition to malnutrition caused by anorexia, severe stress leads to high levels of some proteins that cause zinc consumption [31]. It is reported that high body temperatures in COVID-19 patients lead to loss of zinc through sweating [32]. Inflammatory stress often causes a negative zinc balance by utilizing plasma zinc and causing the release of zinc from liver mineral-bound protein aggregates into the plasma. Although zinc has different effects, it plays an important role in the immune system. Zinc deficiency may lead to weakened immunity and increased risk of infection. Zinc also has anti-inflammatory effects and reduces cytokine production [31]. In these findings, as patients had decreased zinc levels, zinc was released from cells to rescue inflammatory stress that may have persisted over the course of cytokine generation. Given these findings and effects, zinc is an essential mineral to prevent the progression and worsening of COVID-19 infection. Low vitamin D₃ has negative consequences for COVID-19 patients. Its low level may occur in patients due to malnutrition and psychological stress, in addition to calcium deficiency, which plays an important role in the absorption of vitamin D₃ [33]. There is no doubt that lack of exposure to ultraviolet rays from sunlight, which stimulates the synthesis of vitamin D₃, causes the decrease.

The current study found a clear significant difference in the levels of zinc and vitamin D₃ depending on the gender of the patients, as the level of zinc decreased more in males than in females, and this is consistent with what was mentioned in the study by Maares et al. [34], where male gender is considered a risk factor. On the contrary, a greater decrease in vitamin D₃ was recorded in females compared to males with COVID-19 infection. This result is consistent with a study [35]. Environmental influences and smoking may have a negative effect on zinc levels

in males. While the decrease in vitamin D₃ in females is greater than in males, perhaps due to lack of activity and exposure to sunlight compared to males, as well as due to some medical factors such as digestive disorders and malabsorption [36].

Calcium, sodium, and zinc all have a significant negative relationship with the age of patients infected with COVID-19, as the results of the current study demonstrated a greater decrease in these parameters as age increases. These results are consistent with the study by Elham et al. [23]. The reason may be due to disturbances in the digestive system associated with aging, and thus its efficiency in absorbing these minerals decreases [37]. In addition, older adults take some different medications that negatively affect the balance of minerals in the body, such as blood pressure medications and diuretics. Also, hormonal changes in the elderly, such as a deficiency in the hormone parathormone, which regulates calcium levels, lead to its imbalance in the blood [38].

The results of the current study demonstrated that the levels of potassium, sodium, zinc, and vitamin D₃ are affected by the presence of chronic diseases in COVID-19 patients. The greatest decrease in these parameters was recorded in patients with a history of heart problems, chronic high blood pressure, and diabetes. This result is consistent with a study by Severino et al. [39], which reported a relationship between potassium, sodium, zinc, D₃, and heart problems. It is known and proven in the current study that the level of B-type natriuretic peptide (BNP) increases in patients with critical and severe conditions, as well as in the presence or occurrence of cardiovascular complications, which causes a decrease in the levels of calcium and sodium because of their excretion through the urine [40]. Moreover, liver and kidney functions decline with age, and thus the absorption of vitamin D₃ decreases, which leads to a disturbance in the level of minerals, especially calcium. As the severity of COVID-19 infection in patients increases, these parameters decrease further [41], which is literally consistent with the results of the current study.

Changes in the level of minerals within the cells promote the activation of inflammatory pathways. Calcium plays an important role in many important functions including the blood clotting process. Calcium deficiency affects the function of the heart, as it leads to decreased contraction in the left ventricle, because the flow of calcium into the cell is primarily responsible for the initiation and extent of heart contraction. This results in fibrillation, atrial flutter, and arrhythmia [42]. Potassium has a role in the functioning of the heart, as a decrease in it causes irregular heartbeat, as happens with a calcium deficiency, which leads to a prolongation of the QT interval. Pulmonary arterial thrombosis is caused by arrhythmia caused by potassium deficiency during COVID-19 infection [43]. Hyponatremia leads to greater activation of the RAAS system, starting a vicious cycle. It also causes congestive heart failure and atrial fibrillation [44]. Some studies indicate a disturbance in the functioning of the hormone vasopressin, which regulates and controls the amount of water that is filtered from the kidneys. IL-6 as-

sociated with COVID-19 infection could be a cause of the syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion (SIADH) caused by cytokine release or due to lung tissue and alveolar cell injury that induces SIADH via hypoxic pulmonary vasoconstriction [45]. Therefore, low sodium could be an indicator of respiratory failure.

Zinc has antiviral properties, as it inhibits the synthesis of viral RNA and prevents its replication. It prevents the interaction of the viral S protein with ACE2 and thus reduces the severity of the infection [46]. Zinc binds to RNA-dependent RNA polymerase causing inhibition of elongation and reduced binding of the viral mRNA template [47]. Low zinc impairs lymphoid tissue development and reduces natural killer cell function, thus impairing innate immunity. Its decrease is also linked to macrophage activation and cytokine generation [48]. There is a relationship between low zinc and cardiovascular disease because its presence reduces ROS, which, when elevated, causes oxidative stress, which is a cause of cardiovascular disease, as it causes activation of inflammatory pathways and stimulation of cytokines and enzymes associated with inflammation [49]. There are 24 zinc transporters in the heart, so any disturbance in the level of zinc causes cardiovascular diseases such as the development of arterial hypertension as well as coronary heart disease, and its deficiency causes thickening of the walls of blood vessels [50]. Serum zinc levels can be an indicator for the diagnosis of acute myocardial infarction [51].

Vitamin D₃ deficiency leads to many heart problems, including heart arrhythmia, heart failure, and sometimes clotting [52]. Myocardium contains vitamin D₃ receptors and has anti-hypertrophic effects and regulates calcium influx and thus increases myocardial contractility. Therefore, congestive heart failure occurs in cases of vitamin D₃ deficiency [53]. Its receptors are also found throughout the blood vessels, where it has an important role in preventing atherosclerosis and the occurrence of blood clots because it stimulates the production of endothelial nitric oxide, downregulates pro-coagulant tissue factors, and promotes vascular repair [54]. Therefore, cardiovascular problems such as high blood pressure and blood clotting occur in COVID-19 patients who suffer from a deficiency in the level of vitamin D₃. Vitamin D₃ reduces the severity of COVID-19 infection, as it directly suppresses the transcription of the renin gene, thus dilating blood vessels.

Conclusion

In conclusion, the study revealed significant associations between COVID-19 and decreased levels of calcium, potassium, sodium, zinc, and vitamin D₃. Sex and age were found to be correlated with these markers, with males experiencing a decline in zinc levels and older patients having the lowest concentrations of calcium, sodium, and zinc. Patients with chronic cardiac issues and high blood pressure exhibited the lowest levels of these markers. The severity of the disease was also linked to lower electrolyte levels, zinc, and vitamin D₃, with critical cases showing the most significant decline. Complications such as heart failure were associated with decreased levels of potassium, sodium, and zinc.

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Montezano A.C., Camargo L.L., Mary S., Neves K.B., Rios F.J., Stein R., et al. SARS-CoV-2 spike protein induces endothelial inflammation via ACE2 independently of viral replication. *Sci. Rep.* 2023; 13(1): 14086. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-023-41115-3>
- Akshay P.S., Veena S.M., Teja K.B., Tomar S.J. Severe Acute Respiratory Syndrome associated Corona Virus [SARS-CoV]. In: *Emerging Human Viral Diseases, Volume I: Respiratory and Haemorrhagic Fever*. Singapore: Springer Nature Singapore; 2023: 157–87. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-99-2820-0_5
- Grubišić B., Švitek L., Ormanac K., Sabo D., Mihaljević I., Bilić-Ćurčić I., et al. Molecular mechanisms responsible for diabetogenic effects of COVID-19 infection – induction of autoimmune dysregulation and metabolic disturbances. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(14): 11576. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms241411576>
- Hadi H.S., Enayah S.H. Effects of COVID-19 infection on some pancreatic functions in diabetic patients at Thi-Qar province/Iraq. *Univ. Thi-Qar J. Sci.* 2022; 9(2): 66–74. DOI: <https://doi.org/10.32792/utq/utjsci/v9i2.906>
- Tyagi K., Rai P., Gautam A., Kaur H., Kapoor S., Suttee A., et al. Neurological manifestations of SARS-CoV-2: Complexity, mechanism and associated disorders. *Eur. J. Med. Res.* 2023; 28(1): 307. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40001-023-01293-2>
- Alhawiti N.M., Alhawiti J.M., Alshalan S.D., Alotaibi B.A., Khobrani A.Y. Clinical outcomes of anticoagulant therapy in COVID-19 patients with pre-existing cardiovascular diseases: a systematic review. *Infect. Drug Resist.* 2023; 16: 3767–75. DOI: <https://doi.org/10.2147/IDR.S410374>
- Bilehjani E., Fakhari S., Farzin H., Tajlil A., Nader N.D. Diagnosis and treatment of cardiovascular manifestations of COVID-19: A narrative review. *Acta Cardiol.* 2024; 79(3): 267–73. DOI: <https://doi.org/10.1080/00015385.2023.2246200>
- Pannucci P., Jefferson S.R., Hampshire J., Cooper S.L., Hill S.J., Woolard J. COVID-19-Induced myocarditis: Pathophysiological roles of ACE2 and toll-like receptors. *Int. J. Mol. Sci.* 2023; 24(6): 5374. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms24065374>
- Chatterjee S., Nalla L.V., Sharma M., Sharma N., Singh A.A., Malim F.M., et al. Association of COVID-19 with comorbidities: an update. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* 2023; 6(3): 334–54. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsp.3c00181>
- Alsaidan A.A., Al-Kuraishy H.M., Al-Gareeb A.I., Alexiou A., Papadakis M., Alsayed K.A., et al. The potential role of SARS-CoV-2 infection in acute coronary syndrome and type 2 myocardial infarction (T2MI): Intertwining spread. *Immun. Inflamm. Dis.* 2023; 11(3): e798. DOI: <https://doi.org/10.1002/iid3.798>
- Musa M. The Prevalence and the significance of the pulmonary bacterial super-infections among hospitalized COVID-19 patients: A scoping Review. *Univ. Thi-Qar J. Sci.* 2023; 10(1). DOI: <https://doi.org/10.32792/utq/utjsci/v10i1.930>
- McGuone D., Farrand N., Prizeman G., O'Brien F. COVID-19 outcomes in patients with pre-existing cardiovascular disease and risk factors: perspectives from a hospital in Ireland. *Br. J. Card. Nurs.* 2024; 19(1): 1–3. DOI: <https://doi.org/10.12968/bjca.2023.0097>
- Su Y.J., Kuo K.C., Wang T.W., Chang C.W. Gender-based differences in COVID-19. *New Microbes New Infect.* 2021; 42: 100905. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2021.100905>
- Al-Hijaj B., Al-rubaye A., Al-Hashim Z., Mohammed M., Habib O. A study on 696 COVID-19 cases in Basrah-Southern Iraq: severity and outcome indicators. *Iraqi Natl. J. Med.* 2020; 2(3): 19–26. DOI: <https://doi.org/10.37319/iqnmj.2.csi.3>
- Mukherjee S., Pahan K. Is COVID-19 gender-sensitive? *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2021; 16(1): 38–47. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11481-020-09974-z>
- Pradhan A., Olsson P.E. Sex differences in severity and mortality from COVID-19: are males more vulnerable? *Biol. Sex Differ.* 2020; 11(1): 53. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13293-020-00330-7>
- Achua J.K., Chu K.Y., Ibrahim E., Khodamoradi K., Delma K.S., Iakymenko O.A., et al. Histopathology, and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections on testis. *World J. Mens Health.* 2021; 39(1): 65. DOI: <https://doi.org/10.5534/wjmh.200170>
- White A. Men and COVID-19: the aftermath. *Postgrad. Med.* 2020; 132(Suppl. 4): 18–27. DOI: <https://doi.org/10.1080/00325481.2020.1823760>

