



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

4

Том 69 • 2024

Volume 69 • Issue 4 • 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 30.08.2024.

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.

4

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 August 30, 2024.
Print format 60 × 90^{1/8}.
Circulation 50 copies.

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

16+

© Central Research Institute for Epidemiology, 2024

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

PROBLEMS OF VIROLOGY

(VOPROSY VIRUSOLOGII)

SCIENTIFIC THEORETICAL JOURNAL ISSUED
ONCE IN TWO MONTHS

Published since 1956

4

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

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ngombe Mouabata D.F.L., Boumba A.L.M., Iloukou Mayakia P.J., Massengo N.R.B., Takale R.P., Moukassa D., Ennaji M.M. Молекулярная диагностика папилломавирусов высокого риска и статус вакцинации среди женщин с нормальной цитологией в Конго*	301
Носик Д.Н., Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Каплина Э.Н. Влияние дезоксирибонуклеата натрия с железом комплекса на экспрессию поверхностных маркеров клеток МТ-4, инфицированных вирусом иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) (Retroviridae: <i>Primate lentivirus group</i>)*	309
Odebisi-Omokanye M.B., Suleiman M.M., Sulaiman M.K., Atolagbe S.A. Частота выявления антител к вирусу Западного Нила среди пациентов с острой фебрильностью в Илорине, Нигерия*	320
Кустова Д.Д., Почтовый А.А., Шпакова О.Г., Штинова И.А., Кузнецова Н.А., Клейменов Д.А., Комаров А.Г., Гуцин В.А. Молекулярно-биологические закономерности сохранения циркуляции вируса SARS-CoV-2 в человеческой популяции*	329
Salim Z.F., Hamad B.J. Молекулярная диагностика вируса ветряной оспы в спинномозговой жидкости пациентов с инсультом из провинции Ди-Кар*	341
Асатрян М.Н., Шмыр И.С., Тимофеев Б.И., Щербинин Д.Н., Агасарян В.Г., Тимофеева Т.А., Ершов И.Ф., Герасимук Э.Р., Ноздрачева А.В., Семенов Т.А., Логунов Д. Ю., Гинцбург А.Л. Разработка, изучение и сравнение моделей перекрестного иммунитета к вирусу гриппа с применением статистических методов и машинного обучения*	349
Великжанина Е.И., Сашина Т.А., Морозова О.В., Кашников А.Ю., Епифанова Н.В., Новикова Н.А. Необычные ВА222-подобные штаммы <i>Rotavirus A</i> (Sedoreoviridae: <i>Rotavirus: Rotavirus A</i>): молекулярно-генетический анализ на основе всех сегментов генома*	363
Охлопкова О.В., Гончаров А.Е., Асланов Б.И., Фадеев А.В., Давидюк Ю.Н., Мошкин А.Д., Столбунова К.А., Степанюк М.А., Соболев И.А., Тюменцева М.А., Тюменцев А.И., Шестопалов А.М., Акимкин В.Г. Первое обнаружение вирусов гриппа А субтипов Н1N1 и Н3N8 в Антарктическом регионе: о. Кинг-Джордж, 2023 год*	377
РЕЦЕНЗИИ	
Жирнов О.П. «Клещевой энцефалит в XXI веке». Отзыв на коллективную монографию под редакцией академика РАН В.И. Злобина	390
НЕКРОЛОГ	
Колобухина Людмила Васильевна	392

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

- Ngombe Mouabata D.F.L., Boumba A.L.M., Iloukou Mayakia P.J., Massengo N.R.B., Takale R.P., Moukassa D., Ennaji M.M.**
Molecular detection of high-risk papillomaviruses and vaccination status in normal cytology in Congo* 301
- Nosik D.N., Selimova L.M., Kalnina L.B., Kaplina E.N.**
The effect of sodium deoxyribonucleate with iron complex on the expression of surface markers of MT-4 cells infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) (Retroviridae: *Primate lentivirus group*)* 309
- Odebisi-Omokanye M.B., Suleiman M.M., Sulaiman M.K., Atolagbe S.A.**
Seropositivity of West Nile virus among acute febrile patients in Ilorin, Nigeria* 320
- Kustova D.D., Pochtovyi A.A., Shpakova O.G., Shtinova I.A., Kuznetsova N.A., Kleimenov D.A., Komarov A.G., Gushchin V.A.**
The Molecular and Biological Patterns Underlying Sustained SARS-CoV-2 Circulation in the Human Population* 329
- Salim Z.F., Hamad B.J.**
Molecular Study of Varicella zoster virus in Cerebrospinal Fluid from Stroke Patients of Thi-Qar province* 341
- Asatryan M.N., Shmyr I.S., Timofeev B.I., Shcherbinin D.N., Agasaryan V.G., Timofeeva T.A., Ershov I.F., Gerasimuk E.R., Nozdracheva A.V., Semenenko T.A., Logunov D.Yu., Gintsburg A.L.**
Development, study and comparison of models of cross-immunity to the influenza virus using statistical methods and machine learning* 349
- Velikzhanina E.I., Sashina T.A., Morozova O.V., Kashnikov A.Y., Epifanova N.V., Novikova N.A.**
Unusual BA222-like strains of *Rotavirus A* (Sedoreoviridae: *Rotavirus: Rotavirus A*): molecular and genetic analysis based on all genome segments* 363
- Ohlopkova O.V., Goncharov A.E., Aslanov B.I., Fadeev A.V., Davidyuk Y.N., Moshkin A.D., Stolbunova K.A., Stepanyuk M.A., Sobolev I.A., Tyumentseva M.A., Tyumentsev A.I., Shestopalov A.M., Akimkin V.G.**
First detection of influenza A virus subtypes H1N1 and H3N8 in the Antarctic region: King George Island, 2023* 377
- BOOK REVIEWS**
- Zhirnov O.P.**
«Tick-borne encephalitis in the 21st century». Review of the collective monograph edited by Academician of the Russian Academy of Sciences V.I. Zlobin 390
- OBITUARY**
- Lyudmila V. Kolobukhina 392

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**ORIGINAL STUDY ARTICLE**DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-239>

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

Molecular detection of high-risk papillomaviruses and vaccination status in normal cytology in Congo

Dorine F.L. Ngombe Mouabata^{1,2}, Anicet L.M. Boumba¹⁻³, Patrina J. Iloukou Mayakia^{1,2}, Norvi R.B. Massengo², Ragive P. Takale², Donatien Moukassa², Moulay M. Ennaji^{1✉}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**Abstract****Objective:** The aim of this study was to identify the molecular prevalence of high-risk HPV infection and the distribution of genotypes present in normal cytology, as well as to determine the vaccination status of our study population.**Methods:** 110 cervical samples were taken from individuals, and 1 ml of each sample was added to the Xpert HPV cartridge in the sample compartment before it was placed in the Cepheid GeneXpert system. Detection was performed simultaneously via amplification of the *E6* and *E7* genes in five fluorescent channels (HPV16, HPV18/45, HPV31/33/35/52/58, HPV51/59, and HPV39/56/66/68a).**Results:** 36/110 (33%) of all samples tested were positive for HPV DNA. The predominant genotypes were HPV16 (12.7%) and other pooled HR-HPV types (8.2%). All women who received the Gardasil-9 vaccine (3.6%) had HPV, and infection was associated with travel outside Africa. 96.4% of the screened individuals had not received any HPV vaccine.**Conclusion:** Our research confirms a widespread HR-HPV infection in our population and extends the importance of studies on the molecular prevalence of HPV, particularly in women with normal cytology and apparent good health, in view of the cruel lack of public awareness of HPV infections.**Keywords:** *High-risk Human Papillomavirus; normal cytology; vaccination status; molecular epidemiology; HPV genotypes***For citation:** Ngombe Mouabata D.F.L., Boumba A.L.M., Iloukou Mayakia P.J., Massengo N.R.B., Takale R.P., Moukassa D., Ennaji M.M. Molecular detection of high-risk papillomaviruses and vaccination status in normal cytology in Congo. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(4): 301–308. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-239> EDN: <https://elibrary.ru/vbwmzy>**Funding.** This study was not supported by any external sources of funding.**Acknowledgement.** The authors would like to thank the Moroccan Ministry of Higher Education, Scientific Research and Innovation, CNRST, the Faculty of Sciences and Techniques of Mohammedia, Hassan II University of Casablanca, Casablanca, Morocco, Department of Health and Human Biology, Faculty of Health Sciences, Marien N'gouabi University (FSSA), Brazzaville, Congo, the Molecular Biology Laboratory of the Polyclinic of the Marie Madeleine Gombes Foundation in Congo, Laboratory Virology, Oncology, Biosciences, Environment and New Energies and the Virology, Oncology and Technology team. We would like to thank all the women for their participation in this study.**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.**Ethics approval.** The study was conducted with the informed consent of the patients. The study protocol was approved by the Health Sciences Research Ethics Board (HSRB) (Protocol No. 251/MRSIT/IRSSA/CERSSA dated January 20th, 2023).

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-239>

Молекулярная диагностика папилломавирусов высокого риска и статус вакцинации среди женщин с нормальной цитологией в Конго

Dorine F.L. Ngombe Mouabata^{1,2}, Anicet L.M. Boumba¹⁻³, Patrina J. Iloukou Mayakia^{1,2}, Norvi R.B. Massengo², Ragive P. Takale², Donatien Moukassa², Moulay M. Ennaji^{1✉}

¹Лаборатория вирусологии, онкологии, наук о жизни, окружающей среды и новых энергий (LVO BEEN), факультет науки и технологии, Мохаммедия, Университет Хасана II в Касабланке, Касабланка, Марокко;

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

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

Резюме

Цель: Цель данного исследования – определение молекулярными методами распространенности ВПЧ-инфекции высокого риска и распределения генотипов вируса среди женщин с нормальной цитологией, а также определение статуса вакцинации в исследуемой когорте.

Методы: Исследованы 110 цервикальных образцов, по 1 мл каждого образца вносили в картридж Xpert HPV в отсеке для образцов перед помещением в систему Serheid GeneXpert. Одновременная детекция всех мишеней при амплификации генов E6 и E7 проводилась в 5 флуоресцентных каналах (HPV16, HPV18/45, HPV31/33/35/52/58, HPV51/59 и HPV39/56/66/68a).

Результаты: Из всех исследованных образцов 36/110 (33%) были положительными по ДНК ВПЧ. Преобладающими генотипами были ВПЧ-16 (12,7%) и прочие объединенные генотипы ВПЧ высокого риска (8,2%). Все женщины, получавшие вакцину Gardasil-9 (3,6%), имели ВПЧ-инфекцию, предположительно ассоциированную с поездками за пределы Африки. Остальные участницы исследования (96,4%) никакой вакцины против ВПЧ не получали.

Заключение: Наше исследование подтверждает широкую распространенность инфекции, вызванной ВПЧ высокого риска, в нашей популяции и подчеркивает важность изучения распространенности ВПЧ молекулярными методами, особенно у здоровых женщин с нормальной цитологией, в связи с высоким уровнем неосведомленности населения о ВПЧ-инфекции.

Ключевые слова: ВПЧ высокого риска; нормальная цитология; статус вакцинации; молекулярная эпидемиология; генотипы ВПЧ

Для цитирования: Ngombe Mouabata D.F.L., Boumba A.L.M., Iloukou Mayakia P.J., Massengo N.R.B., Takale R.P., Moukassa D., Ennaji M.M. Молекулярная диагностика папилломавирусов высокого риска и статус вакцинации среди женщин с нормальной цитологией в Конго. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(4): 301–308. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-239> EDN: <https://elibrary.ru/vbwmzy>

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

Благодарность. Авторы выражают благодарность Министерству высшего образования, научных исследований и инноваций Марокко, CNRST, факультету наук и техники Мохаммедии, Университету Хасана II в Касабланке, Касабланка, Марокко, кафедре здравоохранения и биологии человека, факультету медицинских наук, Университету Мариен Н'гуаби (FSSA), Браззавиль, Конго, Лаборатории молекулярной биологии поликлиники Фонда Мари Мадлен Гомбес в Конго, Лаборатории вирусологии, онкологии, наук о жизни, окружающей среды и новых энергий и группа вирусологии, онкологии и технологий. Также хотели бы поблагодарить всех женщин за участие в этом исследовании.

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 Советом по этике научных исследований в области здравоохранения (HSRB) (Протокол №251/MRSIT/IRSSA/CERSSA от 20.01.2023).

Introduction

Cervical cancer (CC) is a serious health problem that kills many people every year. It accounts for 10% of all malignant tumours and is the fourth most common cancer in women worldwide, with an incidence of 604,127 new cases (13,3%) [1–3]. Sub-Saharan Africa is one of the regions with the greatest impact of CC, with low screening rates and delayed diagnosis and treatment [4, 5].

In 2020, cervical cancer had a 25.5% increase in incidence rate¹ and 14.2% of cancer deaths were caused by CC in the Congo [3, 6, 7]. More than 95% of cervical cancers are caused by sexually transmitted HPV, with 90% of these women living in low- or middle-income countries [8].

¹IARC. Cancer Today. Available at: <http://gco.iarc.fr/today/home>

Human papillomavirus (HPV) is a common sexually transmitted infection that is diagnosed worldwide [4]. Currently, 202 different HPV genotypes have been identified, according to the International HPV Reference Center [5]. It is estimated that HPV causes 610,000 new cases of cancer and 250,000 deaths per year [9, 10]. Sub-Saharan Africa is the region most affected, with a 24% prevalence of HPV infection in women with normal cytology [11]. In the Republic of Congo, recent studies of HPV in normal cytology have identified the main characteristics of HPV16, HPV35 and HPV33 infection [12–15]. The increase in HPV prevalence is the result of both a lack of CC screening and a lack of awareness among young Congolese.

The benefits of HPV vaccination are evident in high-income countries that introduced national HPV vaccination programmes earlier. In contrast, many countries in sub-Saharan Africa have not yet implemented national HPV vaccination programmes and still face low vaccination coverage in implementing countries [16, 17]. The new recommendation from the Strategic Advisory Group of Experts on Immunization (SAGE) is underpinned by concerns about the slow introduction of the HPV vaccine into vaccination programmes and the low overall population coverage, particularly in the poorest countries [8]. The HPV vaccine is highly effective in preventing HPV serotypes 16 and 18, which cause 70% of cervical cancers. Currently, the licensed HPV vaccines available are classified as bivalent, quadrivalent, and non-valent, depending on the number of HPV strains targeted [17]. In order to highlight the importance of cervical cancer screening and the value of introducing vaccination programmes in the Congo, we undertook this study with the aim of identifying the molecular prevalence of high-risk HPV infection and the geographical distribution of genotypes present in normal cytology, as well as determining the vaccination status of our study population.

Material and methods

Study site

The study was carried out in the anatomo-cytopathology unit of the Centre Hospitalier et Universitaire de Brazzaville (CHU-B).

Participants and type of study

This was a descriptive cross-sectional study with retrospective data conducted in April 2023. The sampling method used was a random selection of 110 cervical samples, which were taken from women who had undergone a speculum examination.

Inclusion criteria

- Have a normal cervical smear cytology result in the CHU-B cytology report register.
- Have a contact number that can be reached.
- Be physically fit for the clinical examination.
- Have agreed to have the smear taken again and have given informed consent.

- Have a confirmed diagnosis of normal cytology after resampling.

Exclusion criteria

- Not having given consent.
- Have an abnormal cytological examination.
- Menstruating.
- Under antibiotic treatment.

The study was conducted with the informed consent of the patients. The study protocol was approved by the Health Sciences Research Ethics Board (HSRB) (Protocol No. 251/MRSIT/IRSSA/CERSSA dated January 20th, 2023).

Data and sample collection

A survey questionnaire, including information on socio-demographic characteristics, was completed for each patient. Smears were obtained using an Ayre spatula and an endocervical cytobrush and were stored in special tubes containing 4 ml of PreservCyt transport medium kept at -80°C until processing.

DNA extraction and analysis of the DNA extract

DNA extraction was performed on all samples. A conventional PCR of a 268-bp fragment of the beta-globin gene with primers GH20 and PC0431 was performed to ensure the quality of the extract. The presence of the housekeeping gene and the absence of inhibitors were confirmed in all samples (100%).

HPV detection and genotyping

Genotyping was carried out by real-time PCR using GeneXpert technology in order to differentiate the HPV DNA present by molecular typing. The Xpert HPV Assay enables simultaneous detection via amplification of the *E6* and *E7* genes in 3 fluorescent channels (HPV16, HPV18/45, and other HR-HPVs such as HPV31/33/35/52/58/51/59/39/56/66/68a).

The assay also includes a human control gene (hydroxymethylbilane synthase [HMBS]) to verify the validity of the sample and amplification. An internal Probe Verification Control (PCC) is used to check reagent rehydration, filling of the PCR tube into the cartridge, probe integrity, and dye stability [18].

Execution of the test

For the execution of the test, 1 mL of sample was added to the cartridge in the sample compartment. The cartridge was then inserted into the device and the test started. After 60 minutes of the run, the typing result, interpreted by the Xpert software, was obtained in the form of a pool [18].

Statistical analysis

The correlation between HPV seroprevalence and independent variables was analysed using Pearson's chi-squared test and/or Fisher's exact test and Odds ratio. P values less than 0.05 were considered statistically significant. Microsoft Excel 2019 was used to create the database, and statistical analyses were performed using RStudio 2023.06.0+421 Mountain Hydrangea Release with R version 4.2.2.

Table 1. General characteristics of the study population associated with HPV infection

Таблица 1. Общая характеристика исследуемой популяции, связанной с инфекцией ВПЧ

Variables Характеристики	HPV / ВПЧ							OR (IC 95%) / ОШ (95% ДИ)	p-value
	Overall / Всего n	(%)	HPV- / ВПЧ- n	HPV- / ВПЧ- (%)	HPV+ / ВПЧ+ n	HPV+ / ВПЧ+ (%)			
Age Возраст									
17–27	27	24.5	15	13.6	12	10.9	Ref. / Реф.	0.3	
28–37	37	33.6	25	22.7	12	10.9	0.60 (0.35–2.36)		
38–47	26	23.6	18	16.4	8	7.3	0.55 (0.32–1.65)		
48–57	11	10.0	8	7.3	3	2.7	0.46 (0.21–3.25)		
58–67	7	6.4	7	6.4	0	0.0	–		
68–71	2	1.8	2	1.8	0	0.0	–		
Alcohol consumption Употребление алкоголя									
No Нет	61	55.5	43	39.1	18	16.4	Ref. / Реф.	0.2	
Yes Да	49	44.5	32	29.1	17	15.5	1.26 (0.56–2.83)		
Age of first sexual intercourse Возраст первого сексуального контакта									
< 18	70	63.6	48	43.6	22	20.0	Ref. / Реф.	0.01	
≥ 18	40	36.4	27	24.5	13	11.8	1.05 (1.02–2.41)		
Tobacco consumption Употребление табака									
No Нет	92	83.6	64	58.2	28	25.5	Ref. / Реф.	0.1	
Yes Да	18	16.4	11	10.0	7	6.4	1.45 (0.51–4.14)		
Multiple sexual partner Несколько сексуальных партнеров									
< 5	57	51.8	40	36.4	17	15.5	Ref. / Реф.	0.07	
≥ 5	53	48.2	35	31.8	18	16.4	1.21 (0.54–2.70)		
Past STI									
No	88	80.0	59	53.6	29	26.4	Ref. / Реф.	0.06	
Yes	22	20.0	16	14.5	6	5.5	0.76 (0.27–2.15)		
Number of pregnancies Число беременностей									
Asun Не было	30	27.3	18	16.4	12	10.9	Ref. / Реф.	0.3	
< 5	46	41.8	31	28.2	15	13.6	0.72 (0.21–2.07)		
≥ 5	34	30.9	26	23.6	8	7.3	0.46		
Contraceptive use Использование контрацептивов									
No Нет	40	36.4	31	28.2	9	8.2	Ref. / Реф.	0.05	
Yes Да	70	63.6	44	40.0	26	23.6	2.03 (0.83–4.93)		
Risky sexual behavior Рискованное сексуальное поведение									

For continuation of Table 1, see page 3
Продолжение табл. 1 см. на стр. 305

Variables Характеристики	HPV / ВПЧ							OR (IC 95%) / ОШ (95% ДИ)	p-value
	Overall / Всего n	(%)	HPV- / ВПЧ- n	HPV- / ВПЧ- (%)	HPV+ / ВПЧ+ n	HPV+ / ВПЧ+ (%)			
No Нет	58	52.7	45	40.9	13	11.8	Ref. / Реф.	0.02	
Yes Да	52	47.3	30	27.3	22	20.0	2.53 (1.11–5.80)		
Multiple Infection HR-HPV Множественная инфекция ВПЧ высокого риска									
Yes Да	13	11.8	0	0.0	13	11.8	–		
No Нет	23	20.9	0	0.0	23	20.9	–		
Types of HPV / Типы ВПЧ									
HPV16 / ВПЧ-16	14	12.7	7	6.4	7	6.4	2.89 (0.86–6.24)	0.4	
Others HR-HPV / Другие ВПЧ высокого риска	9	8.2	6	5.5	3	2.7	1.44 (0.46–2.56)		
HPV18/45 / ВПЧ-18/45	3	2.7	1	0.9	2	1.8	5.78 (0.67–8.94)		
HPV16/18/45 / ВПЧ-16/18/45	2	1.8	1	0.9	1	0.9	2.89 (0.32–4.15)		
HPV16/Others HR-HPV ВПЧ-16/Другие ВПЧ высокого риска	8	7.3	5	4.5	3	2.7	1.73 (0.11–4.79)		
HPV Vaccination Вакцинация против ВПЧ									
No Нет	106	96.4	71	55.4	35	31.8	Ref. / Реф.	0.08	
Yes Да	4	3.6	4	3.6	0	0.0	0.70 (0.02–6.88)		
Number of vaccine injections Число инъекций вакцины									
No injection Не было инъекций	106	96.4	71	55.4	35	31.8	–	0.1	
1 or 2 injections 1 или 2 инъекции	1	0.9	1	0.9	0	0.0	–		
3 injections 3 инъекции	3	2.7	3	2.7	0	0.0	–		
Travel outside Africa Путешествие за пределы Африки									
No Нет	106	96.4	72	65.5	35	31.8	Ref.	0.09	
Yes Да	4	3.6	4	3.6	0.0	0.0	0.70 (0.07–7.03)		

Note. Age of first sexual intercourse, Risky sexual behavior, Contraceptive use ($p \leq 0.05$).

Примечание. Возраст первого полового акта, рискованное сексуальное поведение, использование контрацептивов ($p \leq 0,05$).

Results

Analysis of socio-demographic characteristics

With extremes ranging from 17 to 71 years of age, a peak in frequency (33.6%) was observed between 28 and 37 years of age, and the mean age of all women was 36.59 ± 12.86 years. We studied certain risk factors associated with HPV infection in women with cervical cancer, the frequencies of which are shown in **Table 1**.

HPV molecular prevalence and genotyping

Of the 110 samples, in line with our results, 36/110 (33%) of all samples were tested positive for HPV DNA.

Prevalence of HR-HPV with univariate risk factors

In this univariate logistic regression analysis, risky sexual behaviour and contraceptive use were positively associated with HR-HPV as predominant risk factors in our population (**Table 2**). The predominant genotypes

Table 2. Some characteristics of the study population associated with HPV vaccination

Таблица 2. Некоторые характеристики исследуемой популяции, связанные с вакцинацией против ВПЧ

Variables Характеристики	HPV Vaccination Вакцинация против ВПЧ					
			No Нет		Yes Да	
	<i>n</i>	(%)	<i>n</i>	(%)	<i>n</i>	(%)
Age Возраст						
17–27	27	24.5	27	24.5	0	0.0
28–37	37	33.6	35	31.8	2	1.8
38–47	26	23.6	24	21.8	2	1.8
48–57	11	10.0	11	10.0	0	0.0
58–67	7	6.4	7	6.4	0	0.0
68–71	2	1.8	2	1.8	0	0.0
Number of vaccine injections Число инъекций вакцины						
No injection Не было инъекций	106	96.4	106	96.4	0	0.0
1 or 2 injections 1 или 2 инъекции	1	0.9	0	0.0	1	0.9
3 injections 3 инъекции	3	2.7	0	0.0	3	2.7
Travel outside Africa Путешествие за пределы Африки						
No Нет	106	96.4	106	96.4	0	0.0
Yes Да	4	3.6	0	0.0	4	3.6

were HPV16 (12.7%) and other grouped HR-HPV types (8.2%). It should be noted that multiple HR-HPV infections were identified in 13 cases. All the women who received the Gardasil-9 vaccine had HPV (3.6%), and infection was associated with travel outside Africa.

Vaccination status according to socio-demographic factors

Table 2 shows the distribution of HPV vaccination status by age in the population. It can be seen that the 28–37 and 38–47 age groups were those who had received the Gardasil-9 vaccine. 96.4% of the screened women had not received any HPV vaccine.

Discussion

In the management of women with ambiguous cytology results, HPV DNA testing for the early detection of precancerous cervical lesions is now widely recognised as a reliable and validated option. Recently, there has also been interest in the use of HPV testing in cervical samples from asymptomatic women without cytological abnormalities [19]

The prevalence of HPV infection (33%) was high in our study. In 2013, Boumba et al. revealed that 23.5% of Congolese women with normal cytology had HPV+. 10 years after this pioneering study, our observations show an increase

in the prevalence of HPV infection, and this finding clearly shows that prevention methods to date have not improved at all since the study by Boumba et al. [20].

Univariate logistic regression analysis between HPV infection and the risk factors collected revealed an association with age at first sexual intercourse, risky sexual behavior, and contraceptive use. Risky sexual practices were highly prevalent in this area. Studies of healthy African women under 25 years of age show high sexual activity associated with high HPV prevalence (70.0 to 84.0%) [21, 22] which confirms the different risk factors found in our study linked to women’s sexual behaviour.

The distribution of the genotypic profile showed 32.7% HR-HPV in women with a normal cytology diagnosis. These results confirm the strong presence of HR-HPV and corroborate the study by Boumba et al. (2013), who found 60.4% and Tsimba et al. (21.5%) of oncogenic genotypes in normal cytology.

This study also identified 3 distinct oncogenic HPV genotypes: HPV16/18 and 45, the most prevalent of which was HPV type 16 (12.7%). The pooled genotyping of the other HR-HPV types (31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, and 68) had the second highest frequency (8.2%), showing the hypothesis that beyond HPV16 and 18, the other HR-HPV types are needed to be identified in Africa, although

the mechanism of CC carcinogenesis in Central Africa remains to be determined. This hypothesis is in line with the results of a recent HPV study that found six frequently encountered HR-HPV infections (25%), including HPV-35, HPV-56, and HPV-68, are not targeted by the Gardasil-9 vaccine [13].

These results show the importance of carrying out studies on the existing molecular epidemiology of unidentified HPV infections throughout the Congolese territory, which are common in Africa.

The HPV vaccine is highly effective in preventing HPV genotypes 16 and 18, which cause 70% of cervical cancers. Vaccination status in our population was very low (3.6%), confirming the slowness and non-existence of prevention programmes through the introduction of the HPV vaccine and the low overall population coverage, particularly in low-resource countries [8]. It should be noted that the women who received the various injections or doses (1 or 2 injections, or 3 injections) were all HPV-positive, which may suggest that these women had acquired protection against HR-HPV. SAGE therefore strongly encourages all countries to set up HPV vaccination programmes and to give priority to older girls who have not yet been vaccinated. The aim of these recommendations is to enable more girls and women to benefit from vaccination and thus prevent cervical cancer and its consequences throughout their lives [8].

Conclusion

Our research confirms the existence of widespread HR-HPV infection in our population and extends the importance of studies on the molecular prevalence of HPV, particularly in women with normal cytology and apparent good health. These results underline the importance of including HPV testing in cervical cancer screening and diagnosis, in addition to cervical smear testing, in order to significantly improve health programmes. Given the imperative of increasing HPV vaccination coverage in sub-Saharan Africa, and now with the announcement of the WHO's cervical cancer elimination strategy, it is essential to put in place implementation strategies to overcome barriers and reach target populations.

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Ba D.M., Ssentongo P., Musa J., Agbese E., Diakite B., Traore C.B., et al. Prevalence and determinants of cervical cancer screening in five sub-Saharan African countries: A population-based study. *Cancer Epidemiol.* 2021; 72: 101930. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2021.101930>
- Arbyn M., Weiderpass E., Bruni L., de Sanjosé S., Saraiya M., Ferlay J., et al. Estimates of incidence and mortality of cervical cancer in 2018: a worldwide analysis. *Lancet Glob. Health.* 2020; 8(2): e191–203. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30482-6](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30482-6)
- Christian N.F.S., Liboko B.A.F., Mabila Y., Moussavou D.R.A., Moukassa D., Mbon N.J.B. Precancerous lesions of cervix in the Lekoumou and Niari departments (Congo Brazzaville). *Cancer Sci. Res.* 2022; 5(1): 1–5.
- Yimer N.B., Mohammed M.A., Solomon K., Tadese M., Grutzmacher S., Meikena H.K., et al. Cervical cancer screening uptake in Sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *Public Health.* 2021; 195: 105–11. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2021.04.014>
- Mumba J.M., Kasonka L., Owiti O.B., Andrew J., Lubeya M.K., Lukama L., et al. Cervical cancer diagnosis and treatment delays in the developing world: Evidence from a hospital-based study in Zambia. *Gynecol. Oncol. Rep.* 2021; 37: 100784. <https://doi.org/10.1016/j.gore.2021.100784>
- Christian N.F.S., Liboko B.A.F., Mabila Y., Moussavou D.R.A., Moukassa D., Mbon N.J.B. Precancerous lesions of cervix in the Lekoumou and Niari departments (Congo Brazzaville). *Cancer Sci. Res.* 2022; 5(1): 1–5.
- Bruni L., Albero G., Serrano B., Mena M., Collado J.J., Gómez D., et al. ICO/IARC information centre on HPV and cancer (HPV Information Centre) Human papillomavirus and related diseases in Saudi Arabia. Summary Report; 2023. Available at: <https://hpvcentre.net/statistics/reports/SAU.pdf>
- Belglaiaa E., Elannaz H., Mouaouya B., Aksim M., Mercier M., Prétet J.L., et al. Human papillomavirus genotypes among women with or without HIV infection: an epidemiological study of Moroccan women from the Souss area. *Infect. Agent Cancer.* 2015; 10: 44. <https://doi.org/10.1186/s13027-015-0040-y>
- OMS 2022. One-dose Human Papillomavirus (HPV) vaccine offers solid protection against cervical cancer; 2024. Available at: [https://www.who.int/news/item/11-04-2022-one-dose-human-papillomavirus-\(hpv\)-vaccine-offers-solid-protection-against-cervical-cancer](https://www.who.int/news/item/11-04-2022-one-dose-human-papillomavirus-(hpv)-vaccine-offers-solid-protection-against-cervical-cancer)
- de Sanjosé S., Bruni L., Alemany L. HPV in genital cancers (at the exception of cervical cancer) and anal cancers. *Presse Med.* 2014; 43(12 Pt. 2): e423-8. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2014.10.001>
- Mousavi T., Rafiei A., Haghshenas M.R., Sadeghian-Kiadehi S.F., Valadan R. Molecular prevalence and phylogenetic analysis of human papillomavirus in normal cervical samples from northern Iran. *Gene Rep.* 2020; 21: 100958. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100958>
- De Vuyst H., Alemany L., Lacey C., Chibwesa C.J., Sahasrabudde V., Banura C., et al. The burden of human papillomavirus infections and related diseases in sub-Saharan Africa. *Vaccine.* 2013; 31(Suppl. 5(0 5)): F32–46. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.07.092>
- Boumba L.M.A., Mouallif M., Hilali L., Moukassa D., Ennaji M.M. Prevalence of human papillomavirus infection among Congolese women with normal cervical cytology. *Int. J. Sci. Res.* 2015; 4(3): 521–6.
- Tsimba Lemba P.C., Boumba L.M.A., Péré H., Nganga P.C., Veyer D., Puech J., et al. Human papillomavirus genotype distribution by cytological status and associated risk factors in the general population of Congolese women living in urban and rural areas: Implications for cervical cancer prevention. *Infect. Dis. Now.* 2023; 53(8): 104762. <https://doi.org/10.1016/j.idnow.2023.104762>
- Nganga P.C., Boumba L.M.A., Tsimba C.P.L., Tchibinda F.G.L., Nkounkou R.B.B., Ataboho E.E., et al. Prevalence and genotyping of human papillomavirus among women in the departments of Niari and Bouenza, Republic of the Congo. *J. Biosci. Med.* 2022; 10(1): 64–77. <https://doi.org/10.4236/jbm.2022.101007>
- Kisaakye E., Namakula J., Kihembo C., Kisakye A., Nsubuga P., Babirye J.N. Level and factors associated with uptake of Human papillomavirus infection vaccine among female adolescents in Lira District, Uganda. *Pan Afr. Med. J.* 2018; 31: 184. <https://doi.org/10.11604/pamj.2018.31.184.14801>
- Rujumba J., Akugizibwe M., Basta N.E., Banura C. Why don't adolescent girls in a rural Uganda district initiate or complete routine 2-dose HPV vaccine series: Perspectives of adolescent girls, their caregivers, healthcare workers, community health workers and teachers. *PLoS One.* 2021; 16(6): e0253735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253735>
- Brandt H.M., Pierce J.Y., Crary A. Increasing HPV vaccination through policy for public health benefit. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2016; 12(6): 1623–5. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1122145>
- Cuschieri K., Geraets D., Cuzick J., Cadman L., Moore C., Vanden Broeck D., et al. Performance of a cartridge-based assay for detection of clinically significant Human Papillomavirus (HPV) infection: lessons from VALGENT (Validation of HPV Genotyping Tests). *J. Clin. Microbiol.* 2016; 54(9): 2337–42. <https://doi.org/10.1128/JCM.00897-16>
- Centurioni M.G., Puppo A., Merlo D.F., Pasciuccio G., Cusimano E.R., Sirito R., et al. Prevalence of human papillomavirus

- cervical infection in an Italian asymptomatic population. *BMC Infect. Dis.* 2005; 5: 77. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-5-77>
21. Boumba L.M.A., Mouallif M., Hilali L., Moukassa D., Ennaji M.M. Prevalence of human papillomavirus infection among Congolese women with normal cervical cytology. *Int. J. Sci. Res.* 2015; 4: 2319–7064.
22. Bouassa RSM, Nodjikuambaye ZA, Sadjoli D, Adawaye C, Péré H, Veyer D, et al. High prevalence of cervical high-risk human papillomavirus infection mostly covered by Gardasil-9 prophylactic vaccine in adult women living in N'Djamena, Chad. *PLOS ONE.* 3 juin 2019;14(6):e0217486.

Information about the authors:

Dorine Florence Luthera Ngombe Mouabata – 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>

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>

Patrina Joseph Iloukou Mayakia – 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>

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>

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

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

Moulay Mustapha Ennaji – Pr., Dr., Group Leader of the Virology Oncology Biotechnology Research Team, Head of the Laboratory of Virology, Oncology, Biosciences, Environment and New Energies, Faculty of Science and Technology, Mohammedia, Hassan II University of Casablanca, Casablanca, Morocco. E-mail: m.ennaji@yahoo.fr; <https://orcid.org/0000-0001-5809-0270>

Contribution: Ngombe Mouabata D.F.L. – designed and planned the study, collected the samples, analyzed and interpreted the data, wrote the manuscript; Iloukou Mayakia P.J. – analyzed and interpreted the data; Boumba A.L.M., Massengo N.R.B. – data acquisition, data analysis; Takale R.P. – study sample collection and socio-demographic; Moukassa D. – manuscript review; Ennaji M.M. – study design and planning, and interpretation, manuscript writing, overall project coordination. All authors have read and approved the final version of the manuscript to be submitted for publication.

Received 17 May 2024

Accepted 12 July 2024

Published 31 August 2024

Информация об авторах:

Dorine Florence Luthera Ngombe Mouabata – 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>

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>

Patrina Joseph Iloukou Mayakia – 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>

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

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

Donatien Moukassa – 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>

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>

Участие авторов: Ngombe Mouabata D.F.L. – дизайн и планирование исследования, сбор образцов, анализ и интерпретация данных, написание статьи; Iloukou Mayakia P.J. – анализ и интерпретация данных; Boumba A.L.M., Massengo N.R.B. – сбор данных, анализ данных; Takale R.P. – сбор образцов исследования и социально-демографические данные; Moukassa D. – обзор рукописи; Ennaji M.M. – дизайн и планирование исследования, интерпретация, написание статьи, общая координация проекта. Все авторы прочитали и одобрили окончательную версию рукописи для представления в печать.

Поступила 17.05.2024

Принята в печать 12.07.2024

Опубликована 31.08.2024

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-240>

© НОСИК Д.Н., СЕЛИМОВА Л.М., КАЛНИНА Л.Б., КАПЛИНА Э.Н., 2024



Влияние дезоксирибонуклеата натрия с железом комплекса на экспрессию поверхностных маркеров клеток МТ-4, инфицированных вирусом иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1) (Retroviridae: *Primate lentivirus group*)

Носик Д.Н.¹, Селимова Л.М.^{1✉}, Калнина Л.Б.¹, Каплина Э.Н.²

¹Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;
²ООО «ФармПак», 105318, г. Москва, Россия

Резюме

Введение. Сохранение иммунной дисфункции при терапии имеет серьезные последствия для здоровья ВИЧ-инфицированных пациентов. Поэтому важным направлением является поиск препаратов, способных снижать воспалительный потенциал иммунной системы и служащих дополнительным компонентом противовирусных лекарств.

Цель работы – изучить влияние иммуномодулирующего препарата дезоксирибонуклеата натрия с железом комплекс (ДНК-Na-Fe) на экспрессию маркеров активации в клетках линии МТ-4, зараженных ВИЧ-1.

Материалы и методы. В клетках определяли уровни экспрессии на плазматической мембране белков CD4, CD28, CD38, CD62L и HLA-DR. Для оценки вирусной активности определяли количество белка p24 методом иммуноферментного анализа.

Результаты и обсуждение. При изучении экспрессии поверхностных маркеров проанализировали 2 варианта клеточных линий с разной репликативной активностью. Тестировали контрольные клетки, клетки, культивируемые в присутствии ДНК-Na-Fe, зараженные клетки и зараженные клетки, культивируемые в присутствии ДНК-Na-Fe. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что противовирусная активность препарата при заражении МТ-4-клеток ВИЧ-1 связана с иммуномодулирующей активностью, изменяющей экспрессию мембранных белков CD4, CD28, CD38 и CD62L. Наблюдаемое разнообразие во влиянии ДНК-Na-Fe на экспрессию изученных поверхностных белков в двух линиях клеток, указывает на то, что оно зависит от особенностей совокупных молекулярно-биологических процессов, происходящих в клетках. А усиление эффектов, наблюдаемых в клетках с повышенной репликативной активностью, предполагает активное участие ДНК-Na-Fe в репликации вируса на стадиях проникновения и почкования.

Заключение. Исследования показали, что ДНК-Na-Fe обладает противовирусной и иммуномодулирующей активностью.

Ключевые слова: ВИЧ-1; ДНК-Na-Fe; МТ-4; CD4; CD28; CD38; CD62L; HLA-DR

Для цитирования: Носик Д.Н., Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Каплина Э.Н. Влияние дезоксирибонуклеата натрия с железом комплекса на экспрессию поверхностных маркеров клеток МТ-4, инфицированных вирусом иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) (Retroviridae: *Primate lentivirus group*). *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(4): 309–319. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-240> EDN: <https://elibrary.ru/uzlpzs>

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

Конфликт интересов. Дезоксирибонуклеат натрия с железом комплекс предоставлен ООО «ФармПак», Россия. В авторский коллектив входит аффилированный сотрудник компании разработчика – ООО «ФармМПарк», не являющийся CEO. ООО «ФармМПарк» не выступал в роли спонсора исследования.

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-240>

The effect of sodium deoxyribonucleate with iron complex on the expression of surface markers of MT-4 cells infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) (Retroviridae: *Primate lentivirus group*)

Dmitry N. Nosik¹, Lyudmila M. Selimova^{1✉}, Lyudmila B. Kalnina¹, Ellie N. Kaplina²

¹D.I. Ivanovsky Institute of Virology FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia; ²LLC «PharmPak», 105318, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The persistence of immune dysfunction during therapy has serious consequences for the health of HIV-infected people. Therefore, an important direction is the search for drugs that can reduce the inflammatory potential of the immune system and serve as an additional component of antiviral therapy.

Aim – to study the effect of the immunomodulatory drug Sodium deoxyribonucleate with iron complex (DNA-Na-Fe) on the expression of activation markers in MT-4 cells infected with HIV-1.

Materials and methods. Expression levels of CD4, CD28, CD38, CD62L and HLA-DR proteins on the plasma membrane were measured in cells. To assess viral activity, the p24 protein was quantified by ELISA.

Results and discussion. The two cell variants with different replicative activity were analyzed. Control cells, cells with DNA-Na-Fe, infected cells and infected cells with DNA-Na-Fe were tested. Based on the results obtained, it can be concluded that antiviral activity of the drug in MT-4 cells infected with HIV-1 is associated with immunomodulatory activity that enhances the expression of membrane proteins CD4, CD28, CD38 and CD62L. Diversity in the effect of DNA-Na-Fe on the studied surface proteins expression in two cell lines indicates that they depend on the characteristics of the combined molecular biological processes occurring in cells. And the increased effects observed in a system with changes in replicative activity assumes its active participation in virus replication at the stages of virus penetration and budding.

Conclusion. Studies have shown that DNA-Na-Fe has antiviral and immunomodulatory activity.

Keywords: HIV-1; DNA-Na-Fe; MT-4; CD4; CD28; CD38; CD62L; HLA-DR

For citation: Nosik D.N., Selimova L.M., Kalnina L.B., Kaplina E.N. The effect of sodium deoxyribonucleate with iron complex on the expression of surface markers of MT-4 cells infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) (Retroviridae: *Primate lentivirus group*). *Problems of Virology (Voprosy Virologii)*. 2024; 69(4): 309–319. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-240> EDN: <https://elibrary.ru/uzlpzs>

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

Conflict of interest. Sodium deoxyribonucleate with iron complex was provided by LLC «PharmPak», Russia. The authors' collective includes an affiliated employee of the developer company, PharmMPark LLC, who is not the CEO. PharmMPark LLC did not act as a sponsor of the study.

Введение

Течение инфекции, вызванной вирусом иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1), тесно связано с функционированием иммунной системы. ВИЧ-1 инфицирует клетки иммунной системы, содержащие основной маркер CD4. В результате действия хорошо скоординированных патогенетических механизмов, используемых вирусом, развитие инфекции приводит к нарушению функционирования всех звеньев иммунитета. Защитные реакции хозяина способствуют контролю и подавлению инфекции посредством активации нескольких путей трансдукции, которые служат для нейтрализации вирусных механизмов репликации в инфицированных клетках [1]. Всестороннее изучение взаимодействия ВИЧ и клетки-хозяина является ключом к разработке эффективных схем лечения инфекции. Представляется важным также дополнительное понимание иммуно-

го контроля ВИЧ-1 у людей, которые самостоятельно контролируют инфекцию [2]. Несмотря на прогресс в профилактике и лечении, главным препятствием в эффективности химиотерапии является возникновение долгоживущих латентных резервуаров вируса [3]. За более чем 40-летний период изучения ВИЧ-инфекции и создания большой группы эффективных противовирусных препаратов, внедрения комплексной антиретровирусной терапии (АРТ) были достигнуты существенные результаты, позволившие улучшить организацию мер по борьбе с распространением болезни и повысить качество жизни людей, живущих с ВИЧ (ЛЖВ). По данным Объединенной программы Организации Объединенных Наций по ВИЧ/СПИД (ЮНЭЙДС, UNAIDS), к 2023 г. число ЛЖВ оставало около 39 (33,1–45,7) млн человек. Пять стран: Ботсвана, Эсватини, Руанда, Танзания и Зимбабве – к 2022 г. уже достигли целей тестирования и лечения

по новой стратегии ЮНЭЙДС на 2021–2026 гг. Целью стратегии является достижение показателей «95–95–95» (95% ЛЖВ знают о своем ВИЧ-статусе, 95%, знающих свой статус, получают АРТ, 95%, получающих терапию, достигли неопределяемого уровня вирусной нагрузки). Несмотря на этот несомненный успех, существующие стратегии лечения имеют ограничения. Для многих больных пожизненное лечение является сложной задачей. Приверженность к АРТ остается проблемой, особенно среди тех пациентов, которые не могут полностью соблюдать режим лечения. Токсичность лекарств и сохранение иммунной дисфункции при АРТ имеют серьезные последствия для здоровья. Эти факторы подчеркивают важность поиска новых средств борьбы с вирусом. Поиск эффективных методов терапии в настоящее время является ключевым приоритетом для ВИЧ-сообществ. Особое место отводится проблеме изучения иммуномодулирующих препаратов, способных снизить воспалительный потенциал клеток иммунной системы [4]. Целенаправленное лечение воспаления является вероятной стратегией снижения риска заражения ВИЧ и замедления прогрессирования заболевания. Хроническое воспаление и нарушение функций CD4⁺-Т-лимфоцитов наблюдаются даже при эффективной АРТ. Приблизительно у 15–30% пациентов не происходит оптимального восстановления количества CD4⁺-Т-клеток [5]. Лекарственные препараты на основе природного сырья с уменьшенными побочными эффектами в сочетании с противовоспалительными свойствами являются перспективными вариантами. Противовирусным и иммуномодулирующим свойствами обладают препарат дезоксирибонуклеат натрия (ДНК-На) и его комплекс с железом (ДНК-На-Fe), созданные на основе двухнитевой ДНК природного происхождения [6, 7].

Цель исследования – изучение экспрессии CD4, CD28, CD38, CD62L и HLA-DR белков цитоплазматической мембраны CD4⁺-Т-лимфоцитов неопластической клеточной линии МТ-4 [8], инфицированной ВИЧ-1, в присутствии ДНК-На-Fe.

Материалы и методы

Клетки МТ-4 были получены из коллекции клеточных линий Института вирусологии им. Д.И. Иванова ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Клетки культивировали в среде RPMI 1640, содержащей 10% сыворотки эмбриона коровы, 2 мМ L-глутамина и 50 мкг/мл гентамицина, в атмосфере 5% CO₂ при температуре +37 °С. Пересевали через 3–4 сут, плотность при пересеве составляла 2,5–3,0 × 10⁵ кл/мл. Для заражения использовали штамм ВИЧ-1/899А, полученный из коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Иванова ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Вирус пассировали на клетках в культуральных флаконах объемом 50 мл в течение 5–7 сут до развития выраженного цитопатического эффекта, обнаруживаемого под световым микроскопом. Затем отбирали культуральную жидкость и определяли инфекционный титр, выражаемый

в Ig ТЦИД₅₀/мл (50% тканевая цитопатическая инфекционная доза). До использования аликвоты проб хранили при –80 °С. Клетки заражали вирусом при множественности инфекции около 100 ТЦИД₅₀/клетка. Для изучения влияния ДНК-На-Fe на экспрессию поверхностных белков в культуральную жидкость вносили ДНК-На-Fe до конечной концентрации 500 мг/мл (разработчик ООО «ФармПак», производство ООО «ФЗ Иммуноплекс». Коммерческий раствор содержит 15 мг натрия дезоксирибонуклеата и 0,048 мг железа окисного хлорида в 5 мл воды для инъекций). Через 48 и 72 ч после культивирования проб определяли жизнеспособность клеток в присутствии трипанового синего и отбирали аликвоты для определения количества белка р24 методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческой тест-системы (Genscreen ULTRA HIV Ag-AB, «БиоРэд», Франция). Уровень ингибирования вирусной активности в процентах определяли по формуле:

$$(\text{ЭП} - \text{КВ} / \text{КК} - \text{КВ}) \times 100\%,$$

где: ЭП – показания оптической плотности экспериментальных проб с препаратом; КВ – показания оптической плотности контроля вируса (без препарата); КК – показания контроля клеток.

Показания лунки, не содержащей клеток, автоматически вычитали при определении оптической плотности исследуемых проб. Опытные пробы имели по три параллели.

Для анализа наружных фенотипических маркеров клетки окрашивали моноклональными антителами фирмы Beckman Coulter (США): CD4 (PE или PC5), CD28 (PC5), CD38 (PC5), CD62L(PE), HLA-DR (PE), IgG1 (PE), IgG1 (PC-5), IgG2a (PE). Суспензию клеток предварительно отмывали 3 раза в 0,01М фосфатно-солевом буферном растворе (рН 7,2) путем центрифугирования при 800 об/мин в течение 6 мин. Затем суспендировали в том же растворе при концентрации 2 × 10⁶ кл/мл. Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре EPICS XL (Beckman Coulter, США). Полученные гистограммы были обработаны с использованием программы Kaluza (Beckman Coulter, Software Version 1.2, США).

Статистический анализ данных осуществляли с использованием программы BioStat v.5 (AnalystSoft, США) и Kaluza. Уровень значимости (α) был равен 0,05, колебания коэффициентов вариации во всех изученных образцах при сравнительном анализе результатов цитометрии были в пределах нормы (> 10%).

Результаты

Большинство белков плазматической мембраны иммунных клеток являются многофункциональными, и их активность может определяться многими факторами. Клетки МТ-4 – это неопластические CD4⁺-Т-лимфоциты, трансформированные Т-лимфотропным вирусом человека 1-го типа (Retroviridae: *Orthoretrovirinae*: *Deltaretrovirus*: *Human T-lymphotropic virus type 1*, ТЛВЧ-1). И эта их особенность, а также ВИЧ-1 могут быть причиной колебаний в экспрессии различных регуляторных белков клетки в целом и мембранных белков в частности. Следует отметить,

что при анализе контрольных клеток в наших исследованиях неизменными были такие показатели экспрессии мембранных белков, как количество CD4⁺, CD25⁺, CD95⁺ и HLA-DR⁺. Практически около 100% клеток содержали эти маркеры [9]. В количестве остальных маркеров наблюдались существенные колебания. Вируспродуцирующая активность клеток в процессе длительного культивирования также может меняться. Поэтому в работе использовали два варианта клеток, которые были заморожены в разные периоды культивирования, одновременно подняты из азота и обозначены как Л1 и Л2. Свойства клеток линии Л1, модифицированных по двум аллелям гена *ccr5*, были описаны ранее [10]. Заражение клеток и окрашивание моноклональными антителами проводили в одинаковых условиях в одном и том же эксперименте. Жизнеспособность клеток через 48 и 72 ч после анализа всех опытных проб составляла 95% и более. Во всех опытах уровень вирусной активности без добавления препарата через 48 ч после заражения был

практически одинаковым, через 72 ч в Л1 активность вируса была в среднем приблизительно в 1,2 раза выше. Как правило, максимальная вирусная активность в используемой нами модели «вирус–клетка» наблюдается на 5–6-е сутки после заражения. Изучение противовирусной активности ДНК-Na-Fe показало, что в клетках линии Л1 уровень ингибирования вирусной активности составлял 32 ± 1,7 и 49,6 ± 1,3%, в Л2 – 13,8 ± 2 и 26,7 ± 1,4% через 48 и 72 ч после заражения соответственно.