19. Mushtaq M.Z., Nasir N., Mahmood S.F., Khan S., Kanji A., Nasir A., et al. Older age, lack of vaccination and infection with variants other than Omicron associated with severity of COVID-19 and in-hospital mortality in Pakistan. *medRxiv*. 2023. Preprint. DOI: <https://doi.org/10.1101/2023.01.30.23285170>
20. Davies N.G., Klepac P., Liu Y., Prem K., Jit M., Eggo R.M. Age-dependent effects in the transmission and control of COVID-19 epidemics. *Nat. Med.* 2020; 26(8): 1205–11. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0962-9>
21. Mueller A.L., McNamara M.S., Sinclair D.A. Why does COVID-19 disproportionately affect older people? *Aging (Albany NY)*. 2020; 12(10): 9959–81. DOI: <https://doi.org/10.18632/aging.103344>
22. Selvavinayagam S.T., Yong Y.K., Joseph N., Hemashree K., Tan H.Y., Zhang Y., et al. Low SARS-CoV-2 viral load among vaccinated individuals infected with Delta B. 1.617. 2 and Omicron BA. 1.1. 529 but not with Omicron BA. 1.1 and BA. 2 variants. *Front. Public Health*. 2022; 10: 1018399. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1018399>
23. Elham A.S., Azam K., Azam J., Mostafa L., Nasrin B., Marzieh N. Serum vitamin D, calcium, and zinc levels in patients with COVID-19. *Clin. Nutr. ESPEN*. 2021; 43: 276–82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2021.03.040>
24. Pecora F., Persico F., Argentiero A., Neglia C., Esposito S. The role of micronutrients in support of the immune response against viral infections. *Nutrients*. 2020; 12(10): 3198. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu12103198>
25. Ali A.A. Overview of the vital roles of macro minerals in the human body. *J. Trace Elem. Min.* 2023; 100076. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jtemin.2023.100076>
26. Castro D., Sharma S. Hypokalemia. *StatPearls*. 2024; NBK482465.
27. Cao L.L., Gaffney L.K., Marcus C. Hypokalemia-induced rhabdomyolysis in a child with autism affected by the COVID-19 pandemic. *J. Dev. Behav. Pediatr.* 2022; 43(5): e356–60. DOI: <https://doi.org/10.1097/DBP.00000000000001035>
28. Gruber S., Beuschlein F. Hypokalemia and the prevalence of primary aldosteronism. *Horm. Metab. Res.* 2020; 52(06): 347–56. DOI: <https://doi.org/10.1055/a-1134-4980>
29. Adrogué H.J., Tucker B.M., Madias N.E. Diagnosis and management of hyponatremia: a review. *JAMA*. 2022; 328(3): 280–91. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2022.11176>
30. Workeneh B.T., Meena P., Christ-Crain M., Rondon-Berrios H. Hyponatremia demystified: integrating physiology to shape clinical practice. *Adv. Kidney Dis. Health*. 2023; 30(2): 85–101. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.akdh.2022.11.004>
31. Wessels I., Rolles B., Slusarenko A.J., Rink L. Zinc deficiency as a possible risk factor for increased susceptibility and severe progression of Corona Virus Disease 19. *Br. J. Nutr.* 2022; 127(2): 214–32. <https://doi.org/10.1017/S0007114521000738>
32. Joachimiak M.P. Zinc against COVID-19? Symptom surveillance and deficiency risk groups. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2021; 15(1): e0008895. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008895>
33. Muthuvattur Pallath M., Ahirwar A.K., Chandra Tripathi S., Asia P., Sakarde A., Gopal N. COVID-19 and nutritional deficiency: a review of existing knowledge. *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 2021; 42(1): 77–85. DOI: <https://doi.org/10.1515/hmbci-2020-0074>
34. Maares M., Hackler J., Haupt A., Heller R.A., Bachmann M., Diegmann J., et al. Free zinc as a predictive marker for COVID-19 mortality risk. *Nutrients*. 2022; 14(7): 1407. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu14071407>
35. Borborema M.E., Lucena T.M., Silva J.D. Vitamin D and estrogen steroid hormones and their immunogenetic roles in Infectious respiratory (TB and COVID-19) diseases. *Genet. Mol. Biol.* 2023; 46(1 Suppl. 2): e20220158. DOI: <https://doi.org/10.1590/1415-4757-GMB-2022-0158>
36. Dominguez L.J., Farruggia M., Veronese N., Barbagallo M. Vitamin D sources, metabolism, and deficiency: available compounds and guidelines for its treatment. *Metabolites*. 2021; 11(4): 255. DOI: <https://doi.org/10.3390/metab11040255>
37. Ahvanooei M.R., Norouzian M.A., Vahmani P. Beneficial effects of vitamins, minerals, and bioactive peptides on strengthening the immune system against COVID-19 and the role of cow's milk in the supply of these nutrients. *Biol. Trace Elem. Res.* 2022; 200(11): 4664–77. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12011-021-03045-x>
38. Bhattarai H.K., Shrestha S., Rokka K., Shakya R. Vitamin D, calcium, parathyroid hormone, and sex steroids in bone health and effects of aging. *J. Osteoporos.* 2020; 2020: 9324505. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/9324505>
39. Severino P., D'Amato A., Prosperi S., Myftari V., Labbro Franca A., Önkaya M., et al. The mutual relationship among cardiovascular diseases and COVID-19: focus on micronutrients imbalance. *Nutrients*. 2022; 14(16): 3439. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu14163439>
40. Zoccali C., Mallamaci F., Adamczak M., de Oliveira R.B., Massy Z.A., Sarafidis P., et al. Cardiovascular complications in chronic kidney disease: a review from the European Renal and Cardiovascular Medicine Working Group of the European Renal Association. *Cardiovasc. Res.* 2023; 119(11): 2017–32. DOI: <https://doi.org/10.1093/cvr/cvad083>
41. Jahangirimehr A., Shahvali E.A., Rezaeijo S.M., Khalighi A., Honarmandpour A., Honarmandpour F., et al. Machine learning approach for automated predicting of COVID-19 severity based on clinical and paraclinical characteristics: Serum levels of zinc, calcium, and vitamin D. *Clin. Nutr. ESPEN*. 2022; 51: 404–11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2022.07.011>
42. Kistamás K., Veress R., Horváth B., Bányász T., Nánási P.P., Eisner D.A. Calcium handling defects and cardiac arrhythmia syndromes. *Front. Pharmacol.* 2020; 11: 72. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00072>
43. Teymouri N., Mesbah S., Navabian S.M., Shekouh D., Najafabadi M.M., Norouzkhani N., et al. ECG frequency changes in potassium disorders: a narrative review. *Am. J. Cardiovasc. Dis.* 2022; 12(3): 112–24.
44. Abassi Z., Khoury E.E., Karram T., Aronson D. Edema formation in congestive heart failure and the underlying mechanisms. *Front. Cardiovasc. Med.* 2022; 9: 933215. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.933215>
45. Gonzalez A.A., Salinas-Parra N., Cifuentes-Araneda F., Reyes-Martinez C. Vasopressin actions in the kidney renin angiotensin system and its role in hypertension and renal disease. *Vitam. Horm.* 2020; 113: 217–38. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2019.09.003>
46. Marreiro D.D., Cruz K.J., Oliveira A.D., Morais J.B., Bjesa F., Melo S.R., et al. Antiviral and immunological activity of zinc and possible role in COVID-19. *Br. J. Nutr.* 2021; 127(8): 1172–9. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0007114521002099>
47. Wu F.Y., Wu C.W. The role of zinc in DNA and RNA polymerases. In: *Metal Ions in Biological Systems: Volume 15: Zinc and its Role in Biology and Nutrition*. CRC Press; 2023: 157–92.
48. Kumari D., Garg S., Bhawrani P. Zinc homeostasis in immunity and its association with preterm births. *Scand. J. Immunol.* 2022; 95(4): e13142. DOI: <https://doi.org/10.1111/sji.13142>
49. Wang W., Kang P.M. Oxidative stress and antioxidant treatments in cardiovascular diseases. *Antioxidants*. 2020; 9(12): 1292. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox9121292>
50. Alluri K., Nair K.P., Ghosh S. Differential expression of zinc transporters in functionally contrasting tissues involved in zinc homeostasis. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2020; 39(4): 615–29. DOI: <https://doi.org/10.1080/15257770.2019.1670838>
51. Tanita A., Namiuchi S., Onodera K., Sunamura S., Ogata T., Noda K., et al. Serum zinc concentration in patients with myocardial infarction: a retrospective study. *BMC Cardiovasc. Disord.* 2024; 24(1): 107. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12872-024-03776-4>
52. Latic N., Erben R.G. Vitamin D and cardiovascular disease, with emphasis on hypertension, atherosclerosis, and heart failure. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(18): 6483. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21186483>
53. Tran N., Garcia T., Aniq M., Ali S., Ally A., Nauli S.M. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and the cardiovascular system: in physiology and in disease states. *Am. J. Biomed. Sci. Res.* 2022; 15(2): 153.
54. Mohd S., Sharma S., Mishra A., Ashraf M.Z. Vitamin D and its relationship with the pathways related to thrombosis and various diseases. In: Özdemir Ö., ed. *Vitamin D*. IntechOpen; 2021. DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.97299>

Information about the authors:

Ali Abdel-Moneim AlKhuzaie  – PhD. Student, Lecturer, Department of Biology, College of Science, University of Thi-Qar, 64001 Iraq. E-mail: Medicalresearch11@yahoo.com ali_alkh.bio@sci.utq.edu.iq; <https://orcid.org/0009-0009-4693-2579>

Enas Abdul Kareem Jabbar – Dr., Professor, Lecturer, Ministry of Education, Directorate of Education Thi-Qar, Iraq. E-mail: Enaskareemjj0@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-8327-5434>

Bushra Jabbar Albadry – Assistant Professor, Head Manager, Faculty of Nursing, University of Thi-Qar, Iraq. E-mail: bushra.jh.bio@sci.utq.edu.iq; <https://orcid.org/0000-0002-5129-7700>

Contribution: AlKhuzaie A.A.M. – conceptualization, data curation, funding acquisition, investigation, methodology, project administration, resources, software, validation, visualization, writing original draft and writing review and editing. Jabbar E.A.K. – conceptualization, data curation, investigation, methodology, project administration, supervision, validation, visualization, writing original draft and writing review and editing. Albadry B.J. – conceptualization, data curation, investigation, supervision, validation, visualization, writing original draft and writing review and editing.

Received 14 May 2024

Accepted 25 June 2024

Published 30 June 2024

Информация об авторах:

Ali Abdel-Moneim AlKhuzaie  – аспирант, лектор, Факультет биологии, Колледж естественных наук, Университет Ти-Кар, Ти-Кар Ирак. E-mail: Medicalresearch11@yahoo.com ali_alkh.bio@sci.utq.edu.iq; <https://orcid.org/0009-0009-4693-2579>

Enas Abdul Kareem Jabbar – доктор, профессор, лектор, Министерство образования, Управление образования Ти-Кар, Ирак. E-mail: Enaskareemjj0@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-8327-5434>

Bushra Jabbar Albadry – ассистент профессора, главный менеджер, Факультет сестринского дела, Университет Ти-Кар, Ирак. E-mail: bushra.jh.bio@sci.utq.edu.iq; <https://orcid.org/0000-0002-5129-7700>

Участие авторов: AlKhuzaie A.A.M. – концепция, получение данных, получение финансирования, исследование, методология, администрирование проекта, ресурсы, программное обеспечение, проверка, визуализация, написание и редактирование статьи; Jabbar E.A.K. – концепция, получение данных, исследование, методология, администрирование проекта, надзор, проверка, визуализация, написание и редактирование статьи; Albadry B.J. – концепция, получение данных, исследование, надзор, проверка, визуализация, написание и редактирование статьи.