На рис. 1 представлены результаты определения количества клеток, содержащих следующие поверхностные маркеры – CD4⁺, CD28⁺, CD38⁺, CD62L⁺ и HLA-DR⁺. Были проанализированы незараженные клетки (К); незараженные клетки, культивируемые в присутствии ДНК-Na-Fe (Ф); зараженные клетки (В); зараженные клетки, культивируемые в присутствии ДНК-Na-Fe (Ф + В). Из рисунка видно, что через 48 ч после заражения количество CD4⁺-клеток во всех пробах двух линий было практически одина-

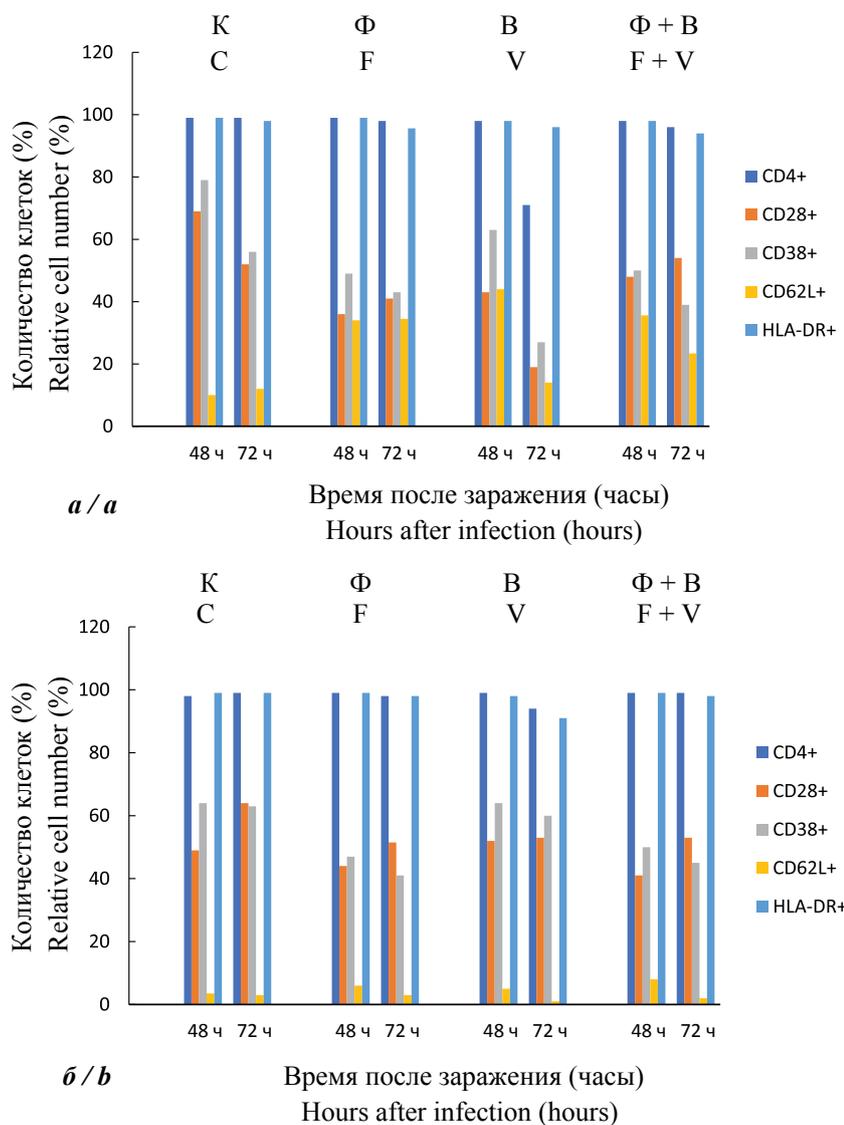


Рис. 1. Результаты определения количества клеток, содержащих поверхностные маркеры клеточной линии MT-4, с использованием метода проточной цитометрии.

а – Л1, б – Л2. К – контрольные клетки; Ф – клетки, культивируемые с ДНК-Na-Fe; В – зараженные клетки; Ф + В – зараженные клетки, культивируемые с ДНК-Na-Fe.

Fig. 1. The results of determining the number of cells containing surface markers of MT-4 cells using the flow cytometry method.

а – L1, б – L2. К – control cells; Ф – cells cultured with DNA-Na-Fe; В – infected cells; Ф + В – infected cells cultured with DNA-Na-Fe.

ково и составляет от 94 до 99%. Присутствие ДНК-Na-Fe в пробах Ф и Ф + В не меняло значения показателя. По интенсивности флуоресценции (ИФ; показатель плотности экспрессии маркера или средней интенсивности флуоресценции) существенных изменений также не наблюдалось. Через 72 ч после заражения количественный показатель также практически не менялся для всех проб, за исключением В. Этот показатель существенно снижается для Л1 (приблизительно на 27%) и незначительно (~ 5%) для Л2. В присутствии ДНК-Na-Fe он увеличивался и практически соответствовал пробам К и Ф. Результаты для проб Л1 представлены в виде однопараметрических гистограмм на **рис. 2 (а)**. Видно, что часть клеток в пробе В теряет этот маркер, а добавление ДНК-Na-Fe устраняет эффект. Из гистограмм также видно, что препарат снижал ИФ незараженных клеток, а повышение количества зараженных клеток, несущих CD4⁺, пробы Ф + В сопровождалось повышением ИФ и соответствовало пробе Ф. По ИФ CD4⁺-клеток проб Л2 наблюдалась сходная динамика.

Как видно из рис. 1, имеются различия в количестве CD28⁺-клеток через 48 и 72 ч после культивирования. Для линии клеток Л1 было зарегистрировано его существенное снижение относительно К во всех пробах через 48 ч. Через 72 ч этот показатель относительно контроля снижался в пробе Ф и наибольшее снижение (~ 64%) отмечалось в пробе В. Для пробы Ф + В он повышался до уровня К. Для клеток линии Л2 через 48 ч были зафиксированы незначительные колебания количества CD28⁺-клеток относительно контроля, через 72 ч во всех опытных пробах этот

показатель снижался приблизительно на 10,0 ± 2,6%. Заметные изменения в ИФ наблюдались только в Л1 через 48 ч (рис. 2 б). Видно, что во всех экспериментальных пробах ИФ ниже контроля и практически идентична для всех опытных проб. Таким образом, по уровню экспрессии CD28 можно заключить, что ДНК-Na-Fe снижает количество клеток, содержащих этот маркер. Также заражение клеток приводит к снижению экспрессии этого белка, но явный эффект проявлялся через 72 ч после заражения. Существенных закономерностей по уровню экспрессии белка CD28 в зараженных клетках в присутствии ДНК-Na-Fe выявить не удалось. Но этот показатель был ниже или сравним с пробами К.

В большинстве опытных проб наблюдалось снижение количества белка CD38⁺ для обеих линий (рис. 1). Наибольшее – для Л1 в зараженных клетках через 72 ч (~ 52%). В остальных случаях снижение экспрессии этого белка в зараженных клетках было следующим: около 20% в Л1 через 48 ч после заражения и около 6% через 72 ч в Л2, либо не изменялось (через 48 ч в Л2). В обеих линиях добавление ДНК-Na-Fe снижало уровень экспрессии этого белка в пределах около 27–40% в течение всего периода культивирования клеток. И этот показатель существенно не менялся при сравнении с пробами, в которых заражение клеток проводили с препаратом, разница составляла ± 5%. При этом экспрессия белка CD38 в зараженных клетках при добавлении ДНК-Na-Fe во всех пробах была существенно ниже К (приблизительно на 22–37%). Стабильное снижение ИФ во всех пробах наблюдалось только в Л1, и в большей степени было вы-

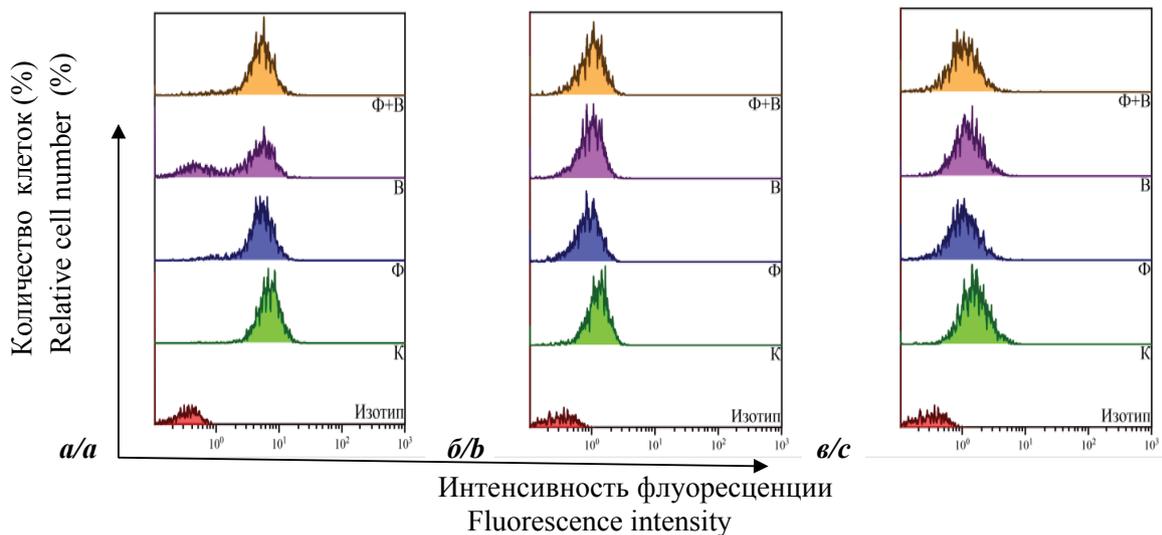


Рис. 2. Однопараметрические гистограммы распределения клеток, содержащих поверхностные маркеры CD4, CD28, CD38.

CD4⁺ – через 72 ч после заражения Л1 (а); CD28⁺ – через 48 ч после заражения Л1 (б); CD38⁺ – через 48 ч после заражения Л1 (в). К – контрольные клетки; Ф – клетки, культивируемые с ДНК-Na-Fe; В – зараженные клетки; Ф + В – зараженные клетки, культивируемые с ДНК-Na-Fe.

Fig. 2. Single-parameter histograms of the distribution of cells containing surface markers CD4, CD28, CD38.

CD4⁺ – 72 hours after infection L1 (a); CD28⁺ – 48 hours after infection L1 (b); CD38⁺ – 48 hours after infection L1 (c). К – control cells; F – cells cultured with DNA-Na-Fe; B – infected cells; F + B – infected cells cultured with DNA-Na-Fe.

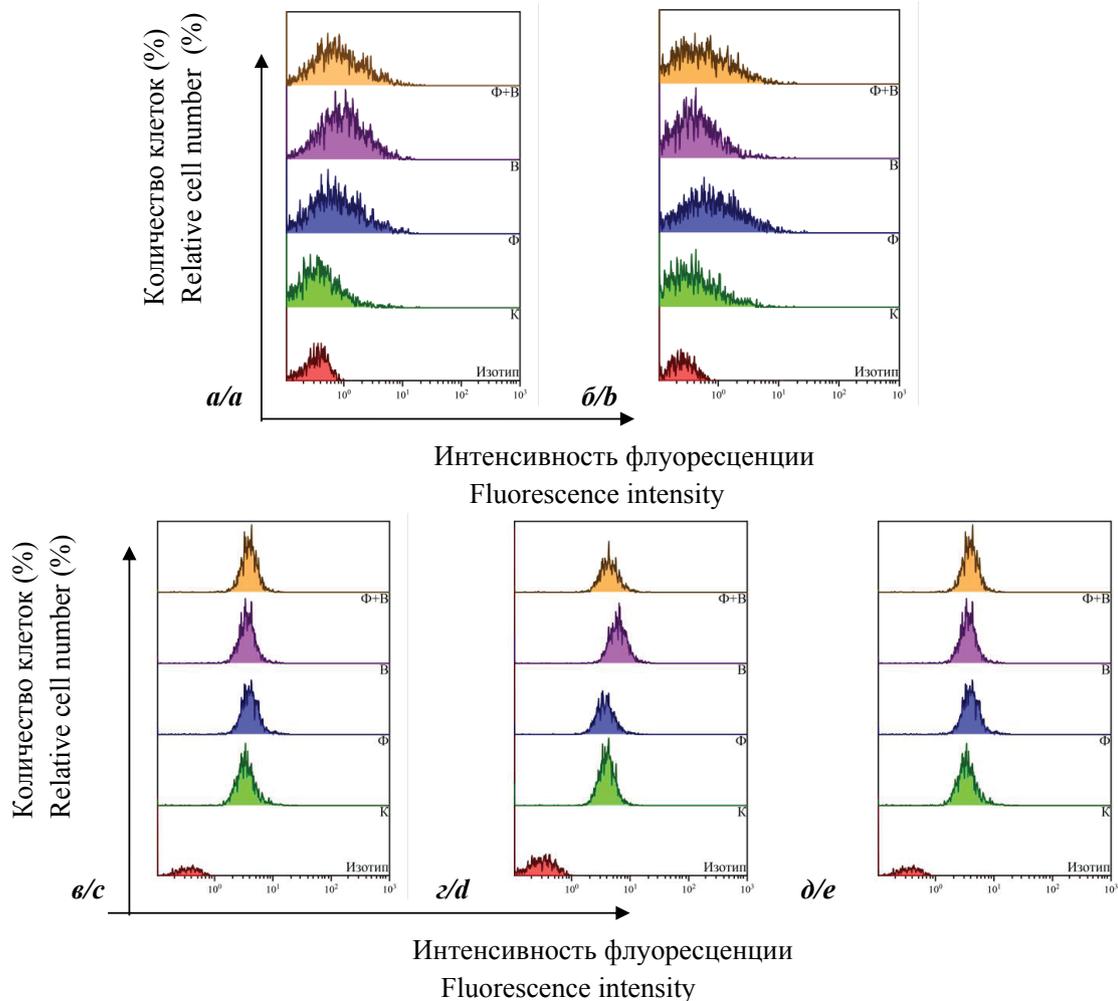


Рис. 3. Однопараметрические гистограммы распределения клеток, содержащих поверхностные маркеры CD62L и HLA-DR. CD62L⁺ – Л1 через 48 ч после заражения (а) и 72 ч после заражения (б); HLA-DR⁺ – через 48 ч после заражения Л1 (с) и Л2 (д), Л2 через 72 ч после заражения (е). К – контрольные клетки; Ф – клетки, культивируемые с ДНК-Na-Fe; В – зараженные клетки; Ф + В – зараженные клетки, культивируемые с ДНК-Na-Fe.

Fig. 3. Single-parameter histograms of the distribution of cells containing surface markers CD62L and HLA-DR. CD62L⁺ – L1 48 hours after infection (a) and 72 hours after infection (b); HLA-DR⁺ – 48 hours after infection L1 (c) and L2 (d), L2 72 hours after infection (e). K – control cells; F – cells cultured with DNA-Na-Fe; B – infected cells; F + B – infected cells cultured with DNA-Na-Fe.

ражено через 48 ч (рис. 2 в). В Л2 в пробах Ф + В этот показатель был практически равен К, а в пробах, где присутствовал препарат, было зарегистрировано его незначительное снижение – приблизительно на 7–9%. Как видно, этот показатель был ниже во всех пробах относительно пробы К. Таким образом, можно заключить, что ДНК-Na-Fe снижал экспрессию белка CD38 в незараженных и зараженных клетках.

Изучение экспрессии белка CD62L показало, что в Л1 во всех пробах наблюдалось увеличение клеток, несущих этот маркер, по сравнению с контролем через 48 и 72 ч после заражения (рис. 1 а). В незараженных клетках ДНК-Na-Fe увеличивал этот показатель приблизительно в 3 раза по сравнению с К. Существенное увеличение отмечалось для пробы В через 48 ч (~ 4 раза) и незначительное (~ 1,2 раза) через 72 ч. В пробе Ф + В через 48 ч он был срав-

ним с показаниями пробы Ф, через 72 ч, был ниже показаний Ф и выше В. Во всех пробах Л1 наблюдалось также увеличение ИФ (рис. 3 а и б). Исключение составляла проба В через 72 ч после заражения (рис. 3 б). Результаты, полученные для Л2, сложно интерпретировать, т.к. количество CD62L⁺-клеток было незначительным. Можно только отметить, что в целом кинетика была сходна с Л1.

Количество клеток HLA-DR⁺ для обеих линий через 48 и 72 ч составляло для всех проб около 99±5%. В отношении ИФ необходимо отметить следующие существенные изменения. Для Л1 этот показатель увеличивался через 48 ч во всех опытных образцах относительно контроля (рис. 3 в), но в пробах с ДНК-Na-Fe (Ф и Ф + В) в большей степени, чем в пробе В. Через 72 ч ИФ незначительно повышался в пробе Ф и Ф + В и снижался в пробе В. Анализ проб Л2 по-

казал следующие значения относительно контроля. Через 48 ч ДНК-Na-Fe снижал ИФ. Наличие вируса существенно повышало этот показатель. В пробе Ф + В этот показатель снижался, но был выше, чем для проб К и Ф (рис. 3 *г*). Через 72 ч ИФ был ниже, чем в контроле, во всех опытных образцах. При этом снижение было наиболее выражено в пробе В, в меньшей степени в пробе Ф + В. ДНК-Na-Fe снижал этот показатель в пробе Ф незначительно (рис. 3 *д*).

Обсуждение

Особенности репликации ВИЧ-1 в настоящее время изучены очень хорошо [11]. Мембранный белок CD4-Т-лимфоцитов – это основной рецептор, используемый вирусом на ранних этапах инфицирования. Известно, что в процессе репликации вируса количество CD4⁺ в инфицированных клетках снижается. Это механизм, используемый вирусом для облегчения процесса почкования зрелых вирусных частиц с участием вирусных белков *nef* и *vpr*. При анализе экспрессии этого белка двумя клеточными линиями ярко выраженный эффект снижения количества CD4⁺ наблюдался только в клетках линии Л1 через 72 ч после заражения, вероятно, в начале развития активной фазы почкования вирусного потомства (рис. 1 *а*, рис. 2 *а*). Но в обеих линиях было зарегистрировано снижение ИФ. Это указывает на то, что и в Л2 вирусоспецифический эффект снижения уровня CD4 также присутствовал, но был выражен слабее. Скорее всего, это связано с тем, что вирусная активность в Л1, как показали исследования, выше, чем в Л2. Возможно, что на более поздних сроках инфекции этот эффект был бы выражен более значимо. Заражение клеток в присутствии ДНК-Na-Fe привело к восстановлению количества CD4⁺-клеток до уровня контроля и к повышению ИФ (рис. 1 *а*, рис. 2 *а*), что способствовало снижению урожая вируса. Вируспродуцирующая активность клеток в присутствии ДНК-Na-Fe снижалась в обеих линиях. Противовирусный эффект в системе с более активной репликацией вируса был выше. Это предполагает, что его использование может быть более эффективным на стадиях ВИЧ-инфекции с высокой вирусной нагрузкой – на стадии острой инфекции и поздней стадии СПИДа. Таким образом, можно предположить, что усиление экспрессии CD4 зараженными клетками в присутствии ДНК-Na-Fe связано со способностью препарата влиять на механизмы, изменяющие метаболизм этого белка, и/или снижать активность вирусных белков *nef* и *vpr*. Следует отметить, что в незараженных клетках препарат снижал ИФ относительно контроля (рис. 2 *а*). Этот факт также свидетельствует о влиянии ДНК-Na-Fe на метаболизм белка CD4, что таким образом может приводить к снижению чувствительности клеток к инфекции. Нельзя исключить, что ДНК-Na-Fe обладает способностью активировать противовирусные клеточные факторы.

CD4-Т-клеткам принадлежит важная роль в развитии и координации адаптивного иммунитета. Для организации эффективного иммунного ответа необ-

ходима их активация. Существенным компонентом при активации Т-клеток служит костимуляторный мембранный белок CD28, который исключает развитие aberrантного иммунного ответа. CD28 регулирует широкий спектр клеточных процессов: от пролиферации и выживания до содействия дифференцировке специализированных субпопуляций Т-клеток. С момента своего первого обнаружения более 20 лет назад CD28 оставался предметом интенсивных исследований благодаря важности для нормального функционирования Т-клеток и его потенциала как терапевтической мишени [12, 13]. Показано, что, как и в случае с рецептором вируса CD4, при заражении вирусом количество его на клеточной мембране снижается при участии тех же вирусных белков – *nef* и *vpr* [14]. Наши исследования показали, что вирус существенно снижал экспрессию этого белка в клетках линии Л1 через 48 и 72 ч после заражения, а добавление ДНК-Na-Fe через 72 ч после заражения устраняло этот эффект (рис. 1 *б*). В Л2 была отмечена в целом сходная динамика. Но эффекты, наблюдаемые для Л2, были выражены слабее. Это, видимо, также связано с пониженной вирусной активностью в клетках. В целом можно сделать вывод о том, что противовирусная активность ДНК-Na-Fe связана с изменением метаболизма CD28, как и в случае с CD4. Через 72 ч после заражения его количество в Л1 в пробе Ф + В восстанавливалось до уровня контроля. Эта его особенность в системе *in vivo* может способствовать повышению иммунокомпетентности инфицированных Т-клеток. ДНК-Na-Fe также снижал количество клеток CD28⁺ в контрольных пробах в обеих линиях, что свидетельствует о его иммуномодулирующих свойствах, выражающихся в снижении активации иммунной системы. Что, в свою очередь, может снижать чувствительность к различным инфекциям. Что же касается возможного влияния ДНК-Na-Fe на снижение костимуляторной способности нормальных клеток, то это требует дополнительных исследований. Повышенный уровень белка CD28 является неблагоприятным прогностическим фактором при различных лимфомах [15]. В норме в организме сохраняется баланс между стимулирующими и ингибирующими сигналами, которые определяют конечную природу Т-клеточных ответов и могут быть обусловлены множеством факторов, включая сложные взаимодействия рецептора и лиганда между членами семейства CD28 в зависимости от типа клеток. Несмотря на центральную роль CD28, членов его семейства и лигандов для иммунной функции, многие аспекты биологии CD28 остаются неясными. Внедрение базового понимания функции CD28 в иммуномодулирующей терапии было противоречивым, с успехами и неудачами. Нельзя исключить, что ДНК-Na-Fe может помогать в регуляции костимулирующих сигналов и служить дополнительным регулятором сохранения необходимого баланса. Разное влияние ДНК-Na-Fe на экспрессию белка CD28 в клетках Л1 и несущественный эффект в клетках Л2 указывает на сложный механизм регуляции экспрессии генома в клетках МТ-4 в норме и при

ВИЧ-инфекции. Своевременное включение и выключение конкретных генов в определенных клетках вызывает их физиологические изменения. В целом можно заключить, что через 72 ч после заражения количество клеток, экспрессирующих белок CD28⁺, существенно уменьшается, а присутствие ДНК-Na-Fe в зараженных клетках устраняет вирусный эффект и восстанавливает этот показатель до нормы. Таким образом, следует отметить, что препарат снижал уровень активации неинфицированных клеток, но увеличивал количество белка CD28⁺ в зараженных клетках. При этом ИФ снижалась по сравнению с контрольной линией и восстанавливалась через 72 ч культивирования зараженных клеток в присутствии препарата. Поскольку CD28 выполняет важную костимуляторную роль при передаче иммунных сигналов Т-клеточным рецептором, можно сделать вывод о том, что при ВИЧ-инфекции ДНК-Na-Fe может восстанавливать иммунный потенциал зараженных клеток, который снижается при ВИЧ-инфекции.

Одним из важных показателей активации иммунной системы при ВИЧ-инфекции служит мембранный белок CD38. Это многофункциональный трансмембранный белок, и уровень экспрессии его на поверхности иммунных клеток зависит от их активации. Он играет ключевую роль в передаче сигналов регуляции уровня внутриклеточного кальция и модуляции процессов выживания и метаболизма [16, 17]. Данные, накопленные за почти четыре десятилетия, прошедших с момента его открытия, указывают на то, что CD38 играет важную роль в функционировании различных иммунных клеток как в норме, так и при разных патологиях. Поэтому он служит прогностическим маркером и перспективной терапевтической мишенью. Показано взаимодействие CD38 на клеточной мембране с белками CD4 и gp120 ВИЧ-1. Это, в свою очередь, может влиять на взаимодействие вируса с клеткой. В целом при анализе данных о роли CD38 в иммунном ответе при ВИЧ-инфекции наблюдаются существенные расхождения. А использование его антагонистов в терапевтических целях реальных обнадеживающих результатов не дало. Таким образом, несмотря на наличие большого объема данных о разнообразных функциях CD38 в иммунном ответе, необходимы новые и более сложные подходы для определения последствий воздействия на специфическую активность, опосредованную CD38, во время ответа хозяина на инфекцию.

Полученные нами данные с использованием двух вариантов линий показали, что в пробах обеих линий в присутствии ДНК-Na-Fe в неинфицированных и инфицированных клетках происходит существенное снижение экспрессии белка CD38 по сравнению с контролем (рис. 1). В инфицированных клетках Л1 снижение было наименьшим через 48 ч (~20%) и наибольшим через 72 ч (~50%), в Л2 не изменялось или составляло около 20% соответственно. На основании этих данных можно предположить, что через 72 ч начинается активизация процесса почкования вирусного потомства. И на этом этапе проявляются механиз-

мы снижения его экспрессии вирусными факторами, как и в случае с другими клеточными мембранными белками, способными взаимодействовать с gp120 и препятствующими почкованию. В клетках линии Л2 этот эффект выражен слабее, так же, видимо, вследствие сниженной вирусной активности. Как показали результаты по снижению репликации вируса в пробах Ф + В, ДНК-Na-Fe, снижая активацию клеток, вероятно, способствовал и снижению репликации вируса.

Наружный белок клеточной мембраны CD62L – это молекула клеточной адгезии, обеспечивающая процесс циркуляции лейкоцитов. Белок играет существенную роль в транспорте активированных лимфоцитов в лимфоидные органы и инициации и поддержании иммунного ответа против патогенов при развитии инфекции. Известно, что белок CD62L облегчает проникновение вируса в клетки, помогая адгезии белка вируса gp120 с рецептором CD4 и корецептором. Однако в процессе почкования для успешного высвобождения частиц в окружающую среду количество CD62L должно быть снижено, т.к. он удерживает вирусные частицы на клеточной мембране. Поэтому при заражении лимфоцитов ВИЧ-1 происходит снижение его экспрессии при участии вирусных белков nef и vif. Эти белки связываются с CD62L в клетке и препятствуют его транспорту к мембране. Вирус использует этот белок на ранних стадиях инфекции для прикрепления к клеткам, а на поздних индуцирует сегрегацию наружного домена или эндоцитоз для облегчения процесса почкования вирусного потомства [18, 19]. Снижение экспрессии этого белка на мембране клеток приводит к снижению циркуляции и активации инфицированных клеток и способствует усилению инфекционного процесса и ухудшению развития адаптивного иммунного ответа.

Изучение экспрессии белка CD62L в линиях Л1 и Л2 показало, что в целом динамика показаний в опытных образцах была сходной, но в Л2 она была существенно ниже, чем в Л1. Это, видимо, как и для описанных выше маркеров, связано с особенностями клеток и их вируспродуцирующей активностью. Поэтому следует остановиться на результатах, полученных для Л1. Во всех пробах наблюдалось увеличение экспрессии CD62L по сравнению с контролем как в количестве, так и по ИФ (рис. 1 а; рис. 3 а, б). Следует отметить, что в зараженных клетках эти показатели через 72 ч были практически равны контролю (рис. 1 а) или ниже (рис. 3 б). Последний результат указывает на то, что вирус способен снижать экспрессию CD62L.

На основании этих данных можно заключить, что эффект ДНК-Na-Fe может быть двояким. С одной стороны, препарат может усиливать заражение клеток вирусом. С другой стороны, увеличение экспрессии белка CD62L в присутствии препарата указывает на то, что ДНК-Na-Fe способен снижать репликацию ВИЧ-1 в системе *in vitro*. Поэтому наблюдаемый эффект снижения репликации ВИЧ в присутствии ДНК-Na-Fe можно объяснить увеличением экспрессии белка CD62L. Первый негативный эффект может быть нивелирован *in vivo* известными в настоящее время

клеточными механизмами, контролирующими инфекцию и репликацию ВИЧ-1 [1]. А разница во влиянии препарата на экспрессию белка CD62L в МТ-4-клетках, наблюдаемая в разных линиях, указывает на то, что CD62L не обладает высокой специфической активностью и его действие, видимо, зависит от особенностей совокупных молекулярно-биологических процессов, происходящих в клетках.

Маркер иммунных клеток HLA-DR (антиген гистосовместимости II класса) – это основной маркер активации лимфоцитов и моноцитов, который был обнаружен в клетках CD4 у пациентов с Т-клеточным лейкозом, ассоциированным с инфекцией ТЛВЧ-1 [20]. Он регулирует содержание кальция в цитоплазме клеток, проницаемость клеточных мембран, активирует фосфорилирование внутриклеточных белков. Белок HLA-DR тесно связан с иммунным ответом, регулирующей ответом клеток на внешние стимулы и имеет большое значение в развитии аутоиммунных заболеваний, опухолевого иммунитета, при трансплантации органов. При ВИЧ-инфекции особую роль уделяют изучению HLA-DR⁺-Т-лимфоцитов, т.к. они обладают повышенной пролиферативной активностью [21]. Особое значение имеет пул инфицированных клеток памяти, содержащих активный провирус, который сохраняется при активной АРТ и является источником рецидивов [22].

Как показали наши исследования, во всех изученных пробах двух линий практически более 90% клеток были HLA-DR⁺ (рис. 1 а, б). И этот показатель не менялся относительно контроля. И, если в количественном отношении разницы не наблюдалось, то показатель ИФ по времени культивирования изменялся (рис. 3 в–д). Однако полученные результаты противоречивы и не позволяют сделать какие-либо существенные выводы. Можно отметить только то, что и ДНК-Na-Fe, и вирус могут изменять уровень экспрессии белка как по отдельности, так и в комплексе. Ранее нами было показано, что длительное культивирование МТ-4 клеток с ДНК-Na-Fe приводило к снижению количества клеток HLA-DR⁺ [7].

В целом наблюдаемые различия во влиянии ДНК-Na-Fe на клетки и репликацию вируса в присутствии препарата на экспрессию всех изученных поверхностных белков в разных линиях клеток указывает на то, что они зависят от особенностей совокупных молекулярно-биологических процессов, происходящих в клетках. Различия во влиянии ДНК-Na-Fe на репликацию ВИЧ, наблюдаемые в системах с разной репликативной активностью, указывают на его более активное участие в метаболизме клеток и изменении процессов репликации вируса на стадиях проникновения и почкования дочерних вирионов в более активных системах и/или только при определенных соотношениях всех участников метаболического процесса.

Заключение

Исследования показали, что ДНК-Na-Fe обладает противовирусной и иммуномодулирующей активно-

стью. На основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что противовирусная активность препарата при заражении МТ-4-клеток ВИЧ-1 связана с иммуномодулирующей активностью, изменяющей экспрессию мембранных белков CD4, CD28, CD38 и CD62L. Механизмом снижения репликации ВИЧ-1 в присутствии ДНК-Na-Fe можно объяснить его участие в регулировании уровня рецептора CD4 в зараженных клетках, а также белков, являющихся маркерами активации клеток.

ЛИТЕРАТУРА

- Masenga S.K., Mweene B.C., Luwaya E., Muchaili L., Chona M., Kirabo A. HIV-host cell interactions. *Cells*. 2023; 12(10): 1351. <https://doi.org/10.3390/cells12101351>
- Hokello J., Tyagi P., Dimri S., Sharma A.L., Tyagi M. Comparison of the biological basis for non-HIV transmission to HIV-exposed seronegative individuals, disease non-progression in HIV long-term non-progressors and elite controllers. *Viruses*. 2023; 15(6): 1362. <https://doi.org/10.3390/v15061362>
- Ventura J.D. Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1): Viral latency, the reservoir, and the cure. *Yale J. Biol. Med.* 2020; 93(4): 549–60.
- Lv T., Cao W., Li T. HIV-related immune activation and inflammation: current understanding and strategies. *J. Immunol. Res.* 2021; 2021: 7316456. <https://doi.org/10.1155/2021/7316456>
- Yang X., Su B., Zhang X., Liu Y., Wu H., Zhang T. Incomplete immune reconstitution in HIV/AIDS patients on antiretroviral therapy: Challenges of immunological non-responders. *J. Leukoc. Biol.* 2020; 107(4): 597–612. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MR1019-189R>
- Беседнова Н.Н., Макаренкова И.Д., Федянина Л.Н., Авдеева Ж.И., Крыжановский С.П., Кузнецова Т.А. и др. Дезоксирибонуклеиновая кислота про- и эукариот в профилактике и терапии инфекционных болезней. *Антибиотики и химиотерапия*. 2018; 63(5-6): 52–67. <https://elibrary.ru/xvvinv>
- Носик Д.Н., Калнина Л.Б., Лобач О.А., Чагаева М.С., Бережная Е.В., Бочкова М.С. и др. Противовирусная и вирулицидная активность дезоксирибонуклеата натрия и его комплекса с железом в отношении вирусов разных царств и семейств. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(6): 506–15. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-148> <https://elibrary.ru/trtrade>
- Miyoshi I., Kubonishi I., Yoshimoto S., Akagi T., Ohtsuki Y., Shiraishi Y., et al. Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature*. 1981; 294(5843): 770–1. <https://doi.org/10.1038/294770a0>
- Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Носик Д.Н. Поверхностные маркеры неопластической клеточной линии МТ-4 и перспективы её использования в качестве модели для изучения активности иммуномодулирующих препаратов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(12): 822–5. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-12-822-825> <https://elibrary.ru/xscfqz>
- Носик Д.Н., Калнина Л.Б., Селимова Л.М., Пронин А.В. Увеличение инфекционности вируса иммунодефицита человека при модификации гена *src5* чувствительных клеток. *Доклады Российской Академии наук. Науки о жизни*. 2023; 511(1): 344–8. <https://doi.org/10.31857/S2686738923700257> <https://elibrary.ru/jiltbd>
- Levesque K., Finzi A., Binette J., Cohen E.A. Role of CD4 receptor down-regulation during HIV-1 infection. *Curr. HIV Res.* 2004; 2(1): 51–9. <https://doi.org/10.2174/1570162043485086>
- Boomer J.S., Green J.M. An enigmatic tail of CD28 signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010; 2(8): a002436. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002436>
- Nandi D., Pathak S., Verma T., Singh M., Chattopadhyay A., Thakur S., et al. T cell costimulation, checkpoint inhibitors and anti-tumor therapy. *J. Biosci.* 2020; 45: 50.
- Leonard J.A., Filzen T., Carter C.C., Schaefer M., Collins K.L. HIV-1 Nef disrupts intracellular trafficking of major histocompatibility complex class I, CD4, CD8, and CD28 by distinct pathways that

- share common elements. *J. Virol.* 2011; 85(14): 6867–81. <https://doi.org/10.1128/JVI.00229-11>
15. Rohr J., Guo S., Huo J., Bouska A., Lachel C., Li Y., et al. Recurrent activating mutations of CD28 in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia.* 2016; 30(5): 1062–70. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.357>
 16. Glaría E., Valledor A.F. Roles of CD38 in the Immune Response to Infection. *Cells.* 2020; 9(1): 228. <https://doi.org/10.3390/cells9010228>
 17. Savarino A., Bottarel F., Malavasi F., Dianzani U. Role of CD38 in HIV-1 infection: an epiphenomenon of T-cell activation or an active player in virus/host interactions? *AIDS.* 2000; 14(9): 1079–89. <https://doi.org/10.1097/00002030-200006160-00004>
 18. Vassena L., Giuliani E., Koppensteiner H., Bolduan S., Schindler M., Doria M. HIV-1 Nef and Vpu interfere with L-selectin (CD62L) cell surface expression to inhibit adhesion and signaling in infected CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.* 2015; 89(10): 5687–700. <https://doi.org/10.1128/JVI.00611-15>
 19. Segura J., He B., Ireland J., Zou Z., Shen T., Roth G., et al. The role of L-selectin in HIV infection. *Front. Microbiol.* 2021; 12: 725741. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.725741>
 20. Freedman A.S., Nadler L.M. Immunologic markers in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 1991; 5(5): 871–89.
 21. Mahalingam M., Pozniak A., McManus T.J., Vergani D., Peakman M. Cell cycling in HIV infection: analysis of in vivo activated lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 1995; 102(3): 481–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1995.tb03841.x>
 22. Horsburgh B.A., Lee E., Hiener B., Eden J.S., Schlub T.E., von Stockenström S., et al. High levels of genetically intact HIV in HLA-DR+ memory T cells indicates their value for reservoir studies. *AIDS.* 2020; 34(5): 659–68. <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000002465>
 - 67(6): 506–15. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-148> <https://elibrary.ru/rtrade> (in Russian)
 8. Miyoshi I., Kubonishi I., Yoshimoto S., Akagi T., Ohtsuki Y., Shiraishi Y., et al. Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature.* 1981; 294(5843): 770–1. <https://doi.org/10.1038/294770a0>
 9. Selimova L.M., Kalnina L.B., Nosik D.N. The superficial markers of neoplastic cell line mt-4 and perspectives of its application as a model for studying activity of immune modulating preparations. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2016; 61(12): 822–5. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-12-822-825> <https://elibrary.ru/xscfqz> (in Russian)
 10. Nosik D.N., Kalnina L.B., Selimova L.M., Pronin A.V. An increase in the infectivity of the human immunodeficiency virus with modification of the ccr5 gene receptor of sensitive cells. *Doklady Rossiiskoi Akademii nauk. Nauki o zhizni.* 2023; 511(1): 344–8. <https://doi.org/10.31857/S2686738923700257> <https://elibrary.ru/jiltbd> (in Russian)
 11. Levesque K., Finzi A., Binette J., Cohen E.A. Role of CD4 receptor down-regulation during HIV-1 infection. *Curr. HIV Res.* 2004; 2(1): 51–9. <https://doi.org/10.2174/1570162043485086>
 12. Boomer J.S., Green J.M. An enigmatic tail of CD28 signaling. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2010; 2(8): a002436. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a002436>
 13. Nandi D., Pathak S., Verma T., Singh M., Chattopadhyay A., Thakur S., et al. T cell costimulation, checkpoint inhibitors and anti-tumor therapy. *J. Biosci.* 2020; 45: 50.
 14. Leonard J.A., Filzen T., Carter C.C., Schaefer M., Collins K.L. HIV-1 Nef disrupts intracellular trafficking of major histocompatibility complex class I, CD4, CD8, and CD28 by distinct pathways that share common elements. *J. Virol.* 2011; 85(14): 6867–81. <https://doi.org/10.1128/JVI.00229-11>
 15. Rohr J., Guo S., Huo J., Bouska A., Lachel C., Li Y., et al. Recurrent activating mutations of CD28 in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia.* 2016; 30(5): 1062–70. <https://doi.org/10.1038/leu.2015.357>
 16. Glaría E., Valledor A.F. Roles of CD38 in the Immune Response to Infection. *Cells.* 2020; 9(1): 228. <https://doi.org/10.3390/cells9010228>
 17. Savarino A., Bottarel F., Malavasi F., Dianzani U. Role of CD38 in HIV-1 infection: an epiphenomenon of T-cell activation or an active player in virus/host interactions? *AIDS.* 2000; 14(9): 1079–89. <https://doi.org/10.1097/00002030-200006160-00004>
 18. Vassena L., Giuliani E., Koppensteiner H., Bolduan S., Schindler M., Doria M. HIV-1 Nef and Vpu interfere with L-selectin (CD62L) cell surface expression to inhibit adhesion and signaling in infected CD4+ T lymphocytes. *J. Virol.* 2015; 89(10): 5687–700. <https://doi.org/10.1128/JVI.00611-15>
 19. Segura J., He B., Ireland J., Zou Z., Shen T., Roth G., et al. The role of L-selectin in HIV infection. *Front. Microbiol.* 2021; 12: 725741. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.725741>
 20. Freedman A.S., Nadler L.M. Immunologic markers in non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 1991; 5(5): 871–89.
 21. Mahalingam M., Pozniak A., McManus T.J., Vergani D., Peakman M. Cell cycling in HIV infection: analysis of in vivo activated lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 1995; 102(3): 481–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.1995.tb03841.x>
 22. Horsburgh B.A., Lee E., Hiener B., Eden J.S., Schlub T.E., von Stockenström S., et al. High levels of genetically intact HIV in HLA-DR+ memory T cells indicates their value for reservoir studies. *AIDS.* 2020; 34(5): 659–68. <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000002465>

REFERENCES

1. Masenga S.K., Mweene B.C., Luwaya E., Muchaili L., Chona M., Kirabo A. HIV-host cell interactions. *Cells.* 2023; 12(10): 1351. <https://doi.org/10.3390/cells12101351>
2. Hokello J., Tyagi P., Dimri S., Sharma A.L., Tyagi M. Comparison of the biological basis for non-HIV transmission to HIV-exposed seronegative individuals, disease non-progression in HIV long-term non-progressors and elite controllers. *Viruses.* 2023; 15(6): 1362. <https://doi.org/10.3390/v15061362>
3. Ventura J.D. Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1): Viral latency, the reservoir, and the cure. *Yale J. Biol. Med.* 2020; 93(4): 549–60.
4. Lv T., Cao W., Li T. HIV-related immune activation and inflammation: current understanding and strategies. *J. Immunol. Res.* 2021; 2021: 7316456. <https://doi.org/10.1155/2021/7316456>
5. Yang X., Su B., Zhang X., Liu Y., Wu H., Zhang T. Incomplete immune reconstitution in HIV/AIDS patients on antiretroviral therapy: Challenges of immunological non-responders. *J. Leukoc. Biol.* 2020; 107(4): 597–612. <https://doi.org/10.1002/JLB.4MR1019-189R>
6. Besednova N.N., Makarenkova I.D., Fedyanina L.N., Avdeeva Zh.I., Kryzhanovskiy S.P., Kuznetsova T.A., et al. Prokaryotic and eukaryotic DNA in prevention and treatment of infectious diseases. *Antibiotiki i khimioterapiya.* 2018; 63(5-6): 52–67. <https://elibrary.ru/xvvinv> (in Russian)
7. Nosik D.N., Kalnina L.B., Lobach O.A., Chataeva M.S., Berezhnaya E.V., Bochkova M.S., et al. Antiviral and virucidal activity of sodium deoxyribonucleate and its complex with iron against viruses of different kingdoms and families. *Voprosy virusologii.* 2022;

Информация об авторах:

Носик Дмитрий Николаевич – д-р мед. наук, профессор, руководитель лаборатории противовирусных и дезинфекционных средств Института вирусологии имени Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: dnnosik@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5757-5671>

Калнина Людмила Борисовна – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории противовирусных и дезинфекционных средств Института вирусологии имени Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: klb3@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2702-8578>

Селимова Людмила Мидатовна [✉] – д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории противовирусных и дезинфекционных средств Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: lselim@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3709-770X>

Каплина Элли Николаевна – канд. тех. наук, профессор РАЕ, консультант ООО «ФармПак», Москва, Россия. E-mail: info@derinat.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8540-5856>

Участие авторов: Носик Д.Н., Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Каплина Э.Н. – разработка концепции, проведение исследований, написание и редактирование статьи.

Поступила 20.05.2024
Принята в печать 12.07.2024
Опубликована 31.08.2024

Information about the authors:

Dmitry N. Nosik – Professor, Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Antiviral and Disinfection Agents, The D.I. Ivanovsky Institute of Virology National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: dnnosik@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5757-5671>

Lyudmila B. Kalnina – Candidate of Biological Sciences, Leading researcher of the Laboratory of Antiviral and Disinfection Agents, The D.I. Ivanovsky Institute of Virology National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: klb3@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2702-8578>

Lyudmila M. Selimova [✉] – Doctor of Biological Sciences, Leader Researcher at the Laboratory of Antivirals and Disinfectants, D.I. Ivanovsky Institute of Virology of National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: lselim@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3709-770X>

Ellie N. Kaplina – Candidate of Technical Sciences, Professor RAE, Consultant LLC PharmPak, Moscow, Russia. E-mail: info@derinat.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8540-5856>

Contribution: Nosik D.N., Selimova L.M., Kalnina L.B., Kaplina E.N. – concept development, research, article writing and editing.

Received 20 May 2024
Accepted 12 July 2024
Published 31 August 2024

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-241>

© ODEBISI-OMOKANYE M.B., SULEIMAN M.M., SULAIMAN M.K., ATOLAGBE S.A., 2024



Seropositivity of West Nile virus among acute febrile patients in Ilorin, Nigeria

Mutiati B. Odebisi-Omokanye^{✉1}, Muhammed M. Suleiman², Mariam K. Sulaiman³, Sidiq A. Atolagbe¹

¹Medical Microbiology Unit, Department of Microbiology, University of Ilorin, P.M.B 1515, Ilorin, Nigeria;

²Department of Biological Science, Summit University Offa, P.M.B. 4412, Offa, Nigeria;

³Department of Medical Microbiology and Parasitology, Old College of Health Sciences, University of Ilorin, P.M.B 1515, Ilorin, Nigeria

Abstract

Introduction. West Nile Virus (WNV), a member of *Flaviviridae* family, is one of the most widely distributed arboviruses in the world. In developing countries like Nigeria, fever resulting from the WNV infection is often presumptively ascribed to malaria or typhoid due to misdiagnosis and low-level awareness of the viral infection. This study determined the prevalence of WNV IgM and IgG antibodies among febrile patients in the Ilorin metropolis.

Materials and methods. A total of two hundred (200) blood samples were collected from consenting patients and each serum was screened for anti-WNV IgM and IgG antibodies using indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Statistical correlation and logistic regression analysis were conducted.

Results. Overall, 6% (12/200) anti-WNV IgM seropositivity rate was recorded amongst the acute febrile patients with higher prevalence (6.30%) in females than in males (5.45%). Anti-WNV IgG positivity rate of 52% (104/200) was recorded, with 50.67% positivity rate in males and 38.95% in female participants. The convalescence phase posited by the 5.4% (11/200) co-detection of anti-WNV IgG and IgM antibodies among the participants was recorded. A statistical correlation was noticed with the age and religion of respondents to WNV serological positivity while gender, occupation, use of mosquito nets and formal education had no positive correlation at $p < 0.05$. However, based on odd ratio at 95% CI and logistic regression coefficients, the evaluated risk factors such as blood transfusion, residency, malaria parasite, and proximity to stagnant water and bush were significant to anti-WNV IgG and IgM positivity.

Conclusion. The findings of this study show the circulation of WNV in the study area. There is an urgent need for clinicians/physicians to include screening for the West Nile virus in cases of febrile patients before the commencement of treatment.

Keywords: Seropositivity; West Nile Virus; Febrile; Immunoglobulin; Flavivirus

For citation: Odebisi-Omokanye M.B., Suleiman M.M., Sulaiman M.K., Atolagbe S.A. Seropositivity of West Nile virus among acute febrile patients in Ilorin, Nigeria. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(4): 320–328. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-241> EDN: <https://elibrary.ru/pvhwlc>

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

Acknowledgement. We acknowledge the Kwara State Ministry of Health for approving the research and Sobi specialist Hospital, Childrens' specialist hospital, Civil Service Specialist Hospital, Cottage Hospital, Gaa Akanbi Area Healthcare, Hawau Ronke Memorial Medical Pathology Laboratory, Medicare Hospital, Olarenwaju Hospital, Omolola Hospital, Temitope Hospital and Yusjib Hospital for allowing access to their facilities and patients.

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 and Health Research Board of the Ministry of Health, Ilorin, Kwara State, Nigeria (ERC/MOH/2023/02/091 dated 13th March, 2023).

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-241>

Частота выявления антител к вирусу Западного Нила среди пациентов с острой фебрильностью в Илорине, Нигерия

Mutiati B. Odebisi-Omokanye^{✉1}, Muhammed M. Suleiman², Mariam K. Sulaiman³, Sidiq A. Atolagbe¹

¹Отделение медицинской микробиологии, кафедра микробиологии, Университет Илорина, PMB 1515, Илорин, Нигерия;

²Факультет биологических наук Саммитского университета Оффа, P.M.B. 4412, Оффа, Нигерия;

³Кафедра медицинской микробиологии и паразитологии, Старый колледж медицинских наук, университет Илорина, PMB 1515, Илорин, Нигерия

Резюме

Введение. Вирус Западного Нила (ВЗН), представитель семейства *Flaviviridae*, является одним из наиболее широко распространенных арбовирусов в мире. В развивающихся странах, таких как Нигерия, лихорадка, возникающая в результате инфекции ВЗН, часто ошибочно ассоциируют с малярией или брюшным тифом из-за неспецифического диагноза и низкого уровня осведомленности об этой инфекции. В настоящем исследовании определяли распространенность антител к ВЗН классов IgM и IgG среди пациентов с лихорадкой в мегаполисе Илорин.

Материалы и методы. В общей сложности у 200 пациентов были взяты образцы крови, и каждая сыворотка была проверена на наличие антител к ВЗН классов IgM и IgG с использованием непрямого иммуноферментного анализа (ELISA). Были рассчитаны статистическая корреляция и коэффициенты логистической регрессии.