Поступила 14.05.2024

Принята в печать 25.06.2024

Опубликована 30.06.2024

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-237>

© ILOUKOU P.J., BOUMBA A.L.M., NGOMBE MOUABATA D.F.L., MASSENGO N.R.B., MALONGA G.A., MOUKASSA D., ENNAJI M.M., 2024



Molecular detection and genotyping of human herpes virus 8 in blood donors in Congo

Patrina J. Iloukou^{1,2}, Anicet L.M. Boumba^{2,3}, Dorine F.L. Ngombe^{1,2}, Norvi R.B. Massengo², Gervillien A. Malonga^{2,4}, Donatien Moukassa², Moulay M. Ennaji¹✉

¹Laboratory of Virology, Oncology, Biosciences, Environment and New Energies (LVO BEEN), Faculty of Science and Technology, 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;

⁴Sorbonne University, INSERM, Pierre Louis Institute of Epidemiology and Public Health, Public Assistance – Paris Hospitals (AP-HP), Pitié-Salpêtrière University Hospitals – Charles Foix, Virology Laboratory, Paris, France

Abstract

Objectives. Human herpesvirus 8 (HHV8) is rarely studied in Congo, despite its prevalence in Africa. Among healthy individuals, HHV-8 does not always lead to a life-threatening infection; however, in immunocompromised individuals, it could lead to more severe disease. The distribution of HHV-8 genotypes varies depending on ethnicity and geographic region.

Method. A prospective cross-sectional study included 265 samples from healthy blood donors from the National Blood Transfusion Center in Brazzaville, with an average age of 35 years, with extremes ranging from 18 to 60 years. After DNA extraction, a nested PCR was carried out for molecular detection, followed by genotyping by amplification of specific primers.

Result. In this study, 4.9% were positive for molecular detection of HHV-8 DNA. All HHV-8 positive DNA samples that were subjected to genotyping by amplification with specific primers allowing discrimination of two major genotypes (A and B). Genotype A was identified in 5 (1.9%) samples and genotype B in 2 (0.7%) samples, indicating that both genotypes were predominant. The remaining viral DNA samples not identified as the major genotypes were classified as «indeterminate» and consisted of 6 (2.3%) samples.

Conclusion: The results of the study suggest that Congo is an area where HHV-8 infection is endemic.

Keywords: Congo; HHV-8; KSHV; Genotypes; Blood donors

For citation: Iloukou P.J., Boumba A.L.M., Ngombe Mouabata D.F.L., Massengo N.R.B., Malonga G.A., Moukassa D., Ennaji M.M. Molecular detection and genotyping of human herpes virus 8 in blood donors in Congo. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(3): 277–284. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-237> EDN: <https://elibrary.ru/plhjbw>

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

Acknowledgement. We would like to thank the Moroccan Ministry of Higher Education, Scientific Research and Innovation, the CNRST, the Laboratory of Virology, Oncology, Biosciences, Environment and New Energies (LVO BEEN) and the Faculty of Science and Technology of Mohammedia, part of the Hassan II University of Casablanca, Morocco for its technical and financial support. We would like to thank the Health and Human Biology doctoral program of the Faculty of Health Sciences (FSSA) of Marien N'gouabi University (UMNG) for its support in data collection.

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. This study was carried out in compliance with the ethical standards for research in health sciences (N0: 62/UMNG.FSSA.V-DOY) and with the agreement of the Internal Ethics Committee of the CNTS.

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-237>

Обнаружение и генотипирование вируса герпеса человека 8-го типа молекулярными методами у доноров крови в Конго

Patrina J. Iloukou^{1,2}, Anicet L.M. Boumba^{2,3}, Dorine F.L. Ngombe^{1,2}, Norvi R.B. Massengo², Gervillien A. Malonga^{2,4}, Donatien Moukassa², Moulay M. Ennaji^{1✉}

¹Лаборатория вирусологии, онкологии, биологических наук, окружающей среды и новых источников энергии (LVO VEEN), Факультет наук и технологий, Мохаммедия, 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 наук о здоровье (IRSSA), Браззавиль, Конго;

⁴Университет Сорбонна, INSERM, Институт эпидемиологии и общественного здравоохранения Пьера Луи, Государственная помощь – Парижские больницы (AP-HP), Университетские больницы Питье-Сальпетриер – Charles Foix, Вирусологическая лаборатория, Париж, Франция.

Резюме

Введение. Вирус герпеса человека 8-го типа (HHV-8) мало изучен в Конго, несмотря на его распространенность в Африке. Среди здоровых людей HHV-8 не всегда приводит к опасной для жизни инфекции; однако у лиц с ослабленным иммунитетом он может приводить к более тяжелому течению заболевания. Распределение генотипов HHV-8 варьирует в зависимости от этнической принадлежности и географического региона.

Методы. Проспективное поперечное исследование включало 265 образцов от здоровых доноров крови из Национального центра переливания крови в Браззавиле, средний возраст которых составлял 35 лет, с предельными значениями от 18 до 60 лет. После выделения ДНК из образцов была проведена гнездовая ПЦР для выявления HHV-8 с последующим генотипированием методом амплификации с генотип-специфичными праймерами.

Результаты. ДНК HHV-8 была выявлена в 4,9% образцов. Все образцы ДНК HHV-8, которые были подвергнуты генотипированию путем амплификации с генотип-специфичными праймерами, принадлежали к двум основным генотипам: А и В. Генотип А был выявлен в 5 (1,9%) образцах, а генотип В – в 2 (0,7%) образцах, что подтвердило встречаемость обоих генотипов. Остальные образцы вирусной ДНК, не идентифицированные как принадлежащие основным генотипам, были классифицированы как «неопределенные» и включали 6 (2,3%) образцов.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о том, что Конго является областью, где инфекция HHV-8 является эндемичной.

Ключевые слова: Конго; HHV-8; KSHV; генотипы; доноры крови

Для цитирования: Iloukou P.J., Boumba A.L.M., Ngombe Mouabata D.F.L., Massengo N.R.B., Malonga G.A., Moukassa D., Ennaji M.M. Обнаружение и генотипирование вируса герпеса человека 8-го типа молекулярными методами у доноров крови в Конго. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(3): 277–284. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-237> EDN: <https://elibrary.ru/plhjbw>

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

Благодарность. Авторы благодарят Министерство высшего образования, научных исследований и инноваций Марокко, CNRST, Лабораторию вирусологии, онкологии, биологических наук, окружающей среды и новых источников энергии (LVO VEEN) и Факультет наук и технологий Мохаммедии, филиал Университета Хасана II в Касабланке, Марокко, за техническую и финансовую поддержку. Также авторы благодарят докторскую программу по вопросам здоровья и биологии человека Факультета медицинских наук (FSSA) Университета Мариен Нгуаби (UMNG) за поддержку в сборе данных.

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

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Данное исследование было проведено в соответствии с этическими стандартами исследований в области медицинских наук и с согласия Внутреннего этического комитета CNTS (NO: 62/UMNG.FSSA.V-DOY).

Introduction

Human herpesvirus 8 (HHV-8), also known as Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), causes several neoplastic diseases and is responsible for all forms of Kaposi's sarcoma (KS). HHV-8 infection is not ubiquitous, but endemic in sub-Saharan Africa, parts of Eastern Europe, and the Mediterranean. It is the etiological

agent of KS, primary effusion lymphoma (PEL) and multicentric Castleman disease (MCD) [1]. KS is today the most common cancer in people living with HIV (PLHIV), as well as in people living with HIV who have progressed to acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). The prevalence of HHV-8 varies among different populations and is commonly found in human immunodeficiency

virus (HIV)-positive people and men who have sex with men [2, 3].

HHV-8 is characterized by its high genetic variability across the entire genome. Sequence analysis of the highly variable K1 open reading frame (ORF) allowed the identification of six major genotypes of HHV-8, named A–F. In addition, several subtypes have been described for genotypes A to E [4–6]. Geographically, HHV-8 subtypes exhibit distinct distribution patterns linked to the coevolution of viruses with humans during migrations throughout history [7]. Furthermore, evidence for a relationship between clinical progression of KS and HHV-8 genotypes has also been proposed. In this regard, genotype A was significantly associated with rapid progression of classic KS and high viral load, while genotype C was linked to low viral load and slow progression of KS, and genotype B was associated with a better prognosis of this disease [8–10].

Previous reports indicated that HHV-8 can be transmitted through saliva, sexual and non-sexual transmission, through blood or blood components, and during organ transplantation [11]. However, the exact route of transmission is still very controversial. Some studies report that saliva is implicated as the main vehicle of transmission in sub-Saharan children; others, on the other hand, support the hypothesis of horizontal transmission in adulthood [3, 12].

It should be noted that HHV-8 can be transmitted by blood transfusion. Ensuring good hemovigilance remains a major public health problem in sub-Saharan Africa and more particularly in low-income countries on the African continent [13].

Several studies support the hypothesis of a clear probability of transmission of HHV-8 by blood transfusion in sub-Saharan Africa. A study carried out in Uganda on transfused patients tested before and after transfusion showed that 43% of patients received HHV-8 seropositive blood and that the risk of seroconversion was significantly higher in recipients of HHV-8 seropositive blood [14]. Some countries in the subregion have reported prevalences for HHV-8 among blood donors of 14, 22 and 57% in Burkina Faso, Central African Republic and Tanzania, respectively [3, 15, 16]. A recent study carried out among Malian blood donors reports a prevalence of 10.4% [17].

The HHV-8 genome, whose size is estimated between 160–170 kb, with at least 87 reading frames (ORFs), is characterized by significant heterogeneity. Molecular epidemiology studies of HHV-8 are mainly based on the ORF-K1 (870 bp), the analysis of this region has made it possible to identify seven major molecular subtypes or genotypes (A, B, C, D, E, F and Z) [10, 18]. Some HHV-8 genotypes are associated with rapid progression of certain forms of Kaposi's sarcoma. The distribution of HHV-8 genotypes varies by geography and ethnicity. Genotypes A and C are found in Europe, North America, the Middle East and North Asia [10, 19, 20]; genotypes B and A5 are characteristic of Africa [21]; genotype D is found in the Pacific Islands and Taiwan [5]; genotype E is reported in Native Americans and Brazilians [22]; genotype F was first identified in Uganda [4]

and recently reported in France [2], and genotype Z was found in a small cohort of Zambian children [23].

HHV-8 studies in blood donors are almost absent while the most feared post-transfusion infections are of viral origin. We studied the prevalence of HHV-8 among blood donors in Congo.

Material and methods

Study setting and participants

This is a prospective cross-sectional study including 265 blood samples from apparently healthy blood donors collected at the National Blood Transfusion Center in Brazzaville.

Inclusion criteria:

Age between 18 and 60 years old;
Physically fit for clinical examination;
Weight greater than or equal to 55 kg.

Non-inclusion criteria:

To take pills;
Have a chronic illness;
Having received a blood transfusion;
Behavior at risk of sexually transmitted diseases (STDs);

Menstruating, lactating or pregnant women;

We analyzed 265 samples from blood donors of both sexes aged 18 to 60 years in accordance with national guidelines on blood donation, from the blood bank of the National Transfusion Center of Congo-Brazzaville.

Viral DNA extraction

After routine blood bank screening, high molecular weight DNA was extracted from peripheral blood leukocytes of all samples selected by the genomic DNA kits. The protocol was adopted in accordance with the manufacturer's instructions and laboratory practices.

The purity and concentration of viral DNA were measured using a nucleic acid measuring instrument (nanodrop), the quality of which was tested by amplifying the human beta globin gene (268 Pb) with primers GH20: 5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3' and PC04: 5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3' in order to check the quality of our samples. After amplification on a thermal cycler, the detection was carried out on 2% agarose gel. All samples were suitable for viral DNA amplification.

Positive and Negative Controls

As a positive control we used samples identified as positive for HHV-8 during a study carried out in people living with HIV in Brazzaville [14], and as a negative control we used Ultra Pure Water for PCR.

Detection of HHV8 viral DNA and genotyping

All blood samples were amplified with a negative control and the human gene β -globin. PCR products were detected by 2% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining.

HHV-8 infection was determined by nested PCR with primers to the K1 gene (ORF-K1). In the 1st PCR round, sense primer 5'-GGC CCT TGT GTAAAC CTG T-3' (51–69) and antisense primer 5'-AGT ATC CGA CCT CAT AAA ATG-3' (1081–1061) were used. In the 2nd PCR round, sense primer 5'-GAC CTT GTT GGA CAT CCT GTA 3' (76–96) and antisense primer 5'-ACT GGT TGC GTA TAG TCT TCC-3' (961–941) were used. The reaction mix included 2 µl of DNA in a full volume of 25 µl containing 12.5 µl of Green Taq Mix, 6.5 µl of ultra pure water, 2 µl of the sense primer and 2 µl of the antisense primer.