Результаты. В целом анти-ВЗН IgM были выявлены в 6% (12/200) пациентов с острой лихорадкой, с более высокой частотой выявления (6,30%) у женщин, чем у мужчин (5,45%). Частота выявления анти-ВЗН IgG составила 52% (104/200), при этом серопревалентность среди мужчин составила 50,67%, а среди женщин – 38,95%. На стадии реконвалесценции, о которой свидетельствует одновременное обнаружение антител к ВЗН классов IgG и IgM, находились 5,4% (11/200) участников. Была получена статистически значимая корреляция серопозитивности с возрастом и религией респондентов, тогда как пол, род занятий, использование противомоскитных сеток и уровень образования не имели положительной корреляции при $p < 0,05$. Однако на основе отношения рисков при 95% ДИ и коэффициентов логистической регрессии такие факторы риска, как переливание крови, место проживания, инфицирование малярийным плазмодием, близость к стоячей воде и зарослям кустарника, были значимыми для положительного результата выявления анти-ВЗН-IgG и -IgM.

Заключение. Результаты этого исследования показывают циркуляцию ВЗН в исследуемой зоне. Клиницистам/врачам необходимо срочно включить скрининг на вирус Западного Нила у пациентов с лихорадкой перед началом лечения.

Ключевые слова: серопозитивность; вирус Западного Нила; лихорадка; иммуноглобулин; флавивирус

Для цитирования: Odebisi-Omokanye M.B., Suleiman M.M., Sulaiman M.K., Atolagbe S.A. Частота выявления антител к вирусу Западного Нила среди пациентов с острой фебрильностью в Илорине, Нигерия. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(4): 320–328. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-241> EDN: <https://elibrary.ru/pvhwlc>

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

Благодарность. Мы выражаем признательность Министерству здравоохранения штата Квара за одобрение исследования, а также специализированной больнице Соби, специализированной детской больнице, специализированной больнице гражданской службы, больнице Cottage, Gaa Akanbi Area Healthcare, мемориальной медицинской патологической лаборатории Hawau Ronke, больнице Medicare, больнице Olagenwaji, больнице Otolola, больнице Temitore и больнице Yusjib за предоставление доступа к их учреждениям и пациентам.

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 Советом по этике и медицинским исследованиям Министерства здравоохранения, Илорин, Нигерия (Протокол № ERC/МОН/2023/02/091 от 13.03.2023).

Introduction

West Nile virus (WNV) is one of the widely distributed arboviruses globally, and a pathogen of public health significance in both humans and animals [1]. This mosqui-

to-borne virus belongs to the genus *Flavivirus* within the family of *Flaviviridae* [2].

West Nile virus (WNV) was first isolated in 1937 in the West Nile district of Uganda while the first reported

human epidemic occurred in Israel in 1951 [3]. Subsequently, it was found to cause outbreaks in Africa, the Middle East, and Western Asia [4]. There has been significant geographical spread of WNV worldwide, abetted by activities such as international travel, globalization and land use.

The main vectors of WNV are mosquitoes belonging to *Culex* spp and *Aedes* spp [5, 6]. The virus is maintained in nature by mosquito – bird – mosquito transmission cycle. Nonetheless, other modes of transmission have been recognized: breastfeeding, blood transfusion, organ transplantation, and occupational exposure among laboratory workers [4, 7, 8]. Humans and other vertebrates such as horses do not play a role in the transmission of WNV and are referred to as «dead-end» hosts. This is because they are susceptible but unable to transmit to mosquitoes due to the short-lived and low viremia [9]. They can however manifest severe disease or death as a result of the infection [10].

In humans, 80% of WNV infections are asymptomatic, 20% develop a flu-like illness, and less than 1% progress to develop neurological disease, which is predominant in the elderly and immunocompromised [11, 12]. In symptomatic individuals, symptoms such as mild fever, headaches, nausea, and/or rashes appear between 3–14 days although in severe cases may be biphasic with symptoms sustained for up to 60 days [4, 13]. The often-non-specific symptoms of West Nile Virus infections in human makes differential neurological disease, which can be severe causing viral encephalitis, meningitis, and/or seizures [4, 13].

Differential diagnosis of WNV infection in humans is seemingly complicated due to the associated non-specific symptoms [14, 15]. In developing countries like Nigeria, this is even more difficult as a result of the unavailability of appropriate diagnostic infrastructure and low level of awareness of arboviruses leading to misdiagnosis and underdiagnosis. Owing to this, many cases of WNV infection are often regarded as fever of unknown cause resulting in wrong treatment which leads to high morbidity and mortality [16]. Further evidence also supports that the prevalence of WNV in Nigeria is sparse. Therefore, this study was conducted among patients with acute febrile conditions to elucidate the level of exposure to the virus and highlight the need for WNV routine testing among febrile patients before the commencement of treatment.

Materials and methods

Study design and population

This hospital-based cross-sectional study was conducted from May to July 2023 in selected health facilities of Ilorin City, Kwara state, Nigeria. Ilorin is a city in Kwara State situated at 8° 30' North, 4° 30' East, 300 km from Lagos, and 500 km from Abuja, the Federal Capital Territory. It is in the Guinea savannah vegetation zone, known to breed various mosquito species and with hot, dry, and wet-mild seasons that might vary yearly. Three primary and secondary health facilities were used as sampling locations for moderate representation of the populace.

Only consenting patients attending the selected hospitals and exhibiting fever symptoms (temperature above > 37.8 °C) were recruited for the study. Enrolled in the study were 200 (73 males and 127 females; age range: ≤ 10 –70 years) consenting in and out-patients presenting with fever regardless of age and gender. Excluded from the study were febrile patients who did not give their consent to be enrolled on the study.

Data and Sample Collection

Data collection was via a well-structured close-ended questionnaire. This was used to obtain the socio-demographic information of enrollees and predisposing factors to WNV. For sample collection, a total of 200 blood samples were collected across the locations after screening with the inclusion criteria. The collected venous blood sample was kept in a prelabelled plain sampling bottle to allow for clotting at room temperature, and serum separation was at 3000 rpm for 5 minutes. According to the manufacturer's instructions (i.e. Sunlong Biotech, Co. Ltd., China) IgG and IgM screening for WNV was conducted on the sera. The reagents included the negative and positive controls, HRP-conjugate, Sample diluent, Chromogen Solution A, Chromogen Solution B, Stop and wash solution respectively. Samples were added to the Microplate wells and applied to the specific antigen. Horseradish Peroxidase (HRP)-conjugated antigen specific for WNV-IgG/IgM was added to each Microplate well and incubated for formation of antigen-antibody-Enzyme labeled antigen complex. The wash solution was used to remove any unbound reagent, then the TMB substrate solution was added to each well. This was followed by addition of stop solution where only those wells that contain WNV-IgG and HRP conjugated WNV antigen will appear blue in color and then turn yellow after the addition of the stop solution. The optical density (OD) was measured spectrophotometrically at wavelength of 450 nm while the qualitative determination of the respective immunoglobulin was determined by comparing with the cut-off value.

Result Interpretation for assay

The interpretation according to manufacturer instruction is based on the following standard (Sunlong Biotech LTD);

- I. Test effectiveness = average value of positive control ≥ 1.00 while the average value of negative control ≤ 0.10 .
- II. The critical value (cut-off) calculation = the average value of negative control + 0.15.
- III. Negative judgement = if the OD value $<$ cut-off value.
- IV. Positive judgement = if the OD value \geq cut-off value.

Ethical Consideration

The protocol for this study was submitted to and approved by the Ethics and Health Research Board of the Ministry of Health, Ilorin, Kwara State, Nigeria (ERC/MOH/2023/02/091). The protocol followed the guidelines of Helsinki Declaration for the use of human sub-

jects. Before enrolment into the study and sample collection, informed consent was obtained from all the participants and from the parents and legal guardians (in case of participants who are less than 18 years old). Strict confidentiality was maintained as all results were not traceable to the patient identifiers and were kept anonymous. The inclusion of religion is for epidemiological completeness and not to imply causation or judgment.

Statistical Analysis

Data obtained from questionnaires were presented in tables and graphs. All statistical analysis was done using the Statistical Package for the Social Science (SPSS) version 27.0 software package. The significance of the values obtained was determined at $p < 0.05$ and 95% confidence interval to determine the relationship between the variable and the prevalence of the infection. Furthermore, logistic regression coefficients through Google Colab and Python programming language (version 3.11) were used for IgG and IgM positivity to the risk factors and the odd ratio.

Results

Of the 200 sera samples tested, 12 were positive for anti-WNV IgM and 104 for IgG antibody respectively. This accounts for 6% of recent/current infections and 52% of previous infections respectively among the febrile patients enrolled in the study. Additionally, 11 (5.5%) of the respondents were having an ongoing or recent immune activity due to co-detection of IgG and IgM antibodies (Fig. 1).

The mean age of the study participants was 28 years, while median and range is 15.5 years and 70 years respectively suggesting younger individuals are more frequently affected with fewer older outliers. There was no observed statistical significance ($p > 0.05$) in the presence of anti-WNV IgM antibodies with respect to age, gender, educational level and occupation (Table 1). The distribution of age group showed that subjects in the age group 11–20 years had the highest prevalence of 26.5% (53/200) and 3.5% (7/200), followed by subjects in the age range 21–30 years with the prevalence of 16.5% (33/200) and 1% (2/200), subjects in the age range 61–70 years had lowest prevalence of 0% (0/200) and 0.5% (1/200) for anti-WNV IgG and IgM antibodies respectively (Table 1). However, the Odds Ratio (OR) for the anti-WNV-IgM positivity for different age groups is closer to 1 than that of IgG antibodies, but the p -value was statistically significant for IgG positivity.

The OR for IgM positivity among males compared to females is 0.930 (95% CI: 0.270–2.900) indicating that the odds of being IgM antibody positive for males is 0.930 times lower than females while that of IgG antibodies is 0.729 (95% CI: 0.482–1.321). For religion, OR IgM positivity among Christians compared to Muslims is 0.814 (95% CI: 0.249–2.658) while 3.700 (95% CI: 1.683–4.604) for IgG antibodies. Seropositivity was higher among Islam faith subjects with prevalence of 36.5% (73/200) and 3.5% (7/200) for anti-WNV IgG and IgM antibodies, while a lower prevalence was ob-

served for the Christian faith subjects 15.5% (31/200) WNV IgG and 2.5% (5/200) WNV IgM. The result further shows higher odds of being IgG antibody positive amongst Christians and lower odds of being IgM antibody positive respectively compared to Muslim respondents. A higher odd of being IgM antibody positive amongst individuals with no formal education is recorded at 2.976 (95% CI: 0–infinity) while lower odds for IgG positivity were recorded at 0.099 (95% CI: 0.008–1.280). The odds ratio for unemployment in this study was 2.650 (95% CI: 0.850–9.424).

The results were also analyzed in relation to some predisposing factors to the acquisition of WNV including; use of mosquito nets, blood transfusion, presence of malaria parasite, presence of typhoid fever, residential area, nearness of residence to bush, closeness to stagnant water and use of mosquito repellent at 1.397, 1.396, 0.765, 2.503, 0.981, 1.645, and 0.999 odds ratios respectively (Tables 2 and 3). The result showed no statistically significant relationship ($p > 0.05$) to the risk factors and the presence of anti-WNV IgM and IgG antibodies but with notable influence of the risk factors to anti-WNV IgG and IgM positivity via the odd ratio at 95% CI (Tables 2 and 3).

Figures 2 and 3 display the logistic regression coefficients for the IgG and IgM positivity respectively. Significant positive coefficients were noticed on the risk factors as a predictor of seropositivity for IgM and IgG antibodies. Blood transfusion, malaria parasites, typhoid, rural residential areas and nearness to the bush are among the predictors with significant coefficients as depicted by the magnitude of the line for IgG antibodies (Fig. 2). Blood

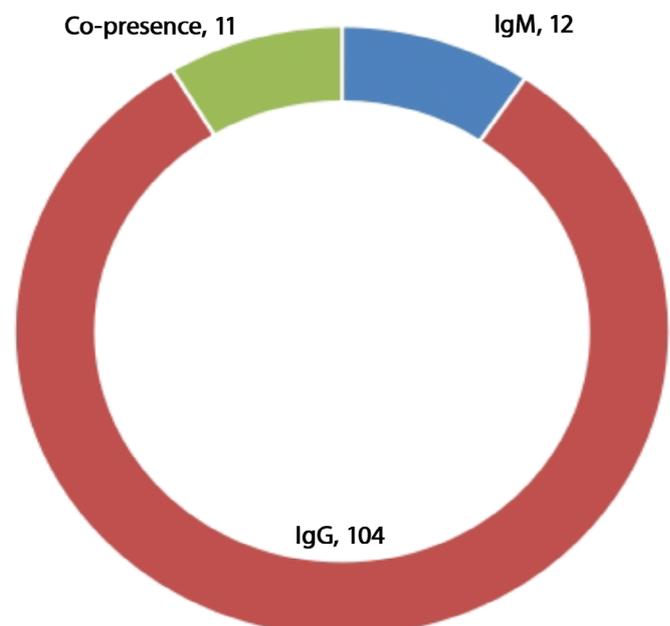


Fig. 1. Prevalence of antibodies to WNV among febrile respondents in Ilorin metropolis.

Рис. 1. Распространенность антител к ВЗН среди респондентов с лихорадкой в мегаполисе Илорин.

Table 1. Relationship between demographic factors and distribution pattern of WNV IgM and IgG antibodies among febrile patients in selected hospitals in Ilorin, metropolis

Таблица 1. Связь между демографическими факторами и распределением антител классов IgM и IgG к вирусу Западного Нила среди пациентов с лихорадкой в отдельных больницах мегаполиса Илорин

Demographic Characteristics Демографические характеристики	<i>n</i>	IgM +Ve (%)	<i>p</i> -value OR	95% CI Lower–Upper	IgG +Ve (%)	<i>p</i> -value OR	95% CI Lower–Upper
Gender / Пол							
Male / Мужской	73	4 (5.45)	0.856 0.930	0.270–2.900	37 (50.68)	0.800 0.729	0.482–1.321
Female / Женский	127	8 (6.30)			67 (38.95)		
Total / Всего	200	12 (6)			104 (57.1)		
Age (Years) / Возраст (лет)							
≤ 10	43	2 (1)	0.660 0.883	0.750–1.602	33 (16.5)	0.000* 0.602	0.198–0.698
11–20	91	7 (3.5)			53 (26.5)		
21–30	48	1 (0.5)			12 (6)		
31–40	4	1 (0.5)			1 (0.55)		
41–50	9	1 (0.5)			4 (2)		
51–60	3	0 (0)			0 (0)		
61–70	2	0 (0)			1 (0.5)		
Total / Всего	200	12 (6)			104 (52)		
Religion / Религия							
Islam / Ислам	124	7 (3.5)	0.781 0.814	0.249–2.658	73 (36.5)	0.008* 3.700	1.683–4.604
Christianity / Христианство	75	5 (2.5)			31 (15.5)		
Total / Всего	200	12 (6)			104 (52)		
Formal Education / Образование							
Yes / Да	125	8(4)	0.864 2.976	0	66 (33)	0.850 0.099	0.008–1.280
No / Нет	75	4(2)			38 (19)		
Total / Всего	200	12(6)			104 (52)		
Occupation / Занятие							
Employed / Трудящиеся	127	11(5.5)	0.290 0	0	62 (31)	0.140 2.650	0.850–9.424
Unemployed / Безработные	10	0(0)			8 (4)		
Student / Студент	63	1(0.5)			34 (17)		
Total Всего	200	12(6)			104 (52)		

Note. *Statistically significant ($p < 0.05$); OR – odds ratio; CI – Confidence Interval.

Примечание. *Статистически значимо ($p < 0,05$); OR – отношение шансов; CI – доверительный интервал.

transfusion, typhoid, rural residential, proximity to the bush and uncovered drainage channel, mosquito repellent frequency and use of mosquito net were significant correlations to IgM positivity (Fig. 3). A negative correlation was noticed between the presence of malaria for IgG positivity and the use of mosquito nets for IgM positivity respectively.

Discussion

The study revealed the presence of WNV amongst the respondents as depicted by the IgM antibody prevalence of 6% (12/200). This prevalence is higher than the 2.9%

reported in semi-arid zones in Nigeria [16], and 0.0% that was reported in Osun state Nigeria [17], but lower than 10.3% in Zambia [18] and 8.2% reported in North Dakota USA [19]. The difference in the IgM antibody prevalence could be attributed to the seasonality of sample collection where the cold period was posited to have a higher prevalence. However, a prevalence of 53% was reported in the southwestern city of Ibadan [20] in 1990 using complement-fixing antibodies. IgM antibody prevalence of 8.2% was reported in Ilorin while a slightly lower prevalence of 5.2% was noticed in the northern part of Nigeria [21]. This shows the silent transmission of

Table 2. Prevalence of anti-WNV IgG antibodies in relation to risk factors among febrile patients attending selected hospitals in the Ilorin metropolis
Таблица 2. Частота выявления антител класса IgG к вирусу Западного Нила в зависимости от факторов риска среди пациентов с лихорадкой в отдельных больницах мегаполиса Илорин

Risk Factors / Факторы риска	n	IgG +Ve (%)	OR	95% CI	p-value
Blood transfusion / Переливание крови					
Yes / Да	51	25 (12.5)	1.397	0.758–3.592	0.735
No / Нет	149	79 (39.5)			
Malaria Parasite / Малярийный паразит					
Yes / Да	101	54 (27.0)	1.396	0.748–2.946	0.694
No / Нет	99	50 (25.0)			
Typhoid / Брюшной тиф					
Yes / Да	73	32 (16.0)	0.765	0.286–2.834	0.086
No / Нет	127	72 (36.0)			
Residential area / Местность проживания					
Rural / Село	44	28 (14.0)	2.503	0.964–4.692	0.085
Urban / Город	156	76 (38.0)			
Neatness to bush / Близость к зарослям кустарника					
Yes / Да	82	43 (21.5)	0.981	0.465–1.694	0.964
No / Нет	118	61 (30.5)			
Closeness to stagnant water or uncovered gutter / Близость к стоячей воде или открытому водостоку.					
Not close / Далеко	147	79 (39.5)	1.645	0.786–2.846	0.648
Very close / Очень близко	53	25 (12.5)			
Use of Mosquito repellent / Использование репеллента от комаров					
Frequently / Часто	84	40 (20.0)	0.999	0.740–1.545	0.356
Rarely / Редко	87	48 (24.0)			
Never / Никогда	29	16 (8.0)			
Use of Mosquito Net / Использование москитной сетки					
Yes / Да	77	70 (35)	0.196	0.076–0.236	0.142
No / Нет	123	6 (3)			
Total / Всего	200	104 (52)			

Note. *Statistically significant ($p < 0.05$); OR – odds ratio; CI – Confidence Interval.

Примечание. *Статистически значимо ($p < 0,05$); OR – отношение шансов; CI – доверительный интервал.

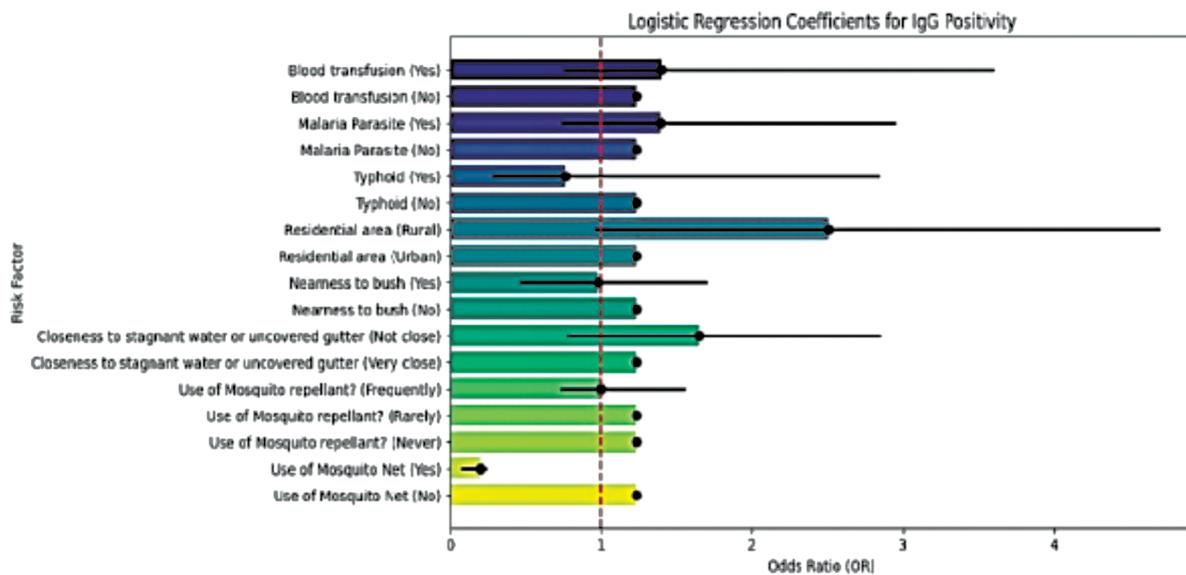


Fig. 2. Logistic Regression Coefficients for Anti-WNV IgG Antibody Positivity.

Рис. 2. Коэффициенты логистической регрессии для положительного результата выявления анти-ВЗН класса IgG.

Table 3. Prevalence of anti-WNV IgM antibodies in relation to risk factors among febrile patients attending selected hospitals in the Ilorin metropolis
Таблица 3. Частота выявления антител класса IgM к вирусу Западного Нила в зависимости от факторов риска среди пациентов с лихорадкой в отдельных больницах мегаполиса Илорин

Risk Factors / Факторы риска	n	IgM +Ve (%)	OR	95% CI	p-value
Blood transfusion / Переливание крови					
Yes / Да	51	6 (3.0)	1.941	0.364–4.642	0.886
No / Нет	149	6 (3.0)			
Malaria Parasite / Малярийный паразит					
Yes / Да	101	7 (3.5)	1.86	0.570–2.962	0.780
No / Нет	99	5 (2.5)			
Typhoid / Брюшной тиф					
Yes / Да	73	3 (1.5)	0.782	0.389–2.780	0.074
No / Нет	127	9 (4.5)			
Residential area / Местность проживания					
Rural / Село	44	1 (0.5)	0.369	0.056–2.856	0.220
Urban / Город	156	11 (5.5)			
Nearness to bush / Близость к зарослям кустарника					
Yes / Да	82	5 (2.5)	1.142	0.549–3.758	0.861
No / Нет	118	7 (3.5)			
Closeness to stagnant water or uncovered gutter / Близость к стоячей воде или открытому водостоку					
Not close / Далеко	147	10 (5.0)	1.646	0.386–8.468	0.64
Very close / Очень близко	53	2 (1.0)			
Use of Mosquito repellent / Использование репеллента от комаров					
Frequently / Часто	84	7 (3.5)	1.086	0.688–2.684	0.301
Rarely / Редко	87	2 (1.0)			
Never / Никогда	29	3 (1.5)			
Use of Mosquito Net / Использование москитной сетки					
Yes / Да	77	6(3)	1.580	0.480–7.608	0.406
No Нет	123	6(3)			
Total / Всего	200	12(6)			

Note. *Statistically significant ($p < 0.05$); OR – odds ratio; CI – Confidence Interval.

Примечание. *Статистически значимо ($p < 0,05$); OR – отношение шансов; CI – доверительный интервал.

WNV among the populace across different locations [16]. This study also reported a higher anti-WNV IgG antibody prevalence of 52% (104/200), this prevalence is higher than the 37.0% in Sudan, and 6.6% reported in Ilorin [21]. The differences may be due to the sample size, environmental conditions or geographical location.

In this study, the prevalence of West Nile Virus IgG antibodies varies across age groups, with the highest prevalence observed in the age group < 10 years (16.5%), while the age group 51–60 years had the least prevalence (0%). A statistically significant association between age and West Nile Virus seropositivity rate was recorded. However, it's important to note that the very low counts in some age groups may impact the validity. This study conforms with the research that delved into age-related patterns of West Nile Virus seroprevalence [22]. It was posited that age could be a significant factor, especially in areas with a substantial proportion of elderly individuals. Age-related

differences in immunity and exposure could contribute to varying West Nile Virus seroprevalence rates. Contrary to this study, other studies [20, 23] reported a higher prevalence in the older age group. This study could not establish any statistically significant association between other variables including; gender, occupation, use of mosquito nets, formal education, use of mosquito nets, blood transfusion, co-infection of the malaria parasite, co-infection of typhoid fever, residential area, nearness to a bush, closeness to stagnant water and use of mosquito repellent and the occurrence of anti-WNV IgM and IgG antibodies signifying little or no contribution of these factors to the spread of the infection in this location. This could be related to the seasonality of this research or the significant level of IgG antibodies which depicts past infection amongst the participants. A statistically significant association between religion and anti-WNV IgM and IgG antibodies was noticed where the participants of the Islamic faith had a higher

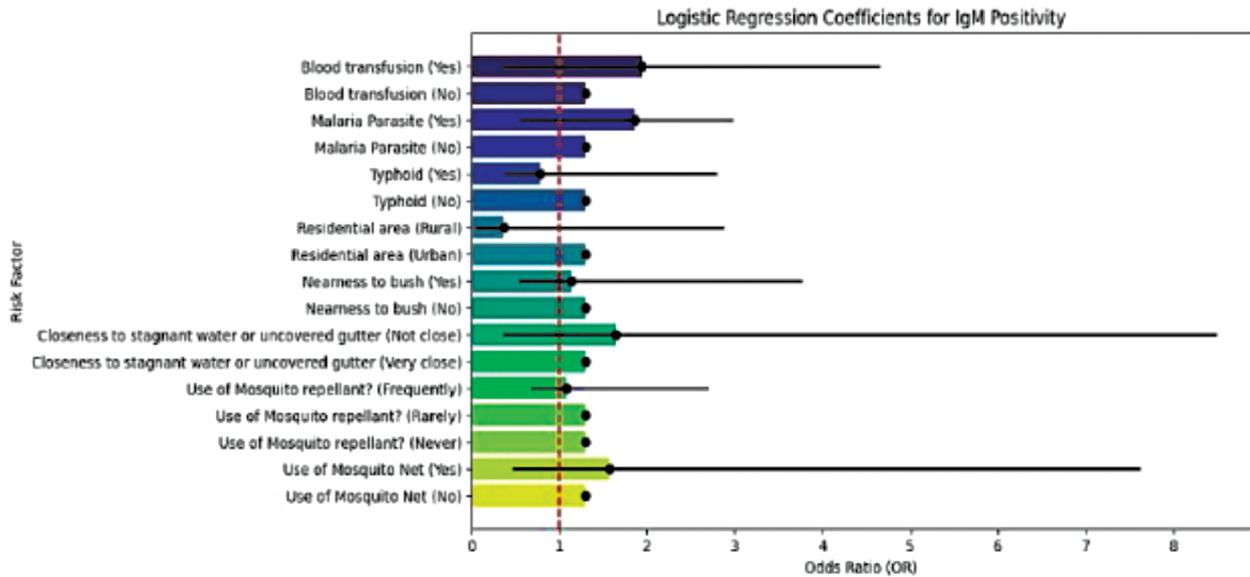


Fig. 3. Logistic Regression Coefficients for Anti-WNV IgM Antibody Positivity.

Рис. 3. Коэффициенты логистической регрессии для положительного результата выявления анти-ВЗН класса IgM.

prevalence than the Christian faith. Religion, as a cultural and social determinant, can influence behaviours, practices, and exposure risks relevant in the context of infectious diseases. There are infrastructural differences/physical barriers in protection against the vector of the infectious agent. This correlates with a report [18] investigating the association between religion and West Nile Virus seroprevalence in a similar context. The importance of considering multiple factors, including environmental conditions and individual behaviors, to understand the dynamics of West Nile Virus seroprevalence was highlighted.

The blood transfusion history of respondents revealed an odd of 1.397 and 1.941 in participants with a history of blood transfusion than those without signifying increased risk among participants with blood transfusion history. This correlates with the report of blood as a possible transmission route of the virus [8]. Likewise, the odds of WNV IgG and IgM positivity amongst participants with the malaria parasite are 1.396 and 1.860 times higher than those without. This can be attributed to the increased risk associated with the shared vector of malaria and West Nile virus (i.e. mosquito) and the risk of false positivity by cross-reactivity. This is further supported by the magnitude of the coefficients in Figure 2 for IgG positivity.

A similar trend was noticed among participants in rural areas which are 2.503 times higher than those in urban areas. Participants in proximity to stagnant water or uncovered gutter are 1.645 and 1.646 times at risk of anti-WNV IgG and IgM positivity while nearness to bush had no significance for anti-WNV IgG positivity. Analysis of the odd for nearness to bush in relation to anti-WNV IgM antibodies showed 1.142 times higher risk compared to those that are not. The significant statistical expression based on odds ratio and CI correlate to the known factors that could improve or encourage the breeding sites of mosquitoes which can transmit the virus. Thus, public

awareness of the route of transmission of the virus is encouraged alongside the advocacy for the screening of blood samples for viral agents like West Nile virus to reduce localized transmission.

Conclusion

The findings of this study show the circulation of WNV in the study area. There is an urgent need for clinicians/physicians to include screening for the West Nile virus in cases of febrile patients before the commencement of treatment.

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Petersen L.R., Brault A.C., Nasci R.S. West Nile virus: review of the literature. *JAMA*. 2013; 310(3): 308–15. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.8042>
- Huhtamo E., Cook S., Moureau G., Uzcátegui N.Y., Sironen T., Kuivanen S., et al. Novel flaviviruses from mosquitoes: mosquito-specific evolutionary lineages within the phylogenetic group of mosquito-borne flaviviruses. *Virology*. 2014; 464-465: 320–9. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.07.015>
- Chancey C., Grinev A., Volkova E., Rios M. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *Biomed. Res. Int.* 2015; 2015: 376230. <https://doi.org/10.1155/2015/376230>
- Hayes E.B., Komar N., Nasci R.S., Montgomery S.P., O'Leary D.R., Campbell G.L. Epidemiology and transmission dynamics of West Nile virus disease. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11(8): 1167–73. <https://doi.org/10.3201/eid1108.050289a>
- Calistri P., Giovannini A., Hubalek Z., Ionescu A., Monaco F., Savini G., et al. Epidemiology of West Nile virus in Europe and in the Mediterranean Basin. *Open Virol. J.* 2010; 4: 29–37. <https://doi.org/10.2174/1874357901004020029>
- Mencattelli G., Ndione M.H.D., Rosà R., Marini G., Diagne C.T., Diagne M.M., et al. Epidemiology of West Nile virus in Africa: An underestimated threat. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2022; 16(1): e0010075. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010075>
- Sampathkumar P. West Nile virus: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and prevention. *Mayo. Clin. Proc.* 2003; 78(9): 1137–43; quiz 1144. <https://doi.org/10.4065/78.9.1137>
- CDC. Blood Transfusion and Organ Donation (West Nile Virus); 2024. Available at: <https://www.cdc.gov/west-nile-virus/caus->

- es/blood-transfusions.html#:~:text=Can%201%20donate%20blood%20if,should%20tell%20your%20blood%20center
9. Powell J.R. Modifying mosquitoes to suppress disease transmission: Is the long wait over? *Genetics*. 2022; 221(3): iyac072. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyac072>
 10. Dahmana H., Mediannikov O. Mosquito-borne diseases emergence/resurgence and how to effectively control it biologically. *Pathogens*. 2020; 9(4): 310. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040310>
 11. Pealer L.N., Marfin A.A., Petersen L.R., Lanciotti R.S., Page P.L., Stramer S.L., et al. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N. Engl. J. Med.* 2003; 349(13): 1236–45. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030969>
 12. Santini M., Haberle S., Židovec-Lepej S., Savić V., Kusulja M., Papić N., et al. Severe West Nile virus neuroinvasive disease: clinical characteristics, short- and long-term outcomes. *Pathogens*. 2022; 11(1): 52. <https://doi.org/10.3390/pathogens11010052>
 13. Hernandez Acosta R.A., Esquer Garrigos Z., Marcelin J.R., Vijayvargiya P. COVID-19 pathogenesis and clinical manifestations. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2022; 36(2): 231–49. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2022.01.003>
 14. Monath T.P., Arroyo J., Miller C., Guirakhoo F. West Nile virus vaccine. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 2001; 1(1): 37–50. <https://doi.org/10.2174/1568005013343254>
 15. CDC. West Nile virus. Clinical evaluation and disease; 2024. Available at: https://www.cdc.gov/west-nile-virus/hcp/clinical-signs/?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/westnile/healthcareproviders/healthCareProviders-ClinLabEval.html
 16. Ma'aji J.A., Olonitola O.S., Ella E.E. Seroprevalence of West Nile virus (WNV) infection among febrile patients attending selected hospitals in Kaduna state, Nigeria. *Sci. Afr.* 2020; 10: e00588. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00588>
 17. Abdullahi I.N., Emeribe A.U., Ghamba P.E., Omosigho P.O., Bello Z.M., Oderinde B.S., et al. Distribution pattern and prevalence of West Nile virus infection in Nigeria from 1950 to 2020: a systematic review. *Epidemiol. Health.* 2020; 42: e2020071. <https://doi.org/10.4178/epih.e2020071>
 18. Abdullahi I.N., Emeribe A.U., Ghamba P.E., Omosigho P.O., Bello Z.M., Oderinde B.S., et al. Distribution pattern and prevalence of West Nile virus infection in Nigeria from 1950 to 2020: a systematic review. *Epidemiol. Health.* 2020; 42: e2020071. <https://doi.org/10.4178/epih.e2020071>
 19. Carson P.J., Borchardt S.M., Custer B., Prince H.E., Dunn-Williams J., Winkelmann V., et al. Neuroinvasive disease and West Nile virus infection, North Dakota, USA, 1999–2008. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(4): 684–6. <https://doi.org/10.3201/eid1804.111313>
 20. Omilabu S.A., Olaleye O.D., Aina Y., Fagbami A.H. West Nile complement fixing antibodies in Nigerian domestic animals and humans. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 1990; 34(4): 357–63.
 21. Udeze A.O., Shittu H.K., Ashaka O.S., Jakkari A., Oyefolu A.O. Anti-West Nile virus immunoglobulin G and M profiles of patients with Pyrexia of unknown origin In Ilorin, Nigeria. *Biokemistri.* 2022; 34(3): 34432–40.
 22. Murgue B., Murri S., Triki H., Deubel V., Zeller H.G. West Nile in the Mediterranean basin: 1950–2000. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2001; 951: 117–26. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02690.x>
 23. Mease L.E., Coldren R.L., Musila L.A., Prosser T., Ogolla F., Ofu-la V.O., et al. Seroprevalence and distribution of arboviral infections among rural Kenyan adults: a cross-sectional study. *Virology.* 2011; 8: 371. <https://doi.org/10.1186/1743-422x-8-371>

Information about the authors:

Odebisi-Omokanye, Mutiat Busayo✉ – PhD in Medical Microbiology, Senior Lecturer, Department of Microbiology, University of Ilorin, Nigeria. P.M.B. 1515, Ilorin, Nigeria. E-mail: odebisi.mb@unilorin.edu.ng; <https://orcid.org/0000-0001-9825-3193>

Suleiman, Muhammed Mustapha – PhD in Medical Microbiology, Lecturer, Department of Microbiology, Summit University of Offa P.M.B. 4412, Offa, Nigeria. E-mail: Suleiman.muhammed@summituniversity.edu.ng; <https://orcid.org/0000-0003-3275-1709>

Sulaiman, Mariam Kehinde – PhD Microbial and Cellular Sciences, Senior Lecturer, Department of Medical Microbiology and Parasitology, Old College of Health Sciences, university of Ilorin. E-mail: Sulaiman.km@unilorin.edu.ng; <https://orcid.org/0000-0002-8295-7855>

Atolagbe, Sidiq Abubakar – Postgraduate Student, Department of Microbiology, University of Ilorin, Nigeria. P.M.B. 1515, Ilorin, Nigeria E-mail: ayinlatorla@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0007-230-0232>

Contribution: Odebisi-Omokanye, Mutiat Busayo – conceptualization and original draft of the manuscript; Suleiman, Muhammed Mustapha – curated the data, reviewed and edited the manuscript; Sulaiman, Mariam Kehinde – lab analysis and proofreading; Atolagbe, Sidiq Abubakar – sample collection and Lab analysis.

Received 22 May 2024
Accepted 12 July 2024
Published 31 August 2024

Информация об авторах:

Odebisi-Omokanye, Mutiat Busayo✉ – PhD (медицинская микробиология), старший преподаватель кафедры микробиологии Университета Илорина, Нигерия. П.М.Б. 1515, Илорин, Нигерия. E-mail: odebisi.mb@unilorin.edu.ng; <https://orcid.org/0000-0001-9825-3193>

Suleiman, Muhammed Mustapha – PhD (медицинская микробиология), преподаватель кафедры микробиологии Саммитского университета Оффы П.М.Б. 4412, Оффа, Нигерия. E-mail: Suleiman.muhammed@summituniversity.edu.ng; <https://orcid.org/0000-0003-3275-1709>

Sulaiman, Mariam Kehinde – PhD (микробиология и клеточная биология), старший преподаватель кафедры медицинской микробиологии и паразитологии, Старый колледж медицинских наук, университет Илорина. E-mail: Sulaiman.km@unilorin.edu.ng; <https://orcid.org/0000-0002-8295-7855>

Atolagbe, Sidiq Abubakar – аспирант кафедры микробиологии Университета Илорина, Нигерия. П.М.Б. 1515, Илорин, Нигерия. E-mail: ayinlatorla@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0007-230-0232>

Вклад авторов: Odebisi-Omokanye, Mutiat Busayo – концепция и первоначальный проект рукописи; Suleiman, Muhammed Mustapha – анализ данных, проверка и редактирование рукописи; Sulaiman, Mariam Kehinde – лабораторный анализ и корректура; Atolagbe, Sidiq Abubakar – сбор проб и лабораторный анализ.

Поступила 22.05.2024
Принята в печать 12.07.2024
Опубликована 31.08.2024

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-242>

© КУСТОВА Д.Д., ПОЧТОВЫЙ А.А., ШПАКОВА О.Г., ШТИНОВА И.А., КУЗНЕЦОВА Н.А., КЛЕЙМЕНОВ Д.А., КОМАРОВ А.Г., ГУЩИН В.А., 2024



Молекулярно-биологические закономерности сохранения циркуляции вируса SARS-CoV-2 в человеческой популяции

Кустова Д.Д.^{1,2}, Почтовый А.А.^{1-3✉}, Шпакова О.Г.⁴, Штинова И.А.⁴, Кузнецова Н.А.¹, Клейменов Д.А.¹, Комаров А.Г.⁴, Гуштин В.А.¹⁻³¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;²Кафедра вирусологии, Биологический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119991, г. Москва, Россия;³Кафедра медицинской генетики, Институт клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119435, г. Москва, Россия;⁴Департамент здравоохранения Москвы, 127006, г. Москва, Россия

Резюме

Введение. Вирус SARS-CoV-2, являющийся возбудителем COVID-19, циркулирует в человеческой популяции 4 года. При этом уже к концу 2-го года не осталось иммунологически наивных лиц в результате активной иммунизации населения вакцинами и естественного контакта с вирусом. Понимание закономерностей, способствующих сохранению вируса в человеческой популяции, позволит лучше прогнозировать эпидемический потенциал COVID-19 и своевременно адаптировать средства противодействия продолжающейся пандемии.

Целью данной работы являлось описание выявленных молекулярно-биологических закономерностей, способствующих сохранению вируса в человеческой популяции.

Материалы и методы. В течение более 3 лет с начала пандемии COVID-19 проводили молекулярно-генетический мониторинг SARS-CoV-2, включавший в себя сбор назофарингеальных мазков от инфицированных, оценку вирусной нагрузки и последующее полногеномное секвенирование.

Результаты. Был установлен профиль доминирующих генетических линий на фоне роста заболеваемости и его изменение на протяжении всего периода мониторинга. Дополнительно изучен состав аминокислотных замен в различных белках SARS-CoV-2 и уровень вирусной нагрузки в составе мазков у последовательно сменявшихся вариантов возбудителя COVID-19. Предложена модель сохранения вируса в человеческой популяции, в рамках которой вирус способен: 1) к периодической смене серотипа (падение вируснейтрализующей активности сывороток более чем в 10 раз); 2) к накоплению дополнительных точечных аминокислотных замен в составе RBD в пределах серотипа для частичного ухода от нейтрализующих антител (снижение вируснейтрализующей активности в 2–3 раза) и повышения сродства к рецептору; 3) к постепенному увеличению количества выделяемого вируса на слизистых оболочках в пределах одного серотипа.

Заключение. Предложенная модель в существенной степени объясняет динамику заболеваемости COVID-19 в Москве. Для более полной характеристики наблюдаемой динамики необходимо получение популяционных данных о динамике напряженности иммунитета и нейтрализующей способности антител в отношении актуального состава генетических линий.

Ключевые слова: SARS-CoV-2; VOCs; генетика; мутация; вирусная нагрузка

Для цитирования: Кустова Д.Д., Почтовый А.А., Шпакова О.Г., Штинова И.А., Кузнецова Н.А., Клейменов Д.А., Комаров А.Г., Гуштин В.А. Молекулярно-биологические закономерности сохранения циркуляции вируса SARS-CoV-2 в человеческой популяции. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(4): 329–340. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-242> EDN: <https://elibrary.ru/uxnluj>

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства здравоохранения РФ в рамках реализации Государственного задания № 123031400022-0 «Изучение изменчивости SARS-CoV-2 в контексте биологических рисков снижения эффективности применяемых средств терапии и профилактики в ходе пандемии COVID-19».

Благодарности. Мы благодарны всем лабораториям, предоставляющим данные GISAID, за доступ к данным секвенирования SARS-CoV-2. Мы благодарны А.А. Захаровой и Т.А. Ремизову за техническую помощь в реализации проекта.

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 НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (Протокол № 14 от 29 сентября 2021 г.).

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-242>

The Molecular and Biological Patterns Underlying Sustained SARS-CoV-2 Circulation in the Human Population

Daria D. Kustova^{1,2}, Andrei A. Pochtovyi^{1-3✉}, Olga G. Shpakova⁴, Irina A. Shtinova⁴, Nadezhda A. Kuznetsova¹, Denis A. Kleimenov¹, Andrey G. Komarov⁴, Vladimir A. Gushchin¹⁻³

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

²Department of Virology, Faculty of Biology, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russia;

³Department of Medical Genetics, N.V. Sklifosovskiy Institute of Clinical Medicine Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 119435, Moscow, Russia;

⁴Moscow Healthcare Department, 127006, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. For four years, SARS-CoV-2, the etiological agent of COVID-19, has been circulating among humans. By the end of the second year, an absence of immunologically naive individuals was observed, attributable to extensive immunization efforts and natural viral exposure. This study focuses on delineating the molecular and biological patterns that facilitate the persistence of SARS-CoV-2, thereby informing predictions on the epidemiological trajectory of COVID-19 toward refining pandemic countermeasures.

The aim of this study was to describe the molecular biological patterns identified that contribute to the persistence of the virus in the human population.

Materials and methods. For over three years since the beginning of the COVID-19 pandemic, molecular genetic monitoring of SARS-CoV-2 has been conducted, which included the collection of nasopharyngeal swabs from infected individuals, assessment of viral load, and subsequent whole-genome sequencing.

Results. We discerned dominant genetic lineages correlated with rising disease incidence. We scrutinized amino acid substitutions across SARS-CoV-2 proteins and quantified viral loads in swab samples from patients with emerging COVID-19 variants. Our findings suggest a model of viral persistence characterized by 1) periodic serotype shifts causing substantial diminutions in serum virus-neutralizing activity (> 10-fold), 2) serotype-specific accrual of point mutations in the receptor-binding domain (RBD) to modestly circumvent neutralizing antibodies and enhance receptor affinity, and 3) a gradually increasing amount of virus being shed in mucosal surfaces within a single serotype.

Conclusion. This model aptly accounts for the dynamics of COVID-19 incidence in Moscow. For a comprehensive understanding of these dynamics, acquiring population-level data on immune tension and antibody neutralization relative to genetic lineage compositions is essential.

Keywords: SARS-CoV-2; VOCs; Genetic; Mutation; Viral load

For citation: Kustova D.D., Pochtovyi A.A., Shpakova O.G., Shtinova I.A., Kuznetsova N.A., Kleimenov D.A., Komarov A.G., Gushchin V.A. The Molecular and Biological Patterns Underlying Sustained SARS-CoV-2 Circulation in the Human Population. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(4): 329–340. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-242> EDN: <https://elibrary.ru/uxnluj>

Funding. The study was funded by the Ministry of Health of the Russian Federation (Project No. 123031400022-0, titled Investigation of SARS-CoV-2 variability in relation to the biological risks associated with the reduced efficacy of therapy and prevention used during the COVID-19 pandemic).

Acknowledgement. We are grateful to all GISAID submitted and originating laboratories for access to SARS-CoV-2 sequencing data. We are grateful to Anastasia A. Zakharova and Timofey A. Remizov for their technical assistance in the implementation of the project.

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 National Research Centre for Epidemiology and Microbiology Named after Honorary Academician N.F. Gamaleya (Protocol No. 14 dated 29 September 2021).

Введение

Пандемия COVID-19 была вызвана обнаруженным в конце 2019 г. новым вирусом SARS-CoV-2 и стала причиной более 774 млн случаев заболевания и более 7 млн смертей по всему миру [1]. Наблюдаемая эволюция SARS-CoV-2 привела к независимому появлению ряда генетических линий, выделяемых

Всемирной организацией здравоохранения в определенные периоды как варианты, вызывающие озабоченность (variants of concern, VOC), – Альфа, Бета, Гамма, Эпсилон, Дельта и Омикрон [2], которые были связаны с подъемами заболеваемости и смертности в большинстве стран. Несмотря на оперативную разработку и внедрение эффективных профилак-

ческих препаратов, по итогам первого года пандемии [3–6], в связи с появлением первых VOC, стали появляться сообщения о снижении эффективности вакцинации [7–9]. Это стало основанием для введения бустерных доз [10, 11]. В случае варианта Омикрон эффективность снизилась настолько, что пришлось вводить бустерные дозы с измененным составом [12–15]. Однако в случае относительно недавно возникшего варианта ХВВ даже с применением обновленного двухвалентного бустера, а затем моновалентной вакцины, содержащей антиген ХВВ, наблюдается снижение нейтрализации [8]. Кроме того, на данный момент накоплен большой объем информации о влиянии характерных для доминирующих вариантов мутаций на эффективность терапевтических препаратов, включающих в себя моноклональные антитела и противовирусные средства [16–18], что привело к потере эффективности большинства моноклональных антител (monoclonal antibodies, mAbs) в отношении актуально циркулирующих вариантов [19–21]. Появлению нового варианта вируса предшествовало возникновение мутаций, что в свою очередь сказывалось на изменении трансмиссивности и/или патогенности вируса, чувствительности к терапевтическим препаратам и способности уклоняться от естественного или вакциноиндуцированного иммунитета. Стоит отметить, что такие показатели, как трансмиссивность и/или патогенность вируса, неразрывно связаны с величиной вирусной нагрузки. Как обсуждалось ранее [22], хозяин (роль вакцинации или предшествующей инфекции) и вирусные факторы (варианты SARS-CoV-2) значимо влияют на динамику вирусной нагрузки и, следовательно, дополнительно влияют на передачу вируса. Несмотря на накопленные данные о значениях некоторых мутаций и связанных с ними фенотипических признаках [22], остаются не до конца изучены факторы, оказывающие влияние на динамику эпидемиологического процесса в разные периоды.

В основе настоящего исследования лежат результаты проводимого с конца 2020 г. молекулярно-генетического мониторинга вариантов вируса SARS-CoV-2, часть из которых была ранее опубликована [23]. В данной работе была проведена оценка как динамики циркулирующих вариантов, так и потенциального влияния мутаций и вирусной нагрузки как основных факторов, способствующих изменению профиля циркулирующих линий, что может отражаться в наблюдаемом переходе «увеличение мутаций → увеличение вирусной нагрузки → появление нового серотипа».

Материалы и методы

В период появления варианта Дельта назофарингеальные мазки собирали регулярно у разных групп добровольцев, включая тех, кто был первично инфицирован или вакцинирован. От всех пациентов было получено письменное согласие в соответствии с приказом Минздрава России от 21 июля 2015 г. № 474н «О порядке дачи информированного добро-

вольного согласия на оказание медицинской помощи в рамках клинической апробации методов профилактики, диагностики, лечения и реабилитации, формах информированного добровольного согласия на оказание медицинской помощи в рамках клинической апробации методов профилактики, диагностики, лечения и реабилитации и отказа от медицинской помощи в рамках клинической апробации методов профилактики, диагностики, лечения и реабилитации». Все образцы были деперсонифицированы до их получения исследовательской группой. Исследование одобрено локальным этическим комитетом НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 14, 29 сентября 2021 г.).

Сбор образцов и оценку вирусной нагрузки выполняли в двух лабораториях (далее Лаборатория 1 и Лаборатория 2). В период циркуляции вариантов Ухань, Дельта и Омикрон (BA.1.X and BA.2.X) (Лаборатория 1) мазки из носоглотки собирали в среду для транспортировки вирусов (G00155, ГЕМ, Россия). Тотальную РНК выделяли с помощью набора QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Германия) и набора для выделения тотальной РНК из клеток животных и бактерий, мазков и вирусов на колонках (RU-250, «Биолабмикс», Новосибирск, Россия). Количественную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с обратной транскрипцией проводили с использованием набора для RT-PCR SARS-CoV-2 FRT (EA-128, НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Москва, Россия). Образцы со значениями Ct < 30 были отобраны для полногеномного секвенирования.