Both reactions were carried out under the following cycle conditions:

For the 1st round of nested PCR, initial denaturation at 94 °C for 120 s followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 50 °C for 60 s, elongation at 72 °C for 120 s that followed by the final step which is the extension at 72 °C for 5 minutes.

For the 2nd round of nested PCR, the conditions were the same, with the exception of the annealing step which this time took place at 50 °C for 45s.

After amplification with a thermal cycler amplicons were visualized on a 2% agarose gel.

All HHV-8 positive DNA samples were subjected to genotyping by amplification with specific primers (Table 1).

Statistical analysis

In blood donors, the correlation between HHV-8 positivity and independent variables such as sex, age, marital status, blood donor types and genotypes was analyzed using a Pearson's chi-square test or a Fisher's exact test with RStudio software 2023.06.0+421 «Mountain Hydrangea» Release with version 4.2.2 of R.

The study was conducted with the informed consent of the patients. This study was carried out in compliance with the ethical standards for research in health sciences (N0: 62/UMNG.FSSA.V-DOY) and with the agreement of the Internal Ethics Committee of the CNTS.

Result

Sociodemographic characteristics of donors

A sociodemographic analysis of the donors revealed a male predominance, with a sex ratio (M/F) of 1.4.

The age group of 31 to 45 was the most represented. The average age was 35 years, with extremes ranging from 18 to 60 years. Voluntary donors made up the majority of the donor group. According to marital status, the most represented status was that of single.

Epidemiological characteristics of the population studied according to HHV-8 infection

Of 265 DNA samples, 4.9% were positive for HHV-8 DNA. All HHV-8 positive DNA samples that were subjected to genotyping by amplification with specific primers belonged to two major genotypes (A and B), Table 1. Genotype A was identified in 5 (1.9%) samples and genotype B – in 2 (0.7%) samples, indicating that both genotypes were predominant. The remaining viral DNA samples not identified as the major genotypes were classified as «indeterminate» and consisted of 6 (2.3%) samples (Table 2).

The presence of HHV-8 was higher in men than in women (4.1% versus 0.8%) with a positive correlation ($p = 0.08$), in regular donors with the prevalence of 2.3%, with a higher prevalence among donors aged between 18 and 30 years (2.3%), and singles – 4.2% (Table 2).

Description of sociodemographic characteristics according to genotype

Among the genotypes (A and B) identified during this study, genotype A was predominant in men. The study group ranged in age from 18 to 60 years old with an average of 35 years old. The highest frequency of predominant genotype A was observed in the age group (31–45) years, as well as in singles (Table 3).

Discussion

Tremendous efforts have been made since the discovery of HHV-8 more than two decades ago and until recently to demonstrate the potential risk of HHV-8 transmission through blood transfusion. Many routine tests have been carried out in blood donors around the world to ensure that immunologically safe blood is provided to patients in response to the increasing demand for blood transfusion in our country for various medical or surgical conditions. So far, HHV-8 testing is not routinely recom-

Table 1. Primers for HHV-8 genotyping

Таблица 1. Праймеры для генотипирования HHV-8

Gene Ген	Primers Праймеры	Position Позиция	Reference Ссылка
Type A (AF133038.1)	5'-ATACTCGGCTTTTCCGACCG-3' 5'-GCTCTGTCCGATGCCAGATT-3'	265–284 359–340	Zainab B. Mohammed, Shatha F. Abdullah
Type B (AF133040.1)	5'-CTGGAGTGATTCCACGCCT-3' 5'-AGTCCCGTTGCAATACCAGG-3'	190–209 269–250	Zainab B. Mohammed, Shatha F. Abdullah
Type C (AF133041.1)	5'-CAACGCCTTACACGTTGACC-3' 5'-CATGCGTCAGTCGGAAAAGC-3'	202–221 291–272	Zainab B. Mohammed, Shatha F. Abdullah
Type D (EF589758.1)	5'-GGCCCTTGTGTAAACCTGT-3' 5'-AGTATCCGACCTCTAAAATG-3'	159–178 239–220	Zainab B. Mohammed, Shatha F. Abdullah
β-globin / GH20 PCO4	5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3' 5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'	268Pb	

Table 2. Epidemiological characteristics of the population studied according to HHV-8 infection status

Таблица 2. Эпидемиологическая характеристика обследованной популяции в соответствии со статусом по инфицированию вирусом герпеса человека 8-го типа

Variables Параметры	N/265 (%)	Negative (%) Негативный (%)	Positive (%) Позитивный (%)	<i>p</i>
Gender Пол				0.08
Male Мужчины	155 (58.5)	145 (54.7)	10 (4.1)	
Female Женщины	110 (41.5)	107 (40.4)	3 (0.8)	
Age Возраст				0.1
18–30	113 (42.7)	108 (40.8)	6 (2.3)	
1–45	127 (47.9)	119 (44.9)	5 (1.9)	
46–60	25 (9.4)	25 (9.4)	2 (0.7)	
Marital status Семейное положение				0.3
Single Одинокие	141 (53.2)	134 (50.6)	11 (4.2)	
Married В браке	43 (16.2)	43 (16.2)	2 (0.7)	
Concubine В сожительстве	81 (30.6)	75 (28.3)	0 (0.0)	
Blood donors Доноры крови				0.1
Voluntary Безвозмездные	125 (47.2)	121 (45.7)	5 (1.9)	
Family Родственники	59 (22.2)	57 (21.5)	2 (0.7)	
Regular Постоянные	81 (30.6)	74 (27.9)	6 (2.3)	
Genotypes Генотипы				
A	5 (1.9)	0 (0.0)	5 (1.9)	–
B	2 (0.7)	0 (0.0)	2 (0.7)	–
Indefinite Неопределенный	6 (2.3)	0 (0.0)	6 (2.3)	–
Negative Негативный	252 (95.1)	252 (95.1)	0 (0.0)	–

mended, except in an endemic area, because several facts suggest a potential role of HHV-8 in the pathogenesis of many diseases. More importantly, most blood recipients have immune problems that promote HHV-8 activation. The increasing spread of HHV-8 around the world and neighboring countries has led to the decision to test blood donors [17]. Apart from the recent study by Malonga G et al, there were no such studies or statistics in Congo that would allow further interpretation [24].

Among the 13 positives, 7 samples were typeable, and genotype A was the most predominant (1.9%), followed by genotype B (0.7%). The major genotypes (A to Z) of the virus have been identified as having distinct distributions among different geographic and ethnic groups that

are influenced by population migration [10, 19]. Our results showed that the majority of blood donors had both genotypes A and B, which coincided with a recent study conducted in Congo in people living with HIV, and are consistent with data from the study by Betsem et al. which found genotype A and genotype B circulating mainly in the Cameroonian population [25]. It should be noted that genotypes A and B were also found among KS patients in Zimbabwe [26], in the Central African Republic [27, 28], in South Africa and Uganda [4, 21]. In contrast, a study conducted by Lacoste et al. in a specific region described genotype B as the only one circulating in Congo in a patient with MCD. On the other hand, Varmazyar et al. reported that genotype A was more fre-

Table 3. Description of sociodemographic characteristics according to HHV-8 genotype

Таблица 3. Описание социально-демографических характеристик в зависимости от генотипа HHV-8

Variables Параметры	HHV-8 genotype Генотип HHV-8			
	N/265 (%)	A (%)	B (%)	Indefinite Неопределенный (%)
Gender Пол				
Male Мужчины	155 (58.5)	4 (1.51)	2 (0.76)	4 (1.51)
Female Женщины	110 (41.5)	1 (0.38)	0 (0.0)	2 (0.76)
Age Возраст				
18–30	113 (42.7)	2 (0.76)	1 (0.38)	3 (1.13)
31–45	127 (47.9)	3 (1.13)	1 (0.38)	1 (0.38)
46–60	25 (9.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.76)
Marital status Семейное положение				
Single Одинокие	141 (53.2)	4 (1.51)	1 (0.38)	6 (2.27)
Married В браке	43 (16.2)	1 (0.38)	1 (0.38)	0 (0.0)
Concubine В сожительстве	81 (30.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Blood donors Доноры крови				
Voluntary Безвозмездные	125 (47.2)	2 (0.76)	1 (0.38)	2 (0.76)
Family Родственники	59 (22.2)	1 (0.38)	0 (0.0)	1 (0.38)
Regular Постоянные	81 (30.6)	2 (0.76)	1 (0.38)	3 (1.13)

quently detected in HIV-infected patients, with or without KS, than in HIV-negative individuals [20]. Unlike other studies where genotypes A and C have the largest area of prevalence, including Africa, Europe, Middle East, Asia [29, 30], genotype A was mainly identified in our study and this genotype was mainly detected in Africa [21].

Conclusion

In conclusion, this study provides additional evidence of the potential risk of HHV-8 transmission through blood transfusion. Genotyping results showed the predominance of genotype A. Further research is needed to explain the possible presence of HHV-8 infection in the population, which could help clarify many aspects of HHV-8 epidemiology and viral transmission factors.

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

1. Dittmer D.P., Damania B. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus: immunobiology, oncogenesis, and therapy. *J. Clin. Invest.* 2016; 126(9): 3165–75. DOI: <https://doi.org/10.1172/jci84418>
2. Jary A., Leducq V., Desire N., Petit H., Palich R., Joly V., et al. New Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus variant in men who

3. have sex with men associated with severe pathologies. *J. Infect. Dis.* 2020; 222(8): 1320–8. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa180>
4. Lidenge S.J., Tran T., Tso F.Y., Ngowi J.R., Shea D.M., Mwaiselage J., et al. Prevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and transfusion-transmissible infections in Tanzanian blood donors. *Int. J. Infect. Dis.* 2020; 95: 204–9. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.04.018>
5. Kajumbula H., Wallace R.G., Zong J.C., Hokello J., Sussman N., Simms S., et al. Ugandan Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus phylogeny: evidence for cross-ethnic transmission of viral subtypes. *Intervirology.* 2006; 49(3): 133–43. DOI: <https://doi.org/10.1159/000089374>
6. Cassar O., Charavay F., Bassot S., Plancoulaine S., Grangeon J.P., Laumond-Barny S., et al. Divergent KSHV/HHV-8 subtype D strains in New Caledonia and Solomon Islands, Melanesia. *J. Clin. Virol.* 2012; 53(3): 214–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.12.016>
7. Pérez C.L., All M.I. Diversity of human herpesvirus 8 genotypes in patients with AIDS and non-AIDS associated Kaposi's sarcoma, Castleman's disease and primary effusion lymphoma in Argentina. *J. Med. Virol.* 2017; 89(11): 2020–8. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.24876>
8. Hayward G.S., Zong J.C. Modern evolutionary history of the human KSHV Genome. In: Boshoff C., Weiss R.A., eds. *Kaposi Sarcoma Herpesvirus: New Perspectives. Current Topics in Microbiology and Immunology; Vol. 312.* Heidelberg: Springer; 2007: 1–42. DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-540-34344-8_1