В Лаборатории 2 мазки из носоглотки собирали в транспортную среду для вирусов (физиологический раствор или транспортная среда ХК-PCR30 (Jiangsu Xinkang Medical Instrument Co., Ltd., Китай)) или транспортную среду ГЕМ (ГЕМ, Москва, Россия). В период циркуляции вариантов Омикрон BA.1.X, BA.2.X, BA.5.X количественную ПЦР с обратной транскрипцией проводили с использованием набора AmpliPrime SARS-CoV-2 DUO (NextBio, Москва, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. В период циркуляции вариантов Омикрон BA.5.X, CL.X, ХВВ.1.X и ХВВ.1.9.X количественную ПЦР с обратной транскрипцией осуществляли с использованием CoV-2 test (TestGen, Ульяновск, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Дальнейшее полногеномное секвенирование выполняли с использованием технологий Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, США), Illumina (Illumina, США) и Oxford Nanopore (Oxford, Великобритания). Процедуры подготовки и анализа образцов были подробно описаны ранее [21, 23]. Полученные в ходе настоящего исследования полногеномные последовательности были загружены в базу данных GISAID под следующими номерами: EPI_ISL_1710849-1710866, EPI_ISL_2296111-2296286, EPI_ISL_2296288-2296379, EPI_ISL_4572812, EPI_ISL_5334362-5334371, EPI_ISL_5334374-5334389, EPI_ISL_7211325-7211326, EPI_ISL_7263932-7263933, EPI_ISL_9230058-9230062, EPI_ISL_9230064-9230100, EPI_ISL_10627062, EPI_ISL_11864996-

11865125, EPI_ISL_11872910, EPI_ISL_421275, EPI_ISL_454732, EPI_ISL_470896-470904, EPI_ISL_572398, EPI_ISL_872628-872643, EPI_ISL_875515, EPI_ISL_1015362, EPI_ISL_1708507-1708509, EPI_ISL_12225322, EPI_ISL_12748381-12748382, EPI_ISL_13431664-13431687, EPI_ISL_14217225-14217226, EPI_ISL_15327072-15327075, EPI_ISL_15858138-15859137, EPI_ISL_15860713-15860737, EPI_ISL_15860739-15860839, EPI_ISL_15860841-15860991, EPI_ISL_15860993-15861048, EPI_ISL_15862338-15863336, EPI_ISL_15863677-15864655, EPI_ISL_15864802-15865776, EPI_ISL_15865821-15866801, EPI_ISL_15867150-15868141, EPI_ISL_15868158-15869145, EPI_ISL_15869218-15870209, EPI_ISL_15871156-15872140, EPI_ISL_15872157-15873150, EPI_ISL_15873159-15874146, EPI_ISL_15874159-15875146, EPI_ISL_15875638-15876623, EPI_ISL_15876640-15877626, EPI_ISL_15879747-15880730, EPI_ISL_15883551-15884536, EPI_ISL_15884833-15885823, EPI_ISL_15885995-15886980. Также полученные последовательности были загружены в базу данных VGARus.

Информация о циркуляции генетических линий, использованная в настоящем исследовании, была дополнена данными, полученными из базы данных GISAID. Полученные данные были отфильтрованы по следующим параметрам: Host == «Human», 'Sequence length' >= 27000, 'Is complete?' == "TRUE" и Location == "Europe/Russia/Moscow/Moscow" или "Europe/Russia/Moscow" (дата запроса 18 сентября 2023 г.). Дополнительно полученные последовательности также были отфильтрованы по дате сбора ('Collection date' < «2023-06-01»), в результате чего была получена 16 541 запись.

Информация о генетических вариантах для оставшихся последовательностей была сгруппирована следующим образом: Ухань/Wuhan (B.1 + B.1.X), Альфа/Alpha (B.1.1.7 + Q.X), Бета/Beta (B.1.351), Дельта/Delta (B.1.617.X + AY.X), BA.1.X (B.1.1.529 + BA.1.X), BA.2.X, BA.5.X (BA.5.X + BF.X + BE.X), CL.X, XBB.1.X (без XBB.1.9.X и XBB.1.16.X), XBB.1.9.X, XBB.1.16.X (XBB.1.16.X + FU.X) и «Другие XBB»/«Other XBB» (Другие линии XBB + EG.X). Кроме того, были добавлены генетические линии B.1.1.317 и B.1.1.523. Остальные линии были объединены в группу «Другие»/«Other». Полученные данные были объединены с метаданными и визуализированы в среде R при помощи пакетов dplyr v. 1.1.1 [24] и ggplot2 v. 3.4.2 [25].

Для сравнения более двух независимых групп был использован тест Краскела–Уоллиса. Если результаты были статистически значимыми, применяли тест Данна для определения различия групп. Сравнение значений порогового цикла ПЦР проводили среди образцов, где был использован одинаковый набор для количественной ПЦР с обратной транскрипцией. Для статистического анализа был использован пакет ggstatsplot v. 0.12.1 [26] и R v. 4.2.2.

Результаты

Динамика генетических вариантов SARS-CoV-2 в Москве с начала пандемии COVID-19

С начала распространения SARS-CoV-2 в Москве и до февраля 2021 г. основным доминирующим вариантом являлся Ухань (B.1.X), причем среди множества входящих в него генетических линий была отмечена циркуляция характерной преимущественно для России генетической линии B.1.1.317. Зимой 2021 г. ранее циркулировавшие варианты начали постепенно замещаться линиями Альфа (B.1.1.7 + Q*) и B.1.1.523 (также характерной в основном для России), которые в мае 2021 г. вместе с очередным подъемом заболеваемости COVID-19 были вытеснены вариантом Дельта (B.1.617.2 + AY*). В конце 2021 г. на смену варианту Дельта приходит Омикрон (B.1.1.529), и далее наблюдалась последовательная смена генетических линий BA.1.X, BA.2.X и BA.5.X. В октябре 2022 г. одним из доминирующих вариантов становится CL.X, столь широкое распространение которого не было зарегистрировано в других странах. Наряду с CL.X в ноябре 2022 г. в Москве начал циркулировать рекомбинантный вариант XBB, впоследствии вытеснивший остальные генетические линии SARS-CoV-2 (рис. 1 а).

Разные варианты вируса, получавшие относительно широкое распространение, обладали характерным профилем мутаций. Рассмотрение общего их количества в S-белке и других генах показало, что до появления варианта Омикрон происходило постепенное их увеличение; распространение последнего же характеризовалось более чем двукратным увеличением числа несинонимичных мутаций в геноме SARS-CoV-2 (рис. 1 б). Далее в вирусе также продолжили появляться замены, однако из общего ряда «выпадает» первый вариант Омикрона, BA.1.X, характеризующийся 34 мутациями в S-белке, что на 3 больше, чем у последующего BA.2.X, и сопоставимо с BA.5.X. Несмотря на этот факт, общее число мутаций в геноме SARS-CoV-2 варианта BA.1.X было наименьшим среди всех остальных линий Омикрона и составило 60, тогда как последний рассматриваемый вариант, XBB.1.9.X, имел около 80 аминокислотных замен, из которых 41 находилась в S-белке.

Профиль мутаций в основных генетических вариантах SARS-CoV-2

Подробное рассмотрение мутаций в выбранных вариантах выявило характерный профиль мутаций для циркулировавших в Москве вариантов SARS-CoV-2. В RBD S-белка для Альфа отмечалась мутация N501Y, для B.1.1.523 – E484K и S494P. Для Дельта были характерны две аминокислотные замены (L452R и T478K) в RBD S-белка, для BA.1.X – 13, причем также наблюдалось появление в относящихся к данному варианту Омикрона некоторых генетических линиях мутаций K417N, N440K и G446S. Для варианта BA.2.X было характерно 16 мутаций в RBD, где общими с BA.1.X являлись лишь 10 из них: далее у доминирующих вариантов не отмечались мутации R346K и S371L, при-

существовавшие у BA.1.X, и, кроме того, появился ряд дополнительных замен S371F, T376A, D405N, R408S, K417N и N440K. У вариантов BA.5.X и CL.X появилась мутация L452R, характерная для линии Дельта, и F486V, причем для всех в дальнейшем циркулировавших вариантов были также характерны аминокислотные замены в положении 486. С конца 2022 г. в Москве доминирующей генетической линией стала XBB и ее подварианты (рис. 1) с характерными минимумом 22 аминокислотными мутациями в RBD, причем из них 6 не встречались в ранее циркулировавших вариантах (рис. 2). Весной 2023 г. основным циркулирующим вариантом являлся XBB.1.9.X, а именно XBB.1.9.1, для которого характерна замена F486P (рис. 2).

В N-концевом домене (NTD) S-белка наблюдалось большое разнообразие аминокислотных замен. Генетическая линия B.1.1.523 характеризовалась наличием мутации F306L. Генетические линии, относящиеся к варианту Дельта, имели мутации, которые впоследствии не встречались у других вариантов: T19R, E156G, F157del, R158del, и одну мутацию G142D, характерную для всех вариантов линии Омикрон, кроме BA.1.X. В целом большинство мутаций BA.1.X были нехарактерны для последующих вариантов Омикрона за исключением делеций 69–70, которые присутствовали также у BA.5.X и CL.X. CL.X, по сравнению с BA.5.X и другими вариантами Омикрона, обладал аминокислотной заменой K150E, в остальном же варианты BA.2.X, BA.5.X и CL.X имели сходный профиль мутаций. Для вариантов XBB были характерны мутации V83A, H146Q, Q183E и V213E, ранее не встречавшиеся у других генетических линий. В С-концевом

тической линии B.1.1.523 характеризовалась наличием мутации F306L. Генетические линии, относящиеся к варианту Дельта, имели мутации, которые впоследствии не встречались у других вариантов: T19R, E156G, F157del, R158del, и одну мутацию G142D, характерную для всех вариантов линии Омикрон, кроме BA.1.X. В целом большинство мутаций BA.1.X были нехарактерны для последующих вариантов Омикрона за исключением делеций 69–70, которые присутствовали также у BA.5.X и CL.X. CL.X, по сравнению с BA.5.X и другими вариантами Омикрона, обладал аминокислотной заменой K150E, в остальном же варианты BA.2.X, BA.5.X и CL.X имели сходный профиль мутаций. Для вариантов XBB были характерны мутации V83A, H146Q, Q183E и V213E, ранее не встречавшиеся у других генетических линий. В С-концевом

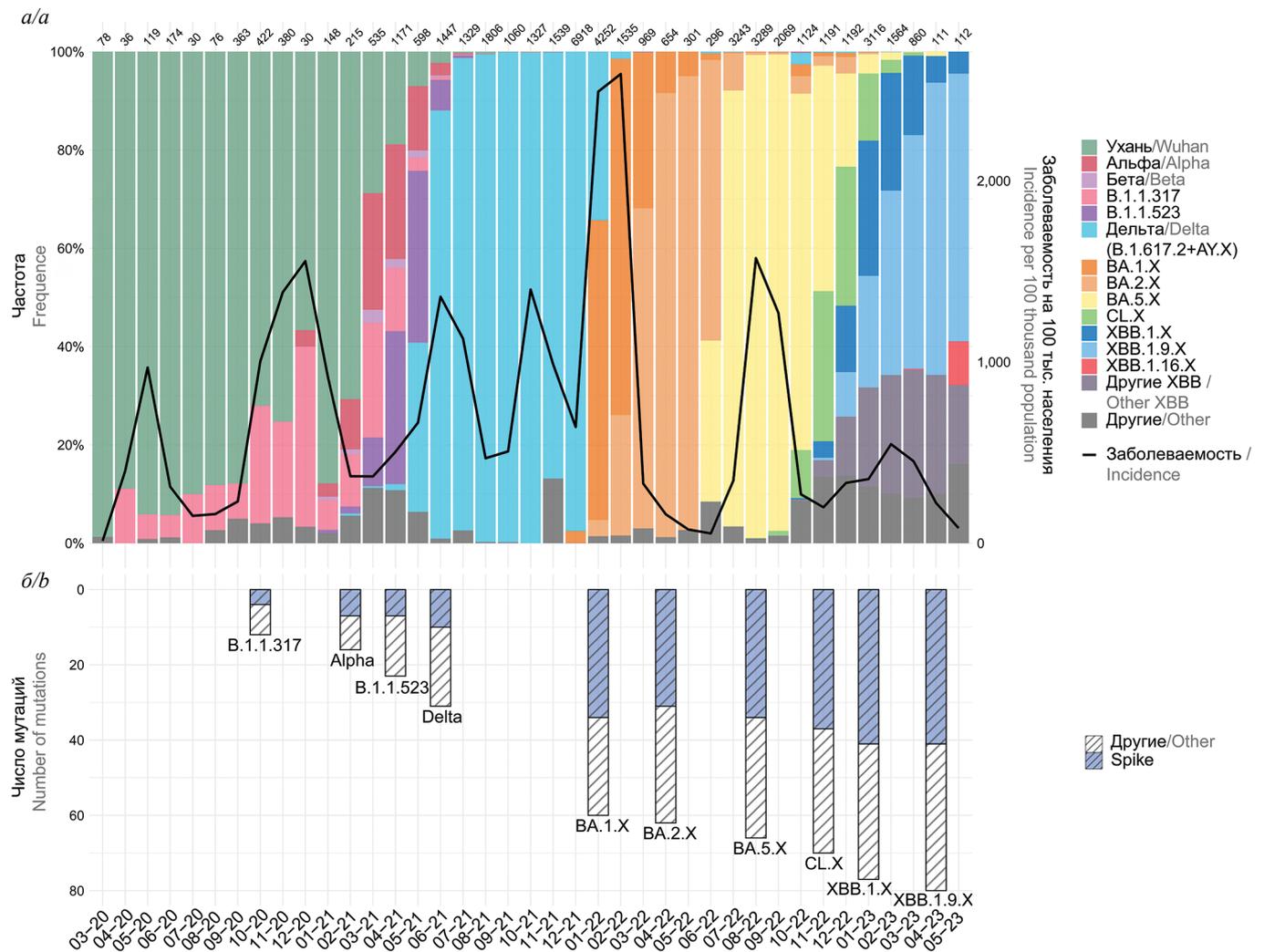


Рис. 1. Генетические варианты SARS-CoV-2, циркулировавшие в Москве с начала пандемии COVID-19.

a – динамика генетических вариантов SARS-CoV-2. Слева по оси ординат показана доля генетических линий, справа – число новых случаев COVID-19 на 100 тыс. населения; *b* – изменение количества мутаций в основных циркулировавших вариантах SARS-CoV-2. По оси ординат показано количество мутаций. На оси абсцисс отражены периоды (месяцы).

Fig. 1. Genetic variants of SARS-CoV-2 circulating in Moscow since the start of the COVID-19 pandemic.

a – dynamics of genetic variants of SARS-CoV-2 circulating in Moscow. The left Y-axis indicates the proportion of genetic lineages, while the right axis represents the number of new COVID-19 cases per 100,000 population; *b* – changes in the number of mutations in the predominant circulating variants of SARS-CoV-2. The ordinate axis displays the mutation count. The periods (months) are indicated on the abscissa axis.

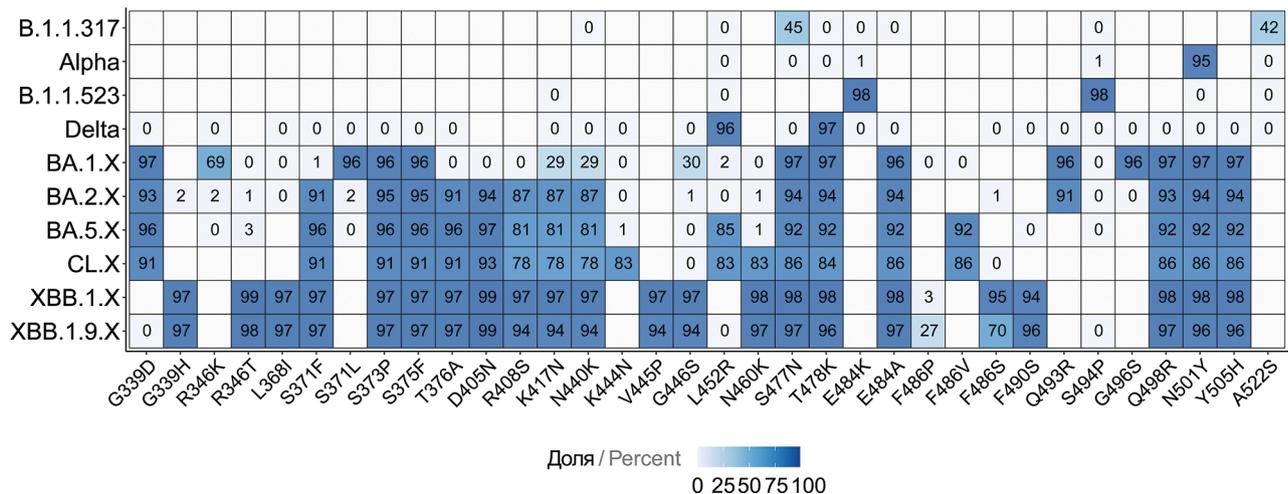


Рис. 2. Мутации в RBD Spike-белка основных доминировавших вариантов SARS-CoV-2.

По оси ординат отражены варианты SARS-CoV-2, по оси абсцисс – аминокислотные замены. Нулевые значения отражают долю мутаций, стремящуюся к нулю; пустые ячейки – отсутствие мутаций в данной позиции.

Fig. 2. Mutations in the RBD of the spike protein of the predominant SARS-CoV-2 variants.

The Y-axis represents SARS-CoV-2 variants, and the X-axis represents amino acid substitutions. Zero values reflect the proportion of mutations tending to zero; empty cells represent the absence of mutations at a specific position.

домене (CTD) у всех вариантов имела место замена D614G, как известно, закрепившаяся еще до разделения генетических линий SARS-CoV-2 на VOC [27]. Для Альфа наибольшее количество аминокислотных мутаций наблюдалось именно в области CTD: P681H, T716I, S982A и D1118H, не считая D614G. Для B.1.1.523 было характерно наличие D839V и T1027I, далее не отмечавшееся в других вариантах. У Дельта в CTD было лишь 2 замены помимо D614G: P681R около фуринового сайта и D950N. Далее BA.1.X обладал наибольшим количеством мутаций в этой области по сравнению с остальными вариантами Омикрона: помимо характерных H655Y, N679K, N681H, N764K, D796Y, Q954H, N969K у первого варианта Омикрона были дополнительные T547K, N856K и L981F. В целом дальнейшая эволюция NTD Омикрон практически не была отмечена, однако у CL.X и XBB.1.X в небольшом проценте случаев (29 и 12 соответственно) наблюдалась замена T883I (рис. S3 а).

В неструктурных генах частота возникновения мутаций была значительно ниже, чем в S-белке. Для варианта Дельта было характерно около 16 мутаций в неструктурных генах, причем мутации T492I в NSP4 и P323L в RdRp (NSP12) были также характерны для всех последующих вариантов Омикрона, а G671S в том же гене – для генетических линий XBB. Остальные же мутации далее не встречались. Первый вариант Омикрона, BA.1.X, обладал аминокислотными заменами NSP3_K38R, NSP3_L1266I, NSP3_A1892T, NSP6_I189V и делециями NSP3_S1265del и NSP6_L105del, далее не встречавшимися у вариантов Омикрона, а также рядом других характерных для Омикрона мутаций: NS9b_P10S, NS9b_E27-29del, NSP4_T492I, NSP5_P132H, NSP6_S106-107del и NSP14_I42V. Все последующие варианты Омикрона по сравнению с BA.1.X обладали мутациями NS3a_T223I, NSP1_S135R, NSP3_T24I, NSP3_G489S,

NSP4_L264F, NSP4_T327I, NSP6_F108del, NSP13_R392C, NSP15_T112I. Отличительной особенностью BA.2.X и XBB были аминокислотные замены в NS6 – D61L и NSP4 – L438F. Для BA.5.X характерны дополнительные мутации NS9b_D16G и NSP13_T127N, не встречавшиеся у других вариантов. CL.X, хоть и являясь подлинией BA.5.X, не обладал данными заменами, однако характеризовался наличием NS8_F41C и NSP13_N102S. Варианты XBB, помимо перечисленных мутаций, обладали стоп-кодоном в 8-м положении NS8 и NSP1_K47R, а XBB.1.9.X – NS9b_I5T, NSP3_G1001S, NSP9_T35I и в небольшом проценте случаев – NSP2_D449E (рис. S3 в).

Что касается других структурных генов SARS-CoV-2, то для варианта Дельта не были характерны мутации в E-белке, однако наблюдались замены в матричном белке (M_I82T) и нуклеокапсидном (N_D63G, N_R203M, N_G215C, N_D377Y), причем, как и в случае с большинством остальных аминокислотных замен, они не встречались у Омикрона. Для всех вариантов Омикрона, циркулировавших в Москве, были характерны следующие мутации: E_T9I, M_Q19E, M_A63T, N_P13L, N_E31-33del, N_R203K, N_G204R, однако некоторые генетические линии имели свои особенности. Так, BA.1.X нес дополнительную к перечисленным мутацию M_D3G, вариант BA.2.X и все остальные рассматриваемые варианты Омикрона – N_S413R, BA.5.X и CL.X – M_D3N. CL.X также обладал заменой N_A218S, а все XBB – E_T11A (рис. S3 б).

Динамика вирусной нагрузки основных циркулировавших вариантов

Сравнительный анализ вирусной нагрузки (эквивалент – пороговый цикл ПЦР, Ct) показал, что среди вариантов Ухань (B.1.X), Дельта (B.1.617.2 + AY.X) и первых вариантов Омикрона (BA.1/BA.2) наибольшая вирусная нагрузка была характерна для вариан-

та Дельта с медианным значением 23,85 ($p < 0,0001$, **рис. 3 а**). Таким образом, наблюдалось увеличение вирусной нагрузки при замещении варианта Ухань генетическими линиями, относящихся к варианту Дельта (в пределах одного «серотипа»). Первые варианты Омикрона характеризовались сниженной по сравнению с Дельта вирусной нагрузкой (медиана 29,62, $p < 0,0001$), причем далее также наблюдалось статистически достоверное небольшое повышение значений St для вариантов ВА.2.X и ВА.5.X по сравнению с ВА.1.X (**рис. 3 б**). Статистически значимых различий между ВА.2.X и ВА.5.X обнаружено не было. Для варианта CL.X было характерно сниженное по сравнению с ВА.5.X значение St с медианными значениями 35,13 и 27,27 соответственно ($p < 0,0001$, **рис. 3 в**). Кроме того, у вариантов вируса CL с дополнительной мутацией T883I наблюдалась более высокая вирусная нагрузка по сравнению с вариантами без данной мутации ($p = 0,001$, **рис. S1**), однако на вирусную нагрузку ХВВ.1.X наличие данной мутации не влияло (**рис. S1**). Была отмечена тенденция к увеличению вирусной нагрузки у последовательно сменяющихся вариантов ВА.5.X, CL.X, ХВВ.1.X и ХВВ.1.9.X, где наибольшая вирусная нагрузка была характерна для ХВВ.1.9.X ($p < 0,01$, **рис. 3 в**).

Обсуждение

На протяжении более 4 лет пандемии COVID-19 был получен беспрецедентный объем данных, прежде всего геномных, которые используются как для понимания эволюции, так и для совершенствования профилактических и терапевтических препаратов. В течение данного периода появлялись варианты вируса с разными фенотипическими характеристиками, включая заразность, тяжесть заболевания и уклонение от иммунитета [28]. Комплексный анализ полученных данных о патогене SARS-CoV-2 позволяет понять основные механизмы (драйверы) эволюции и осознать процессы, порождающие это разнообразие, чтобы потенциально предсказать возможные будущие варианты вируса. В качестве основных драйверов продолжающейся пандемии нами были рассмотрены два ключевых аспекта – вирусная нагрузка и профиль мутаций в геноме вируса, что в целом характеризует наблюдаемый переход «увеличение мутаций → увеличение вирусной нагрузки → появление нового серотипа».

С начала пандемии в 2020 г. и до начала лета 2023 г. в Москве сменилось несколько генетических вариантов SARS-CoV-2, а именно Ухань (В.1.X), Дельта (В.1.617.2 + AY.X) и Омикрон. Внутри каждого из них в соответствующие периоды времени доминировали определенные генетические линии: в 2020 г. – В.1.1.317, в 2021 г. – В.1.1.523, Альфа (В.1.1.7 + Q.4) и AY.122 [29], в 2022 г. – линии ВА.1.X, ВА.2.X, ВА.5.X, CL.X, в 2023 г. – рекомбинант ХВВ с соответствующими подлиниями ХВВ.1.X и ХВВ.1.9.X (**рис. 1 а**). Закономерной особенностью стало последовательное увеличение числа несинонимичных мутаций в геноме циркулирующих вариантов SARS-CoV-2, около половины из которых находилось в S-белке (**рис. 1 б**).

Последующее подробное рассмотрение молекулярно-генетических свойств циркулировавших вариантов SARS-CoV-2, включавших профиль мутаций в геноме SARS-CoV-2 и вирусную нагрузку, позволило выявить определенные закономерности, которые могли обуславливать продолжающееся распространение новых вариантов возбудителя COVID-19 и вновь возникающие подъемы заболеваемости и госпитализаций в России и мире. Так, было обнаружено, что при переходе от вариантов В.1.X к Дельта (В.1.618.2 + AY.X) произошло снижение вирусной нагрузки на 7,7 цикла ПЦР, причем это явление было ранее также отмечено и в других исследованиях [30, 31]. Для данного варианта также был характерен ряд мутаций, в том числе и в рецептор-связывающем домене Spike-белка (**рис. 2**, **рис. S3**), которые потенциально могли обуславливать его повышенную вирусную нагрузку. В ранее проведенных исследованиях было показано, что наличие замены L452R в S-белке коррелирует с уклонением от нейтрализующих антител [32], повышенным родством к рецептору ACE2, а также увеличивает стабильность шипов и вирусную инфекционность, тем самым способствуя увеличению вирусной репликации [33]. Кроме того, мутации E156G, T478K и D614G также увеличивали инфекционность и сродство вируса к рецептору, а другие замены, такие как P681R и D950N, способствовали более высокой скорости распространения за счет более эффективного расщепления S1/S2 в фуриновом сайте [34, 35]. Помимо структурных белков, на распространение варианта Дельта и повышение его вирусной нагрузки соответственно также могли оказывать влияние и другие мутации. Например, было показано, что мутация T492I в NSP4 положительно влияла на репликацию вируса [36]. Варианты вируса с аминокислотной заменой P323L в гене RdRp *in vitro* обладали селективным преимуществом по сравнению с вариантами без нее, и, кроме того, наличие L323 и S671 было связано с более эффективной репликацией при пониженной температуре в верхних дыхательных путях [37]. Таким образом, дополнительные мутации, характерные для варианта Дельта, непосредственно могли обусловить высокую вирусную нагрузку, в результате чего ее повышенные значения по сравнению с первыми вариантами SARS-CoV-2 В.1.X могли определять более высокую скорость распространения данного варианта в сравнении с ранее циркулировавшими [23, 38, 39].