8. Mancuso R., Biffi R., Valli M., Bellinvia M., Athanasia T., Ferrucci S., et al. HHV8 a subtype is associated with rapidly evolving classic Kaposi's sarcoma. *J. Med. Virol.* 2008; 80(12): 2153–60. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.21322>
9. Cordiali-Fei P., Trento E., Giovanetti M., Lo Presti A., Latini A., Giuliani M., et al. Analysis of the ORFK1 hypervariable regions reveal distinct HHV-8 clustering in Kaposi's sarcoma and non-Kaposi's cases. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2015; 34(1): 1. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13046-014-0119-0>
10. Tozetto-Mendoza T.R., Ibrahim K.Y., Tateno A.F., de Oliveira C.M., Sumita L.M., Sanchez M.C.A., et al. Genotypic distribution of HHV-8 in AIDS individuals without and with Kaposi's sarcoma: Is genotype B associated with better prognosis of AIDS-KS? *Medicine (Baltimore)*. 2016; 95(48): e5291. DOI: <https://doi.org/10.1097/md.0000000000005291>
11. Pica F., Volpi A. Transmission of human herpesvirus 8: an update. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2007; 20(2): 152–6. DOI: <https://doi.org/10.1097/qco.0b013e3280143919>
12. Mohammed Z.B., Abdullah S.F. Serodiagnosis of human herpesvirus-8 among Iraqi blood donors. *Clin. Med.* 2020; 7(6): 69–74.
13. Kakisingi C.N., Mukuku O., Matanda S.K., Manika M.M., Kyabu V.K., Kasamba E.I., et al. Epidemiological profile and seroprevalence of blood donors at university clinics in Lubumbashi, Democratic Republic of Congo. *Pan Afr. Med. J.* 2016; 23(1). DOI: <https://doi.org/10.11604/pamj.2016.23.175.8480>
14. Hladik W., Dollard S.C., Mermin J., Fowlkes A.L., Downing R., Amin M.M., et al. Transmission of human herpesvirus 8 by blood transfusion. *N. Engl. J. Med.* 2006; 355(13): 1331–8. DOI: <https://doi.org/10.1056/nejmoa055009>
15. Bélec L., Cancré N., Hallouin M.C., Morvan J., Mohamed A.S., Grésenguet G. High prevalence in Central Africa of blood donors who are potentially infectious for human herpesvirus 8. *Transfusion.* 1998; 38(8): 771–5. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1998.38898375517.x>
16. Collenberg E., Ouedraogo T., Ganamé J., Fickenscher H., Kynast-Wolf G., Becher H., et al. Seroprevalence of six different viruses among pregnant women and blood donors in rural and urban BurkinaFaso: A comparative analysis. *J. Med. Virol.* 2006; 78(5): 683–92. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.20593>
17. 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. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.27850>
18. Azadmanesh K., Norouzfard Z.S., Sohrabi A., Safaie-Naraghi Z., Moradi A., Yaghmaei P., et al. Characterization of human herpes virus 8 genotypes in Kaposi's sarcoma patients in Tehran, Iran. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* 2012; 3(2): 144.
19. Ouyang X., Zeng Y., Fu B., Wang X., Chen W., Fang Y., et al. Genotypic analysis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus from patients with Kaposi's sarcoma in Xinjiang, China. *Viruses.* 2014; 6(12): 4800–10. DOI: <https://doi.org/10.3390/v6124800>
20. Varmazyar S., Shoja Z., Kakavand-Ghalehnoei R., Shahmahmoodi S., Marashi S.M., Jalilvand S. Molecular typing of human herpesvirus 8 among HIV positive in comparison to HIV-negative individuals in Iran. *J. Med. Virol.* 2017; 89(4): 703–9. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.24644>
21. Isaacs T., Abera A.B., Muloiwa R., Katz A.A., Todd G. Genetic diversity of HHV8 subtypes in SouthAfrica: A5 subtype is associated with extensive disease in AIDS-KS. *J. Med. Virol.* 2016; 88(2): 292–303. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.24328>
22. de Souza V.A., Sumita L.M., Nascimento M.C., Oliveira J., Mascheretti M., Quiroga M., et al. Human herpesvirus-8 infection and oral shedding in Amerindian and non-Amerindian populations in the Brazilian Amazon region. *J. Infect. Dis.* 2007; 196(6): 844–52. DOI: <https://doi.org/10.1086/520549>
23. Gompels U.A., French C., Monze M., Kasolo F.C., Obel N., Anderson R.A. Sequence analyzes of human herpesvirus-8 strains from both African human immunodeficiency virus-negative and -positive childhood endemic Kaposi's sarcoma show a close relationship with strains identified in febrile children and high variation in the K1 glycoprotein. *J. Gen. Virol.* 1998; 79(12): 3055–65. DOI: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-12-3055>
24. Malonga G.A., Jary A., Leducq V., Moudiougou Mbougou Malanda D., Boumba A.L.M., Chicaud E., et al. Seroprevalence and molecular diversity of Human Herpesvirus 8 among people living with HIV in Brazzaville, Congo. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 17442. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97070-4>
25. Betsem E., Cassar O., Afonso P.V., Fontanet A., Froment A., Gessain A. Epidemiology and Genetic Variability of HHV-8/KSHV in Pygmy and Bantu Populations in Cameroon. *PLoS Negl. Trop Dis.* 2014; 8(5): e2851. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002851>
26. White T., Hagen M., Gudza I., White I.E., Ndemera B., Gwanzura L., et al. Genetic diversity of the Kaposi's sarcoma herpesvirus K1 protein in AIDS-KS in Zimbabwe. *J. Clin. Virol.* 2008; 42(2): 165–71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.02.006>
27. Lacoste V., Judde J.G., Briere J., Tulliez M., Garin B., Kassa-Kelembho E., et al. Molecular epidemiology of human herpesvirus 8 in Africa: both B and A5 K1 genotypes, as well as the M and P genotypes of K14. 1/K15 loci, are frequent and widespread. *Virology.* 2000; 278(1): 60–74. DOI: <https://doi.org/10.1006/viro.2000.0629>
28. Fouchard N., Lacoste V., Couppie P., Develoux M., Mauclere P., Michel P., et al. Detection and genetic polymorphism of human herpes virus type 8 in endemic or epidemic Kaposi's sarcoma from West and Central Africa, and South America. *Int. J. Cancer.* 2000; 85(2): 166–70.
29. Kanno T., Sato Y., Nakamura T., Sakamoto K., Sata T., Katano H. Genotypic and clinicopathological characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection in Japan. *J. Med. Virol.* 2010; 82(3): 400–6. DOI: <https://doi.org/10.1002/jmv.21715>
30. Cook P.M., Whitby D., Calabro M.L., Luppi M., Kakoola D.N., Hjalgrim H., et al. Variability and evolution of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in Europe and Africa. *AIDS.* 1999; 13(10): 1165–76. DOI: <https://doi.org/10.1097/00002030-199907090-00004>

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>

Patrina Joseph Iloukou – 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>

Anicet Luc Magloire Boumba – 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>

Dorine Florence Luthera Ngombe – 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: ngombedorine@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-7065-2934>

Norvi Rigobert Bienvenu Massengo – 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>

Gervillien Arnold Malonga – M.Sc, Doctorant, Sorbonne University, INSERM, Pierre Louis Institute of Epidemiology and Public Health, Public Assistance – Paris Hospitals (AP-HP), Pitié-Salpêtrière University Hospitals – Charles Foix, Virology Laboratory, Paris, France, Department of Health and Human Biology, Faculty of Health Sciences, Marien N'gouabi University, Av. des Premiers Jeux Africains, Brazzaville, Congo. E-mail: arnoldgermalonga@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-1840-951X>

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>

Contribution: Iloukou P.J. – design, study planning, acquisition; analysis and interpretation of data, writing the manuscript; Boumba A.L.M. – design, study planning, manuscript revision; Ngombe Mouabata D.F.L. – data analysis; Massengo N.R.B. – data acquisition; Malonga G.A. – data acquisition; Moukassa D. – design, study planning, manuscript revision; Ennaji M.M. – design, study planning, manuscript revision, coordination. All authors read and approve the final manuscript.

Received 15 May 2024

Accepted 25 June 2024

Published 30 June 2024

Информация об авторах:

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

Patrina Joseph Iloukou – M.Sc, докторант, Лаборатория вирусологии, онкологии, биологических наук, окружающей среды и новой энергии, Факультет наук и технологий, Мохаммедия, Университет Хасана II в Касабланке, Касабланка, Марокко, Кафедра здравоохранения и биологии человека, Факультет медицинских наук, Университет Мариен Нгуаби, Браззавиль, Конго. E-mail: Josephiloukou1@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-5505-2145>

Anicet Luc Magloire Boumba – M.Sc, PhD, профессор, директор Зоны исследований в области здравоохранения, исследовательская зона Пуэнт-Нуар, Национальный институт исследований в области здравоохранения (IRSSA), Браззавиль, Конго. Преподаватель, кафедра 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>

Dorine Florence Luthera Ngombe – M.Sc, докторант лаборатории вирусологии, онкологии, биологических наук, окружающей среды и новых источников энергии (LVO BEEN), Факультет наук и технологий, Мохаммедия, Университет Хасана II в Касабланке, Касабланка, Марокко, Кафедра здравоохранения и биологии человека, Факультет медицинских наук, Университет Мариен Нгуаби, Браззавиль, Конго. E-mail: ngombedorine@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-7065-2934>

Norvi Rigobert Bienvenu Massengo – M.Sc, докторант кафедры здоровья и биологии человека факультета медицинских наук Университета Мариен Нгуаби, Браззавиль, Конго. E-mail: bienvenumassengo@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0000-9474-7989>

Gervillien Arnold Malonga – M.Sc, докторант Университета Сорбонна, INSERM, Институт эпидемиологии и общественного здравоохранения Пьера Луи, Государственная помощь – Парижские больницы (AP-HP), Университетские больницы Питье-Сальпетриер – Шарль Фуа, Вирусологическая лаборатория, Париж, Франция, кафедра здравоохранения и биологии человека, факультет наук о здоровье, Университет Мариен Нгуаби, Браззавиль, Конго. E-mail: arnoldgermalonga@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-1840-951X>

Donatien Moukassa – M.Sc, PhD, профессор, заведующий кафедрой здоровья и биологии человека, факультет медицинских наук, Университет Мариен Нгуаби, Браззавиль, Конго. E-mail: donatienmoukassa@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-6764-7122>

Вклад авторов: Iloukou P.J. – дизайн, планирование исследования, сбор, анализ и интерпретация данных, написание рукописи; Boumba A.L.M. – дизайн, планирование исследования, редактирование рукописи; Ngombe Mouabata D.F.L. – анализ данных; Massengo N.R.B. – получение данных; Malonga G.A. – получение данных; Moukassa D. – дизайн, планирование исследования, редактирование рукописи; Ennaji M.M. – дизайн, планирование исследования, редактирование рукописи, координация. Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

Поступила 15.05.2024

Принята в печать 25.06.2024

Опубликована 30.06.2024

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ



ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-230>

© ИВАНОВ А.П., ДЗАГУРОВА Т.К., КУРАШОВА С.С., ТЕОДОРОВИЧ Р.Д., КЛЕБЛЕЕВА Т.Д., ТКАЧЕНКО Е.А., 2024

Система иммуноферментного анализа для серологической диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом на основе инактивированного очищенного вируса Пуумала (Hantaviridae: *Orthohantavirus*)

Иванов А.П.✉, Дзагурова Т.К., Курашова С.С., Теодорович Р.Д.,
Клеблеева Т.Д., Ткаченко Е.А.

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

Резюме

Введение. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) является наиболее распространенным зоонозным вирусным заболеванием человека на территории Российской Федерации. Более 98% заболеваемости ГЛПС вызвано ортохантавирусом Пуумала (ПУУ). Для лабораторной диагностики ГЛПС, в частности серодиагностики клинических случаев, требуются эффективные (высокочувствительные, специфичные, максимально объективные и быстрые в исполнении) серологические тесты, разработка которых является важнейшим элементом контроля данного вирусного заболевания.

Цель исследования. Конструирование системы иммуноферментного анализа (ИФА) для определения специфических антител с использованием стандартного антигена в виде высокоочищенного инактивированного вируса ПУУ в качестве иммуносорбента.

Материалы и методы. Получение препаратов высокоочищенного антигена вируса ПУУ, конструирование системы ИФА для определения специфических антител, отработка параметров системы ИФА, параллельное титрование сывороток крови больных ГЛПС методом флуоресцирующих антител (МФА) и новым вариантом ИФА.

Результаты и обсуждение. Впервые в лабораторной практике исследования ГЛПС была сконструирована система ИФА на основе очищенного инактивированного вируса ПУУ (целевой компонент экспериментальной вакцины против ГЛПС) в качестве стандартного антигена при прямой сорбции на твердую фазу (иммунопанель). Параллельное титрование 50 образцов сывороток крови больных ГЛПС методами МФА и разработанного варианта ИФА показало высокую чувствительность и специфичность данного варианта ИФА, отмечены 100% совпадение результатов тестов (на уровне положительный/отрицательный результат) и значительный уровень корреляции величин титров специфических антител двух тестов.

Заключение. Разработанный вариант ИФА для определения антител к вирусу ПУУ на основе очищенного инактивированного вируса ПУУ – целевого компонента вакцинного препарата против ГЛПС в качестве иммуносорбента – может быть эффективно использован для серодиагностики ГЛПС и массовых серо-эпидемиологических исследований.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка с почечным синдромом; хантавирус Пуумала; хантавирусная вакцина; иммуноферментный анализ; метод флуоресцирующих антител

Для цитирования: Иванов А.П., Дзагурова Т.К., Курашова С.С., Теодорович Р.Д., Клеблеева Т.Д., Ткаченко Е.А. Система иммуноферментного анализа для серологической диагностики геморрагической лихорадки с почечным синдромом на основе инактивированного очищенного вируса Пуумала (Hantaviridae: *Orthohantavirus*). *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(3): 285–289. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-230> EDN: <https://elibrary.ru/mgtslj>

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. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита)» (Протокол № 1906/8к от 19.06.2024).

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-230>

Enzyme immunoassay system for serological diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome based on inactivated purified Puumala virus (Hantaviridae: *Orthohantavirus*)

Alexander P. Ivanov✉, Tamara K. Dzagurova, Svetlana S. Kurashova, Rostislav D. Teodorovich, Tatyana D. Klebleeva, Eugeny A. Tkachenko

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

Abstract

Introduction. Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) is the most common zoonotic human viral disease in the Russian Federation. More than 98% of the HFRS cases are caused by Puumala orthohantavirus (PUU). Effective serological tests are required for laboratory diagnosis of HFRS.

Objective. Construction of an enzyme immunoassay (ELISA) test system for detection of specific antibodies using standard antigen in the form of highly purified inactivated PUU virus as immunosorbent.

Materials and methods. Preparation of PUU virus antigen, designing the ELISA for detection of specific antibodies, developing parameters of the ELISA system, parallel titration of HFRS patients sera by fluorescent antibody technique (FAT) and the new ELISA.

Results and discussion. For the first time, ELISA based on purified inactivated PUU virus as standard antigen directly absorbed onto immunoplate was developed. Parallel titration of 50 samples from HFRS patients blood sera using FAT and the developed ELISA showed high sensitivity and specificity of this ELISA, with 100% concordance of testing results and significant level of correlation between the titers of specific antibodies in the two assays.

Conclusion. The ELISA based on purified inactivated PUU virus as an immunosorbent can be effectively used for HFRS serological diagnosis and for mass seroepidemiological studies.

Keywords: hemorrhagic fever with renal syndrome; Puumala hantavirus; hantavirus vaccine; enzyme immunoassay; fluorescent antibody technique

For citation: Ivanov A.P., Dzagurova T.K., Kurashova S.S., Teodorovich R.D., Klebleeva T.D., Tkachenko E.A. Enzyme immunoassay system for serological diagnosis of hemorrhagic fever with renal syndrome based on inactivated purified Puumala virus (Hantaviridae: *Orthohantavirus*). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(3): 285–289 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-230> EDN: <https://elibrary.ru/mgtslj>

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 research protocol was approved by the Ethics Committee of the Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of the Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis) (Protocol No 1906/8k dated June 19, 2024).

Введение

Лабораторная диагностика геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) – одного из ведущих зоонозных вирусных заболеваний человека на территории Российской Федерации (возбудители – ортохантавирусы, семейство *Hantaviridae*) – достаточно исследованная тема, начиная с 80-х годов XX века. Основой серологической диагностики ГЛПС был метод флуоресцирующих антител (МФА) [1], затем – различные варианты иммуносорбентных методов: иммуноферментного (ИФА) и радиоиммунного анализа, разработанные в том числе авторами данной публикации [2, 3]. Создание культуральной инактивированной хантавирусной вакцины, например, на основе вируса Пуумала (ПУУ), предусматривает высокую степень очистки вируса, что дает возможность

также использовать вакцинный препарат в качестве иммуносорбента для ИФА (в системах определения специфических антител), т.е. в виде прямой сорбции очищенного инактивированного вируса на твердую фазу (иммунопанель). Такая система ИФА представляет собой трехслойный «сэндвич»: иммуносорбент (стандартный антиген) – исследуемая сыворотка – антителовой пероксидазный конъюгат, что обеспечивает более высокую специфичность теста, поскольку сенсibiliзирующие антитела отсутствуют.

Цель исследования – разработка варианта ИФА на основе высокоочищенного инактивированного вируса ПУУ для определения антител к нему у больных ГЛПС (серологическая диагностика клинических случаев), а также для проведения массовых серо-эпидемиологических исследований на эндемичных территориях.

Материалы и методы

Сыворотки крови больных ГЛПС были получены из ФБУЗ ЦГиЭ Оренбургской области с целью серотипирования. Антитела к хантавирусам в сыворотках крови больных ГЛПС выявляли с помощью МФА, описанного ранее [1], с использованием моновалентных культуральных антигенов вирусов ПУУ и Добrava (ДОБ), а также Диагностикума ГЛПС культурального поливалентного для непрямого метода иммунофлюоресценции производства ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) по инструкции производителя. Сыворотки крови больных поступали из инфекционных больниц для проведения специфической диагностики. Информированное добровольное согласие пациенты подписывали при госпитализации. Таким образом, одобрения исследования Этическим комитетом не требовалось.

В качестве стандартного антигена в представленной ИФА-тест-системе использовали инактивированный очищенный вирус ПУУ, представляющий собой полуфабрикат экспериментального инактивированного цельновирионного вакцинного препарата, полученного на основе штамма ПУУ-ТКД-VERO по ранее описанной технологии [4]. Коротко: культуральную жидкость клеток *Vero*, инфицированных вирусом ПУУ, осветляли фильтрацией (фильтр-патрон PPG060B01BA с фильтром Poly Pro XL 6,0), концентрировали методом ультрафильтрации в тангенциальном потоке (кассета Pellicon 2 mini.), инактивировали β -пропиолактоном в разведении 1 : 6000, хроматографически очищали на сорбенте Carto Core 700 (GE Healthcare). Полученный очищенный инактивированный препарат вируса ПУУ содержал $5,6 \times 10^4$ копий вирусной РНК/мл, 21,3 мкг/мл общего белка.

Применяли систему ИФА для определения антител класса G (IgG) к вирусу ПУУ в сыворотках крови больных ГЛПС. Иммунопанели (Costar, кат. № 9018) сенсibilизировали очищенным антигеном вируса ПУУ (вакцинный препарат) в концентрации 2,5 мкг/мл (подобрана шахматным титрованием) в карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9,6 (Sigma, кат. № C3041-100CAP), по 0,1 мл/лунка и инкубировали 18 ч при температуре +4 °С. После 3-кратной отмывки 0,05% Tween-20 в фосфатно-солевом буфере (Т-ФСБ) и блокирования свободных сайтов 1% фетальной бычьей сывороткой (Gibco, Великобритания) по 0,2 мл/лунка в течение 1 ч при +37 °С и 3-кратной отмывки вносили (0,1 мл/лунка) разведения анализируемых сывороток, начиная с 1 : 100 в ИФА-буфере (Т-ФСБ-1% фетальная бычья сыворотка). Параллельно вносили положительную и отрицательную контрольные сыворотки крови больных. Сыворотки инкубировали 1 ч при +37 °С. После 5-кратной отмывки вносили (0,1 мл/лунка) пероксидазный конъюгат против IgG человека (Sigma, кат. № A-6029-1ML) в оптимальном разведении (в ИФА-буфере), подобранном шахматным титрованием. Инкубировали 1 ч при +37 °С. После 5-кратной отмывки вносили (0,1 мл/лунка)

субстрат ТМВ (Sigma, кат. № T0440-100ML, США), инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. Реакцию останавливали 2М раствором серной кислоты (0,05 мл/лунка). Оптическую плотность (ОП) измеряли при 450 нм (Thermo Scientific Multiscan FC ELISA reader, Thermo LabSystems, Финляндия). Результат считали положительным при значении P/N (ОП опыта/ОП контроля в максимальных разведениях сыворотки) 2,1 и более [2].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита)» (Протокол 1906/8к от 19.06.2024).

Результаты и обсуждение

Результаты определения антител (IgG) к возбудителю ГЛПС с использованием варианта ИФА на основе высокоочищенного инактивированного вируса ПУУ и МФА с различными антигенами указывают на высокую чувствительность и специфичность предлагаемого метода ИФА, что обусловлено, во-первых, качеством очистки антигена и, во-вторых, дизайном предлагаемого варианта ИФА, предусматривающего нанесение антигена на твердую фазу без предварительной ее сенсibilизации антителами. Система определяет антитела исключительно к вирусу ПУУ, поскольку антиген представляет собой цельновирионную структуру, в реакции фактически принимают участие эпитопы вирусной оболочки, обладающие типоспецифичностью [4]. Коэффициент корреляции (r) величин титров по данным МФА и ИФА имел высокое значение: 0,7.

В **таблице** представлены результаты параллельного титрования сывороток крови больных ГЛПС в МФА и ИФА.

Отсутствие ложноположительных результатов подтверждено отрицательными результатами исследования 50 сывороток крови из не эндемичных по ГЛПС районов в параллельном скрининге посредством МФА и ИФА.

Заключение

Таким образом, показано 100% совпадение результатов МФА ИФА при более высокой чувствительности ИФА (в 8–16 раз по титру антител). Разработанный вариант ИФА не является функциональным тестом (в отличие от реакции нейтрализации и МФА), однако благодаря достаточной простоте, скорости исполнения и возможности обследования значительного количества образцов сывороток крови он может использоваться для серодиагностики ГЛПС, при оценке эффективности разрабатываемых хантавирусных вакцин и для массовых серо-эпидемиологических исследований.

Таблица. Результаты параллельного титрования сывороток крови больных ГЛПС в МФА и ИФА

Table. Results of parallel titration of HFRS patient blood sera in FAT and ELISA

№ п/п Sample #	№ per. Registration #	День болезни Day from disease onset	Титр антител Antibody titer			Серотип Serotype (ПУУ, ДОБ) (PUU, DOB)
			МФА FAT		ИФА ELISA	
			ПУУ/ДОБ PUU/DOB	Поливалент* Polyvalent	ПУУ PUU	
1	9089a	12	1024/4096**	4096	0	ДОБ
2	9086	15	2048/16 000	16 000	0	ДОБ
3	9092	9	64 000/256	64 000	409 600	ПУУ
4	9093	7	16 000/128	16 000	51 200	ПУУ
5	9094	10	16 000/64	16 000	51 200	ПУУ
6	9097	11	16 000/128	16 000	102 400	ПУУ
7	9098	10	16 000/64	16 000	51 200	ПУУ
8	9099	6	4096/32	4096	12 800	ПУУ
9	9100	6	16 000/64	16 000	102 400	ПУУ
10	9101	16	Отр. Negative	Отр. Negative	Отр. Negative	
11	9103	14	64/отр (negative)	64	3200	ПУУ
12	9104	14	16 000/128	16 000	25 600	ПУУ
13	9107	18	32 000/256	32 000	51 200	ПУУ
14	9112	12	64 000/128	64 000	102 400	ПУУ
15	9114	13	16 000/64	16 000	51 200	ПУУ
16	9115	12	16 000/64	16 000	102400	ПУУ
17	9118	15	16 000/128	16 000	102 400	ПУУ
18	9119	10	8000/64	8000	51200	ПУУ
19	9120	4	16 000/64	16 000	102 400	ПУУ
20	9126	16	16 000/128	16 000	102 400	ПУУ
21	9127	9	Отр. Negative	Отр. Negative	Отр. Negative	
22	9129	12	16 000/128	16 000	102 400	ПУУ
23	9131	4	64 000/128	64 000	102 400	ПУУ
24	9132	19	16 000/128	16 000	102 400	ПУУ
25	9133	8	16 000/64	16 000	25 600	ПУУ
26	9134	13	16 000/64	16 000	102 400	ПУУ
27	9135	11	Отр. Negative	Отр. Negative	Отр. Negative	
28	9137	17	32 000/128	32 000	102 400	ПУУ
29	9138	13	16 000/64	16 000	25 600	ПУУ
30	9139	10	16 000/64	16 000	12 800	ПУУ
31	9141	12	32 000/128	32000	51 200	ПУУ
32	9142	23	8000/64	8000	25 600	ПУУ
33	9144	9	16 000/64	16 000	51 200	ПУУ
34	9145	9	16 000/128	16 000	25 600	ПУУ
35	9147	11	64 000/128	64 000	51 200	ПУУ
36	9148	9	4096/32	4096	12 800	ПУУ
37	9149	3	16 000/64	16 000	25 600	ПУУ
38	9150	7	16 000/128	16 000	51 200	ПУУ
39	9151	17	Отр. Negative	Отр. Negative	Отр. Negative	
40	9152	9	64 000/128	64 000	102 400	ПУУ
41	9153	6	16 000/64	16 000	102 400	ПУУ
42	9154	23	16 000/128	16 000	25 600	ПУУ
43	9156	17	64 000/256	64 000	409 600	ПУУ
44	9157	12	64 000/128	64 000	409 600	ПУУ
45	9158	14	1024/32	1024	3200	ПУУ
46	9160	7	32 000/128	32 000	51 200	ПУУ
47	9161	12	16 000/128	16 000	102 400	ПУУ
48	9162	8	64 000/64	64 000	204 800	ПУУ
49	9164	5	512/отр. (negative)	512	6400	ПУУ
50	9165	8	16 000/128	16 000	102 400	ПУУ

Примечание. * – Диагностикум ГЛПС; ** – обратная величина титра.

Note. * – HFRS Test system; ** – reciprocal.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А., Петров В.А. Эффективность применения культуральных антигенов для серодиагностики ГЛПС с помощью метода иммунофлюоресценции. *Вопросы вирусологии*. 1988; 33(1): 71–5. EDN: <https://elibrary.ru/jfmqvh>
2. Ivanov A.P., Tkachenko E.A., Petrov V.A., Pashkov A.J., Dzagurova T.K., Vladimirova T.P., et al. Enzyme immunoassay for the detection of virus specific Ig G and Ig M antibody in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Arch. Virol.* 1988; 100: 1–7. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01310902>
3. Резапкин Г.В., Ткаченко Е.А., Иванов А.П., Башкирцев В.Н., Дзагурова Т.К. Определение аренавирусных антигенов и антител методом твердофазного радиоиммунологического анализа. *Вопросы вирусологии*. 1981; 26(4): 459–63.
4. Ткаченко Е.А., Ишмухаметов А.А., Дзагурова Т.К., Синюгина А.А., Коротина Н.А., Набатников П.А. и др. Разработка экспериментально-промышленной технологии производства вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Ремедиум*. 2015; (6): 47–54. EDN: <https://elibrary.ru/uabrmj>

REFERENCES

1. Dzagurova T.K., Tkachenko E.A., Petrov V.A. The effectiveness of the use of cultural antigens for serodiagnostics of GLPS using the immunofluorescence method. *Voprosy virusologii*. 1988; 33(1): 71–5. EDN: <https://elibrary.ru/jfmqvh> (in Russian)
2. Ivanov A.P., Tkachenko E.A., Petrov V.A., Pashkov A.J., Dzagurova T.K., Vladimirova T.P., et al. Enzyme immunoassay for the detection of virus specific Ig G and Ig M antibody in patients with hemorrhagic fever with renal syndrome. *Arch. Virol.* 1988; 100: 1–7. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01310902>
3. Rezapkin G.V., Tkachenko E.A., Ivanov A.P., Bashkirtsev V.N., Dzagurova T.K. Determination of arenavirus antigens and antibodies by solid-phase radioimmunological analysis. *Voprosy virusologii*. 1981; 26(4): 459–63. (in Russian)
4. Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Sinyugina A.A., Korotina N.A., Nabatnikov P.A., et al. Manufacturing techniques and methods of control of the inactivated Vero cell-derived vaccine against HFRS has been developed in Russia. *Remedium*. 2015; (6): 47–54. EDN: <https://elibrary.ru/uabrmj> (in Russian)

Информация об авторах:

Иванов Александр Петрович  – д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии вирусов ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита)» Москва, Россия. E-mail: ivanovalexander1@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-4576-7136>

Дзагурова Тамара Казбековна – д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита)», Москва, Россия. E-mail: dzaguron@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-6656-1682>

Курашова Светлана Сергеевна – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита)», Москва, Россия. E-mail: svetllanak@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9934-699X>

Теодорович Ростислав Дмитриевич – научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита)», Москва, Россия. E-mail: rostislavteo@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2117-597X>

Клеблеева Татьяна Дмитриевна – научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии вирусов ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита)», Москва, Россия. E-mail: klebleeva_td@chumakovs.su; <https://orcid.org/0000-0003-4288-6818>

Ткаченко Евгений Александрович – д-р мед. наук, профессор, руководитель научного направления ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита)», Москва, Россия. E-mail: evgeniytkach@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6829-1241>

Участие авторов: Иванов А.П. – идея и конструирование новой системы ИФА, написание и редактирование рукописи; Дзагурова Т.К. – идея и конструирование новой системы ИФА, написание и редактирование рукописи; Клеблеева Т.Д. – идея и конструирование новой системы ИФА; Курашова С.С. – получение очищенного инактивированного вируса ПУУ; Теодорович Р.Д. – получение очищенного инактивированного вируса ПУУ; Ткаченко Е.А. – написание и редактирование рукописи.

Поступила 09.02.2024

Принята в печать 05.04.2024

Опубликована 30.06.2024

Information about the authors:

Alexander P. Ivanov  – D. Sci. (Med), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology of Viruses, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of the Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: ivanovalexander1@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-4576-7136>

Tamara K. Dzagurova – D. Sci. (Med), Leading Researcher, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of the Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: dzaguron@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-6656-1682>

Svetlana S. Kurashova – PhD (Med), Leading Researcher, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of the Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: svetllanak@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9934-699X>

Rostislav D. Teodorovich – Research Fellow, Laboratory of Hemorrhagic Fevers, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of the Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: rostislavteo@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2117-597X>

Tatyana D. Klebleeva – Research Fellow, Laboratory of Molecular Biology of Viruses, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of the Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: klebleeva_td@chumakovs.su; <https://orcid.org/0000-0003-4288-6818>

Eugeny A. Tkachenko – D. Sci. (Med), Professor, head of the scientific direction of the Institution, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of the Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), Moscow, Russia. E-mail: evgeniytkach@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6829-1241>

Contribution: Ivanov A.P. – the idea and design of new ELISA system, writing and editing the manuscript; Dzagurova T.K. – the idea and design of new ELISA system, writing and editing the manuscript; Klebleeva T.D. – the idea and design of new ELISA system; Kurashova S.S. – obtaining purified inactivated virus PUU; Teodorovich R.D. – obtaining purified inactivated virus PUU; Tkachenko E.A. – writing and editing the manuscript.

Received 09 February 2024

Accepted 05 April 2024

Published 30 June 2024

ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ



Мой учитель. К 110-летию со дня рождения академика Виктора Михайловича Жданова

Происходящая со временем канонизация Виктора Михайловича Жданова стирает в нашей памяти черты живого человека. Те, кто пришли в вирусологию 10, 20 и даже 30 лет назад, воспринимают его как легендарную личность. Его портреты и барельеф украшают руководимый им более четверти века Институт вирусологии, а его книги давно стали классикой. Но в воспоминаниях тех, кому выпала честь работать под руководством Виктора Михайловича, он предстает как очень энергичный и подвижный человек с такими замечательными человеческими качествами, как гибкость ума, чувство юмора, здравый смысл, неутомимость и доброжелательность. Более 25 лет я общался с этим выдающимся ученым и замечательным человеком, как губка впитывал стиль его работы, отношение к людям, поведение в быту, принципы, взгляды на жизнь.

Виктор Михайлович был самым молодым представителем когорты великих отечественных вирусологов первого поколения. Он родился в 1914 году в украинском поселке Штепино в семье местной интеллигенции. Отец его был врачом, мать – учительницей. Очень рано, еще до поступления в школу, он научился читать и писать. Читал он всегда очень много, быстро и всегда помнил содержание прочитанных им книг.

В детстве он обучился играть на фортепиано. Это умение очень пригодилось ему в студенческие годы, когда он подрабатывал тапером в кинотеатре (фильмы тогда были немые и нуждались в музыкальном сопровождении). На втором курсе написал оперу «Дума про казака Опанаса» и поставил ее с однокурсниками в студенческом театре. В зрелые годы он иногда садился за инструмент и очень старательно по нотам играл чаще всего этюды Шопена.

В 16 лет началась самостоятельная трудовая жизнь Виктора Михайловича. В те времена для поступления в институт лицам непролетарского происхождения требовался трудовой стаж. Поэтому сразу после окончания школы он нанялся дорожным рабочим. Интересно, что несмотря на молодость, рабочие, большинство из которых годились ему в отцы, за грамотность и справедливость выбрали его бригадиром. Уже тогда проявился его организаторский талант.

К 22 годам он с отличием окончил Харьковский медицинский институт. Позже, уже будучи военным врачом, Виктор Михайлович заочно учился на физико-математическом факультете Ленинградского университета.

Первый 10-летний период деятельности В.М. Жданова связан со службой в пограничных войсках туркестанского военного округа, где он серьезно занимался решением наиболее актуальных задач инфекционной патологии.

В период 1946–1950 гг. Виктор Михайлович работал последовательно заведующим лабораторией, отделом и директором Харьковского института эпидемиологии и микробиологии им. И.М. Мечникова. Он сконцентрировал усилия руководимого им коллектива на борьбе с краевой послевоен-

ной патологией того времени (брюшной, сыпной и возвратный тифы, дизентерия, гепатиты, детские инфекции).

В 30 лет В.М. Жданов написал свою первую монографию, посвященную этиологии и эпидемиологии инфекционного гепатита (болезнь Боткина), в ней впервые приведена стройная система доказательств вирусной природы данного заболевания. В 1947 году, в 33 года, он блестяще защитил эту работу как докторскую диссертацию.

В возрасте 35 лет он опубликовал фундаментальный труд «Эволюция инфекционных болезней». Тогда же им была разработана и предложена одна из первых классификаций вирусов – проблема, к которой Виктор Михайлович также неоднократно возвращался в последующие годы. Через 20 лет (в 1968 г.) в знак признания заслуг в этой области он был пожизненно избран членом Международного комитета по классификации и номенклатуре вирусов.

Благодаря своим ярким научным и организаторским способностям, В.М. Жданов был переведен в Москву и в течение 10 лет (1950–1960 гг.) возглавлял эпидемиологическую службу СССР, сначала как начальник Главного противозидемического Управления МЗ СССР, а затем как заместитель Министра здравоохранения СССР и Главный санитарный врач СССР. Все свои силы, опыт и энергию он направил на организацию борьбы с инфекциями. Неоценим вклад Виктора Михайловича Жданова в разработку технологии производства вакцин против гриппа, кори и полиомиелита.

В 38 лет В.М. Жданов был избран членом-корреспондентом АМН СССР, а в 45 лет – академиком.

В 1956г. Виктор Михайлович Жданов основал журнал «Вопросы вирусологии» и был его главным редактором до конца жизни.

В 1961 году В.М. Жданов стал директором ведущего вирусологического учреждения нашей страны – Института вирусологии им. Д.И. Ивановского АМН СССР, которым руководил до конца своих дней. С институтом связана вся его последующая, очень плодотворная, научная и организационная деятельность. Он начал с того, что коренным образом модернизировал Институт, привлек к работе талантливую научную молодежь из числа перспективных кандидатов наук и аспирантов. Со временем они стали докторами наук, профессорами и возглавили вновь созданные лаборатории и отделы. Таким образом, Виктором Михайловичем фактически была создана будущая школа советских вирусологов, которая в 70–90-е годы была лицом отечественной вирусологии.

Параллельно были построены радиологический и молекулярный корпусы Института вирусологии, в которых разместились 10 новых лабораторий, в том числе культур тканей, радиоактивных изотопов, физиологии вирусов и другие. По инициативе Виктора Михайловича была создана отделы клинической вирусологии и вирусных гепатитов, начали функционировать 6 региональных центров

Всемирной организации здравоохранения (по проблемам: Грипп, Арбовирусы, Герпес, Экология вирусов, Вирусные гепатиты, СПИД).

Президент РАМН Н.Н. Блохин назвал Институт вирусологии того времени «гордостью Академии».

В Викторе Михайловиче органично сочетались любовь к науке, огромный творческий потенциал, титаническая работоспособность, блестящая память, исключительный организаторский талант, знание людей, душевная щедрость и, как он сам говорил, «неисправимый оптимизм».

Вот несколько ярких черт характера Виктора Михайловича:

1. Способность одновременно выполнять множество больших и маленьких дел

Виктор Михайлович, как Цезарь, мог беседовать с нескончаемой вереницей пришедших с разными вопросами людей, ставить сложные опыты, отдавать распоряжения секретарю и подшучивать над своими молодыми неопытными помощниками.

2. Способность видеть дальше и больше собеседника

Он обладал способностью моментально схватывать суть любого вопроса и, анализируя чужую идею, находить в ней новые грани и возможности, скрытые от понимания самого автора.

3. Способность не заикливаться на неудачах

У Виктора Михайловича было редкое качество – не переживать по поводу вчерашних неприятностей. Он говорил: «Надо делать дело и думать о том, что дальше, а прошлое есть прошлое и нечего его без конца ворошить. Проанализируй, сделай правильные выводы – и вперед. Поражение – это лишь урок на будущее». Это было сказано на следующий день после того, как он получил выговор райкома партии за перерасход фонда зарплаты в институте. На следующее утро я пришел утешать его, но он как будто бы уже забыл, что произошло, и сказал: «Это было вчера, а надо думать о том, что будет завтра. Еще Цицерон говорил, что глупо рвать на себе волосы от горя, как будто горе уменьшится, если голова станет лысой».

4. Способность видеть в сделанном другими больше, чем видит сам исполнитель

Когда Виктор Михайлович выступал оппонентом, он поражал не только глубоким анализом работы, но и умением видеть то, что не увидел сам диссертант. Это был всегда высший пилотаж, возможный только благодаря эрудиции, аналитическим способностям и активному отношению к прочитанному, строго говоря, он был не оппонентом, а главным защитником.

5. Парадоксальность мышления

Во время холодной войны Виктор Михайлович, тогда заместитель министра, был директором советской медицинской выставки в США. Как-то ночью был сорван и сожжен советский флаг, который висел перед входом в выставочный павильон. Возможно, это была политическая акция. Виктор Михайлович распорядился повесить новый, а собравшимся корреспондентам заявил: «Такую глупость могли совершить только ускользнувшие от эволюции обезьяны». Это было сразу же растиражировано газетами США и имело больший эффект, чем все возможные протесты советской стороны.

6. Способность перестраиваться на ходу

Виктора Михайловича иногда упрекали в конформизме. Иногда он действительно менял собственные решения. Для стандартного руководителя это нехарактерно, куда проще по-военному: приказ начальника – закон для подчиненного.

Занятие наукой Виктор Михайлович считал самым увлекательным из всех видов человеческой деятельности. Он говорил: «Ставя эксперименты, мы как бы задаем природе вопросы. Она отвечает, а мы думаем – что бы это значило? И так шаг за шагом продвигаемся по тернистому пути познания». Порой казалось, что отдых ему в тягость. Он томился, скучал без работы. Идеи, которые теснились за его высоким лбом, все время требовали выхода и реализации. Виктор Михайлович работал постоянно и без остановок. Он давал себе задания и сам же выполнял их, не делая никаких скидок на возраст и усталость.

Старение его пугало. Достигнув 70 лет, он часто повторял: «Я уже старый человек!» Его расстраивали снижение работоспособности и физические недуги. Он говорил: «Раньше я мог писать в любой обстановке – в поезде, самолете, во время коллегий в министерстве и даже в машине между двумя заседаниями, а сейчас обленился и стал себя беречь».

Смысл жизни Виктор Михайлович видел в движении вперед и познании нового. Он находился в состоянии вечного поиска. Его упрекали за любовь кардинально менять направления научных исследований, оставляя на полпути начатые разработки. Сам он, смеясь, насчитал семь различных научных специальностей, которые он сменил за 25 лет. Его оппоненты или, как он их называл, «заклятые друзья», считали такой путь неразумным и малоэффективным. По их мнению, занимаясь чем-нибудь одним, он добился бы гораздо большего.

Он действительно любил разрабатывать новые большие проблемы, и, как только дело доходило до необходимости длительного накопления вторичных частных деталей и фактов, он терял к проблеме интерес, поручая доработку ученикам.

Знавшие его люди четко делились на две категории: друзей и недоброжелателей, просто равнодушных среди них не было. Как-то сказал мне о недоброжелателях: «Эти люди принимают доброту за мягкотелость, гибкость выдают за беспринципность, воспитанность за чистоплывство, а терпимость объявляют трусостью. Чужой успех они переживают как собственную неудачу, подменяют недоступные для них понятия привычными штампами. Чтобы безнаказанно руководить из-за угла, они пишут анонимки в вышестоящие организации».

Сверхзадачей Виктора Михайловича было вывести нашу вирусологию на мировой уровень, а все остальное (борьба амбиций, интриги, злопыхательство, зависть и прочее) он относил к неизбежному «фоновому» шуму.

Неординарные решения, парадоксальные поступки и оригинальные оценки и высказывания Виктора Михайловича служили бесконечной и излюбленной темой для разговоров людей, которые так или иначе с ним соприкасались.

В 50-е годы, когда велась доходящая до абсурда борьба за приоритеты (помните гордое «Россия – родина слонов»?!), Виктор Михайлович любил повторять: «Советский лилипут на две головы выше американского» или «Советский паралич – самый прогрессивный в мире!»

Когда Виктора Михайловича по его просьбе назначили директором Института вирусологии, он назвал это «переводом на низовую работу», а когда избрали членом президиума райкома партии, он сообщил: «Я теперь партийный деятель районного масштаба».

Виктору Михайловичу принадлежат такие яркие выражения, как «биологический потенциал страны» и «бюрократический садизм». Бюрократов он называл «группой, осуществляющей руководящие функции» или «рычагами Государственного аппарата».

В одной из работ он сформулировал основные стимулы научной работы: «Это либо выполнение социальных или административных заказов, либо научное любопытство или моральная ответственность».

Виктор Михайлович любил придумывать свои и повторять чужие афоризмы, которых знал во множестве:

«Пока одни докапываются до корней, другие успевают дотянуться до плодов».

«Стоит лишь одному сесть тебе на голову, как тут же за ним выстраивается очередь».

«Оковы измученного человечества сделаны из канцелярской бумаги».

«К любой деловой бумаге надо приделать ноги».

«Если все время будешь говорить один – будешь всегда прав».

«Опыт увеличивает нашу мудрость, но не уменьшает нашей глупости».

«Сам черт не разберет, отчего у нас быстрее продвигаются те, которые идут назад».

«Я никогда не утверждал, что научные сотрудники всегда приносят вред».

«Сделать из мухи слона можно, но это дорого обойдется».

«Руководить – это просто умело руками водить: того – туда, этого сюда».

«Чем больше я знаю, тем больше знаю лишнего».

«Надо бороться не с плесенью, а с сыростью».

«Чтобы дойти до цели, надо, по крайней мере, идти».

«Искусство быть мудрым состоит в умении знать, на что не следует обращать внимание».

«Самое плохое в жизни – то, что она проходит».

«Ни одно благодеяние не остается безнаказанным, но все же добрые дела делать рентабельнее злых».

Его продуктивность просто поражает! Всего им было опубликовано более 2500 работ, в том числе 1003 статьи и 32 книги. Под его руководством подготовлено более 40 докторов и 60 кандидатов наук.

Оценить истинный вклад В.М. Жданова в науку нам еще только предстоит, ведь, как и в случае с Д.И. Ивановским, многие его идеи и разработки далеко опережали время и до сих пор не оценены по достоинству.

Так, В.М. Жданов в 1974 году высказал гипотезу, согласно которой вирусы являются важным фактором эволюции органического мира. Преодолевая видовые барьеры, вирусы могут переносить отдельные гены или группы генов, а интеграция вирусной ДНК с хромосомами клеток может приводить к тому, что вирусные гены становятся частью клеточного генома. Эта гипотеза была полностью подтверждена в дальнейшем.

Другая его гипотеза об «интегральных» инфекциях связана с широкой областью патологии, далеко выходящей за рамки инфекционных заболеваний.

Логическим продолжением фундаментальных исследований, проведенных Виктором Михайловичем и его научной школой, стало использование методов генной инженерии для производства вакцин и интерферона.

Лебединой песней Виктора Михайловича оказался СПИД. Он одним из первых, еще в 1984 году, понял важность этой проблемы и заложил научные основы ее изучения, быстро развернул исследования по выделению и изучению вирусов, разработке диагностических тест-систем, экспериментальной терапии, получению профилактических вакцин.

К числу самых выдающихся, глобальных и общепризнанных заслуг В.М. Жданова относится разработка научно обоснованной программы ликвидации оспы в мире, которая была предложена им от лица Советского Союза в 1958 году. Обладая даром научного предвидения, предложил и обосновал на XI сессии Всемирной ассамблеи здравоохранения программу глобальной ликвидации оспы, которая стала первым опытом искоренения этого страшного инфекционного заболевания во всем мире. Сегодня невозможно просто представить, что эта морозная, или повальная, инфекция была одной из самых древних (наряду с чумой) и смертельно опасных. Она была постоянным спутником человечества, поражая людей всех возрастов и национальностей. Погибал практически каждый второй-третий заболевший, а среди выживших многие становились слепыми и обезображенными.

Смелая программа Виктора Михайловича встретила в свое время немалый скептицизм, но ее реализация увенчалась через два десятилетия блестящим итогом – оспа была ликвидирована даже в тех странах Азии и Африки, где испокон веков существовали постоянные очаги этого заболевания. По самым приблизительным оценкам, стратегия всемирного искоренения оспы помогла спасти сотни миллионов жизней.

В 1976 году В.М. Жданов был награжден почетным знаком ВОЗ «Бифуркационная игла» и дипломом «За выдающиеся заслуги в деле ликвидации оспы во всем мире».

В 2020 году за свои усилия по искоренению оспы Виктор Михайлович вместе с американским эпидемиологом Уильямом Фейги были удостоены премии Future of Life Award.

Генеральный секретарь ООН Антониу Гутерриш сказал по этому поводу: «Мы все в долгу перед Виктором Ждановым и Биллом Фейги и за их решающий вклад в искоренение оспы».

Билл Гейтс добавил: «Они являются феноменальными примерами того, что значит использовать науку для глобального здравоохранения».

Основатель движения за эффективный альтруизм Уильям Макэшил так озаглавил статью, посвященную Жданову: «Лучший человек из когда-либо живших». Думаю, что это справедливо!

Виктор Михайлович скончался в 1987 году в возрасте 73 лет. Последняя запись, которую он сделал в дневнике: «Я не совершил того, что должен был и мог совершить в своей жизни».

*Ф.И. Еришов,
академик РАН, д-р мед. наук, профессор,
главный научный сотрудник
ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России, Москва*

ИНФОРМАЦИЯ



О вручении Государственной премии в области науки и техники за 2023 год члену-корреспонденту РАН Петру Михайловичу Чумакову

12 июня 2024 г. в Георгиевском зале Большого Кремлевского дворца, в день независимости России, состоялось вручение Государственных премии Российской Федерации в области науки и техники за 2023 г. Премии вручались Президентом России В.В. Путиным. Одним из лауреатов Государственной премии является доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН и член редакционного Совета журнала «Вопросы вирусологии» Петр Михайлович Чумаков. Премия присуждена за цикл фундаментальных и прикладных работ по изучению функций гена основного опухолевого супрессора p53 в норме и патологии. Петр Михайлович – сын выдающихся и всемирно известных советских вирусологов академика АМН М.П. Чумакова и члена-корреспондента АМН М.К. Ворошиловой. Сердечно поздравляем Петра Михайловича с этой высокой наградой и желаем дальнейшего процветания всему всемирно известному вирусологическому клану Чумаковых.

Главный редактор, академик РАН *Д.К. Львов*
Ответственный секретарь, член-корр. РАН *С.В. Альховский*

Problems
of Virology

Voprosy
Virusologii