Первые варианты Омикрона, ВА.1/ВА.2.X, сменившие вариант Дельта, характеризовались, наоборот, сниженной вирусной нагрузкой при более высокой скорости распространения [40]. Стоит отметить, что Омикрон филогенетически расходится с ранее циркулировавшими вариантами и обладает более 15 заменами только в RBD (**рис. 2**), не считая мутаций в других генах (**рис. S3**). Кроме того, данный вариант серологически отличается от ранее циркулировавших, о чем свидетельствует ряд исследований. Если эффективность вакцинации против Дельта оставалась высокой [41] и большинство моноклональных антител нейтрализовали вирус [42], то в случае Омикрона наблюдалось снижение эффективности вакцинации и чувствительности к терапевтиче-

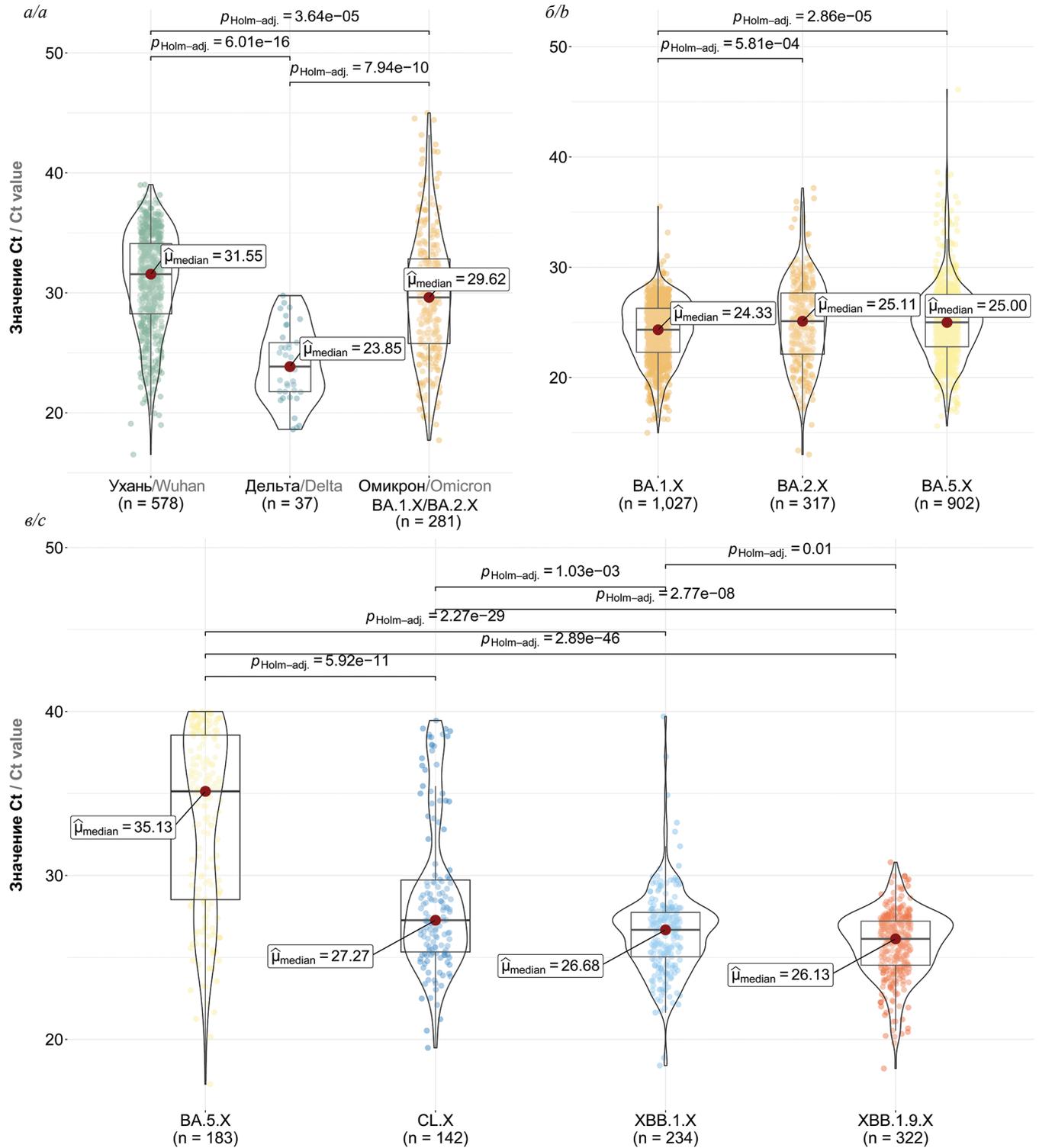


Рис. 3. Сравнение вирусной нагрузки основных доминировавших в Москве вариантов SARS-CoV-2.

a – вирусная нагрузка вариантов Ухань (B.1.X), Дельта (B.1.617.2 + AY.X) и Омикрон (BA.1/BA.2.X); *b* – вирусная нагрузка вариантов Омикрон BA.1.X, BA.2.X и BA.5.X; *c* – вирусная нагрузка вариантов BA.5.X, CL.X, XBB.1.X и XBB.1.9.X. По оси ординат отражены значения Ct, по оси абсцисс – варианты SARS-CoV-2 и количество образцов.

Fig. 3. Comparative analysis of viral load in predominant SARS-CoV-2 variants in Moscow.

a – viral load in Wuhan (B.1.X), Delta (B.1.617.2 + AY.X), and Omicron (BA.1/BA.2.X) variants; *b* – viral load in Omicron BA.1.X, BA.2.X, and BA.5.X variants; *c* – viral load in BA.5.X, CL.X, XBB.1.X, and XBB.1.9.X variants. The Y-axis denotes Ct values, while the X-axis represents SARS-CoV-2 variants and the number of samples.

ским и профилактическим препаратам [7, 8]. Таким образом, можно предположить, что Омикрон распространился активно на первых этапах не за счет повышенной вирусной нагрузки, а за счет того, что иммунная система ранее не сталкивалась с подобным серотипом вируса [43]. Помимо этого, приобретенные в ходе эволюции варианта Омикрон мутации в неструктурных белках (к примеру, 203K/204R в N-белке и Δ SGF/ Δ LSG в NSP6) и S-белке (N501Y и H655Y) также могли способствовать его широкому распространению ввиду высокой скорости репликации и более эффективной передачи вируса [44–47]. Кроме того, резкое увеличение числа мутаций в RBD может являться следствием их взаимного влияния, где появление одной замены влекло за собой появление другой, как в случае Q498R и N501Y, что также влияло на аффинность связывания ACE2 и инфекционность вируса соответственно [48]. Со второй половины 2022 г. доминирующим вариантом Омикрона в Москве становится ВА.5.Х, тем самым замещая ранее циркулировавший ВА.2.Х (рис. 1 а). Сравнительный анализ показал, что вирусная нагрузка генетических линий ВА.2.Х и ВА.5.Х статистически достоверно отличается от ВА.1.Х с медианными значениями Ct 25,1, 25,0 и 24,3 соответственно при отсутствии значимых различий между ВА.2.Х и ВА.5.Х (рис. 3 б). Несмотря на то что полученные результаты частично расходятся с данными ранее проведенных исследований [49–52], они соответствуют динамике эпидемического процесса в Москве. Так, с появлением варианта Омикрона, ВА.1.Х, наблюдалось повышение заболеваемости, тогда как ВА.2.Х вытеснил ВА.1.Х без сопутствующего увеличения числа новых случаев COVID-19 (рис. 1 а). Активное распространение ВА.5.Х совпало с очередным (6-м) подъемом заболеваемости, и, теоретически, это стало возможно не за счет повышения вирусной нагрузки, а благодаря появлению у данного варианта ряда несинонимичных замен, в частности, двух дополнительных мутаций в RBD L452R и F486V, причем первая аминокислотная замена была также характерна и для варианта Дельта (рис. 2). Было показано, что за счет данных мутаций наблюдается уклонение от нейтрализующих антител, сформированных после ранее перенесенной инфекции первыми вариантами Омикрона и вакцинацией [53, 54]. Кроме того, у ВА.5.Х по сравнению с ВА.1/2.Х появляются несинонимичные замены в генах *ORF9b* (D16G) и *NSP13* (T127N), которые могут способствовать распространению вируса благодаря уклонению от иммунной системы хозяина [55]. Соответственно, от варианта Дельта к ВА.1.Х и ВА.5.Х последовательно происходило накопление влияющих на способность ускользать от иммунитета и более эффективно проникать в клетку мутаций, что позволило данным вариантам стать причиной нескольких волн заболеваемости без соответствующего повышения вирусной нагрузки.

Ближе к концу 2022 г. в Москве одним из основных вариантов становится CL.Х, являющийся подлинией ВА.5.1.29 [56]. Данный вариант был распространен преимущественно в России и характеризовался рядом дополнительных по сравнению с родительской линией мутаций. К числу таких мутаций относятся K444N

и K150E в S-белке, A218S в белке нуклеокапсида, F41C в *ORF8* и N102S в *NSP13* (рис. S3). Наряду с появлением перечисленных мутаций наблюдалось повышение вирусной нагрузки, что может свидетельствовать о положительном влиянии данных аминокислотных замен на репликацию CL.Х. Однако в общей популяции вируса варианта Омикрон эти мутации не были широко распространены: их доля составляла от 0,05% (для NS8_F41C) до 0,3% (для Spike_K444N) по данным GISAID на 7 сентября 2023 г. [57]. Благодаря мутации в RBD вирус теоретически мог избегать нейтрализующих антител [58], что могло способствовать его репликации; кроме того, они потенциально могли влиять на ORF8 и его роль в эпигенетической регуляции [59] или хеликазную активность NSP13 [60]. Подробное рассмотрение генетической структуры данной линии позволило также выявить мутацию T883I, появившуюся одновременно с началом циркуляции CL и присутствующую в около 29% всех собранных образцов, относящихся к линии CL (рис. S3 а). Присутствие T883I было связано с более высокой ВН по сравнению с вариантом без замены (рис. S1 а), а доля варианта CL.1.2, для которого характерна данная мутация, начала увеличиваться с интродукцией ХВВ (рис. S2). Кроме того, в около 12% случаев T883I встречалась и в ХВВ.1.Х, и также доля данной мутации начала возрастать параллельно с началом циркуляции ХВВ.1.9.Х (рис. S2), однако схожего эффекта в виде повышения вирусной нагрузки для ХВВ.1.Х + T883I по сравнению с вариантом без замены не наблюдалось (рис. S1 б). Таким образом, само присутствие данной мутации не способствовало повышению вирусной нагрузки, однако, возможно, что комбинация мутаций в S-белке CL.Х, включающая T883I, могла положительно влиять на распространение вируса, однако ее доля в популяции была все-таки недостаточна.

Для последних доминирующих вариантов, ХВВ.1.Х и ХВВ.1.9.Х, также наблюдалось последовательное повышение вирусной нагрузки наряду с появлением ряда дополнительных аминокислотных замен как в Spike, так и в других белках. ХВВ является рекомбинантом BJ.1 (подвариант ВА.2.10) и BM.1.1.1 (подвариант ВА.2.75) с точкой рекомбинации в S1 S-белка в районе 445–460 аминокислотных позиций [61]. Здесь наблюдается первый случай среди всех ранее доминировавших вариантов SARS-CoV-2 приспособления вируса за счет рекомбинации. Было показано, что благодаря приобретенным мутациям V83A, R346T, L368I и N460K в S-белке отмечается повышенная аффинность связывания hACE2, фузогенность и инфекционность вируса варианта ХВВ [62]. Эти данные согласуются с полученными результатами и объясняют повышенную вирусную нагрузку ХВВ.1.Х по сравнению с ВА.5.Х и CL.Х. Однако, в соответствии с ранее проведенными исследованиями, наличие стоп-кодона в начале гена *ORF8* должно было отрицательно влиять на вирусную репликацию с соответствующим уменьшением вирусных копий [59], однако по нашим результатам наблюдается противоположный эффект. Возможно, присутствие ряда других замен в неструк-

турных генах (рис. S3) компенсирует отсутствие полноценного NS8. Увеличенная вирусная нагрузка варианта ХВВ.1.9.X по сравнению с ранее циркулировавшим ХВВ.1.X (рис. 1, рис. 3 в), возможно, была связана с заменами F486P в S-белке, присутствующими в примерно 27% случаев, NSP3_G1001S, NSP9_T35I, NS9b_I5T. Наличие F486P было характерно преимущественно для варианта ХВВ.1.5, быстро распространившегося в ряде стран ввиду повышенной трансмиссивности [63] и, в соответствии с ранее проведенными исследованиями, присутствие данной замены коррелировало с повышенным сродством к hACE2 [64].

Заключение

Молекулярно-генетический мониторинг вариантов SARS-CoV-2 в Москве с начала пандемии позволил не только охарактеризовать профиль основных генетических линий вируса, но также выявить ряд закономерностей, которые могли обусловить продолжающееся распространение новых вариантов вируса. Так, смена генетических вариантов SARS-CoV-2 в Москве на протяжении более 3 лет с начала пандемии сопровождалась постепенным возрастанием числа мутаций, где резкое их увеличение было характерно для варианта Омикрон, возникшего в конце 2021 г. Кроме того, для ряда последовательно сменявшихся вариантов, к примеру, от Ухань к Дельта или от BA.5.X к ХВВ.1.9.X, наблюдалось закономерное повышение вирусной нагрузки наряду с появлением новых аминокислотных замен как в Spike-белке, так и в неструктурных белках. В остальных случаях, когда не отмечалась данная тенденция, происходило накопление ряда мутаций, способствующих уклонению от ранее сформированного иммунитета и повышению инфекционности вируса, что определяло его дальнейшее распространение. Эти результаты могут быть использованы для моделирования и предсказания будущих вариантов, так как наглядно демонстрируют наблюдаемый переход «увеличение мутаций → увеличение вирусной нагрузки → появление нового серотипа».

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. COVID-19 epidemiological update – 12 April 2024. Available at: <https://who.int/publications/m/item/covid-19-epidemiological-update-edition-166>
2. CDC: SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>
3. Polack F.P., Thomas S.J., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., et al. Safety and efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(27): 2603–15. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>
4. Baden L.R., El Sahly H.M., Essink B., Kotloff K., Frey S., Novak R., et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2021; 384(5): 403–16. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2035389>
5. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet.* 2021; 397(10275): 671–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8)
6. Voysey M., Clemens S.A.C., Madhi S.A., Weckx L.Y., Folegatti P.M., Aley P.K., et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Af-

rica, and the UK. *Lancet.* 2021; 397(10269): 99–111. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32661-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32661-1)

7. Lau J.J., Cheng S.M.S., Leung K., Lee C.K., Hachim A., Tsang L.C.H., et al. Real-world COVID-19 vaccine effectiveness against the Omicron BA.2 variant in a SARS-CoV-2 infection-naïve population. *Nat. Med.* 2023; 29(2): 348–57. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02219-5>
8. Kurhade C., Zou J., Xia H., Liu M., Chang H.C., Ren P., et al. Low neutralization of SARS-CoV-2 Omicron BA.2.75.2, BQ.1.1 and XBB.1 by parental mRNA vaccine or a BA.5 bivalent booster. *Nat. Med.* 2023; 29(2): 344–7. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02162-x>
9. Miteva D., Kitanova M., Batselova H., Lazova S., Chervenkov L., Peshevska-Sekulovska M., et al. The end or a new era of development of SARS-CoV-2 virus: genetic variants responsible for severe COVID-19 and clinical efficacy of the most commonly used vaccines in clinical practice. *Vaccines (Basel).* 2023; 11(7): 1181. <https://doi.org/10.3390/vaccines11071181>
10. Munro A.P.S., Janani L., Cornelius V., Aley P.K., Babbage G., Baxter D., et al. Safety and immunogenicity of seven COVID-19 vaccines as a third dose (booster) following two doses of ChAdOx1 nCoV-19 or BNT162b2 in the UK (COV-BOOST): a blinded, multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet.* 2021; 398(10318): 2258–76. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02717-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02717-3)
11. Chenchula S., Karunakaran P., Sharma S., Chavan M. Current evidence on efficacy of COVID-19 booster dose vaccination against the Omicron variant: A systematic review. *J. Med. Virol.* 2022; 94(7): 2969–76. <https://doi.org/10.1002/jmv.27697>
12. Chalkias S., Harper C., Vrbicky K., Walsh S.R., Essink B., Brosz A., et al. A bivalent Omicron-containing booster vaccine against COVID-19. *N. Engl. J. Med.* 2022; 387(14): 1279–91. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2208343>
13. Scheaffer S.M., Lee D., Whitener B., Ying B., Wu K., Liang C.Y., et al. Bivalent SARS-CoV-2 mRNA vaccines increase breadth of neutralization and protect against the BA.5 Omicron variant in mice. *Nat. Med.* 2023; 29(1): 247–57. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02092-8>
14. Winokur P., Gayed J., Fitz-Patrick D., Thomas S.J., Diya O., Lockhart S., et al. Bivalent Omicron BA.1-adapted BNT162b2 booster in adults older than 55 years. *N. Engl. J. Med.* 2023; 388(3): 214–27. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2213082>
15. Kirsebom F.C.M., Andrews N., Stowe J., Ramsay M., Lopez Bernal J. Duration of protection of ancestral-strain monovalent vaccines and effectiveness of bivalent BA.1 boosters against COVID-19 hospitalisation in England: a test-negative case-control study. *Lancet Infect. Dis.* 2023; 23(11): 1235–43. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00365-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00365-1)
16. Iketani S., Mohri H., Culbertson B., Hong S.J., Duan Y., Luck M.I., et al. Multiple pathways for SARS-CoV-2 resistance to nirmatrelvir. *Nature.* 2023; 613(7944): 558–64. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05514-2>
17. Stevens L.J., Pruijssers A.J., Lee H.W., Gordon C.J., Tchesnokov E.P., Gribble J., et al. Mutations in the SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase confer resistance to remdesivir by distinct mechanisms. *Sci. Transl. Med.* 2022; 14(656): eabo0718. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abo0718>
18. Imai M., Ito M., Kiso M., Yamayoshi S., Uraki R., Fukushi S., et al. Efficacy of Antiviral Agents against Omicron Subvariants BQ.1.1 and XBB. *N. Engl. J. Med.* 2023; 388(1): 89–91. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2214302>
19. Cao Y., Wang J., Jian F., Xiao T., Song W., Yisimayi A., et al. Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Nature.* 2022; 602(7898): 657–63. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04385-3>
20. Wang Q., Guo Y., Iketani S., Nair M.S., Li Z., Mohri H., et al. Antibody evasion by SARS-CoV-2 Omicron subvariants BA.2.12.1, BA.4 and BA.5. *Nature.* 2022; 608(7923): 603–8. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05053-w>
21. Pochtovyi A.A., Kustova D.D., Siniavin A.E., Dolzhikova I.V., Shidlovskaya E.V., Shpakova O.G., et al. In vitro efficacy of antivirals and monoclonal antibodies against SARS-CoV-2 Omicron lineages XBB.1.9.1, XBB.1.9.3, XBB.1.5, XBB.1.16, XBB.2.4, BQ.1.1.45, CH.1.1, and CL.1. *Vaccines (Basel).* 2023; 11(10): 1533. <https://doi.org/10.3390/vaccines11101533>
22. Puhach O., Meyer B., Eckerle I. SARS-CoV-2 viral load and shedding kinetics. *Nat. Rev. Microbiol.* 2023; 21(3): 147–61. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00822-w>
23. Gushchin V.A., Pochtovyi A.A., Kustova D.D., Ogarkova D.A., Tarnovetskii I.Y., Belyaeva E.D., et al. Dynamics of SARS-CoV-2 major genetic lineages in Moscow in the context of vaccine prophylaxis. *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23(23): 14670. <https://doi.org/10.3390/ijms232314670>

24. Wickham H., François R., Henry L., Müller K., Vaughan D. *dplyr*: A Grammar of Data Manipulation. Available at: <https://dplyr.tidyverse.org/reference/dplyr-package.html>
25. Wickham H. *ggplot2*. New York, NY: Springer; 2009. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-98141-3>
26. Patil I. Visualizations with statistical details: The “ggstatsplot” approach. *J. Open. Source. Softw.* 2021; 6(61): 3167. <https://doi.org/10.21105/joss.03167>
27. Korber B., Fischer W.M., Gnanakaran S., Yoon H., Theiler J., Abfalterer W., et al. Tracking changes in SARS-CoV-2 spike: evidence that D614G increases infectivity of the COVID-19 virus. *Cell.* 2020; 182(4): 812–27.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.043>
28. Markov P.V., Ghafari M., Beer M., Lythgoe K., Simmonds P., Stilianakis N.I., et al. The evolution of SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* 2023; 21(6): 361–79. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00878-2>
29. Klink G.V., Safina K.R., Nabieva E., Shvyrev N., Garushyants S., Alekseeva E., et al. The rise and spread of the SARS-CoV-2 AY.122 lineage in Russia. *Virus Evol.* 2022; 8(1): veac017. <https://doi.org/10.1093/ve/veac017>
30. Teyssou E., Delagrèverie H., Visseaux B., Lambert-Niclot S., Briclher S., Ferre V., et al. The Delta SARS-CoV-2 variant has a higher viral load than the Beta and the historical variants in nasopharyngeal samples from newly diagnosed COVID-19 patients. *J. Infect.* 2021; 83(4): e1–3. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.08.027>
31. von Wintersdorff C.J.H., Dingemans J., van Alphen L.B., Wolffs P.F.G., van der Veer B.M.J.W., Hoebe C.J.P.A., et al. Infections with the SARS-CoV-2 Delta variant exhibit fourfold increased viral loads in the upper airways compared to Alpha or non-variants of concern. *Sci. Rep.* 2022; 12(1): 13922. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18279-5>
32. Guo H., Jiang J., Shen S., Ge X., Fan Q., Zhou B., et al. Additional mutations based on Omicron BA.2.75 mediate its further evasion from broadly neutralizing antibodies. *iScience.* 2023; 26(4): 106283. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106283>
33. Motozono C., Toyoda M., Zahradnik J., Saito A., Nasser H., Tan T.S., et al. SARS-CoV-2 spike L452R variant evades cellular immunity and increases infectivity. *Cell Host Microbe.* 2021; 29(7): 1124–36.e11. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.06.006>
34. Singh P., Sharma K., Singh P., Bhargava A., Negi S.S., Sharma P., et al. Genomic characterization unravelling the causative role of SARS-CoV-2 Delta variant of lineage B.1.617.2 in 2nd wave of COVID-19 pandemic in Chhattisgarh, India. *Microb. Pathog.* 2022; 164: 105404. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105404>
35. Sarkar P., Banerjee S., Saha S.A., Mitra P., Sarkar S. Genome surveillance of SARS-CoV-2 variants and their role in pathogenesis focusing on second wave of COVID-19 in India. *Sci. Rep.* 2023; 13(1): 4692. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30815-5>
36. Lin X., Sha Z., Trimpert J., Kunec D., Jiang C., Xiong Y., et al. The NSP4 T492I mutation increases SARS-CoV-2 infectivity by altering non-structural protein cleavage. *Cell Host Microbe.* 2023; 31(7): 1170–84. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2023.06.002>
37. Kim S.M., Kim E.H., Anthony M., Casel B., Kim Y.I., Sun R., et al. SARS-CoV-2 variants show temperature-dependent enhanced polymerase activity in the upper respiratory tract and high transmissibility. *bioRxiv.* 2022. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2022.09.27.509689>
38. Campbell F., Archer B., Laurenson-Schafer H., Jinnai Y., Konings F., Batra N., et al. Increased transmissibility and global spread of SARS-CoV-2 variants of concern as at June 2021. *Euro Surveill.* 2021; 26(24): 2100509. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.24.2100509>
39. Earnest R., Uddin R., Matluk N., Renzette N., Turbett S.E., Siddle K.J., et al. Comparative transmissibility of SARS-CoV-2 variants Delta and Alpha in New England, USA. *Cell Rep. Med.* 2022; 3(4): 100583. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100583>
40. Fan Y., Li X., Zhang L., Wan S., Zhang L., Zhou F. SARS-CoV-2 Omicron variant: recent progress and future perspectives. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022; 7(1): 141. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00997-x>
41. Sukhikh G.T., Pripitnevich T.V., Ogarkova D.A., Pochtovyi A.A., Kustova D.D., Zlobin V.I., et al. Sputnik light and Sputnik V vaccination is effective at protecting medical personnel from COVID-19 during the period of Delta variant dominance. *Vaccines (Basel).* 2022; 10(11): 1804. <https://doi.org/10.3390/vaccines10111804>
42. Planas D., Veyer D., Baidaliuk A., Staropoli I., Guivel-Benhassine F., Rajah M.M., et al. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature.* 2021; 596(7871): 276–80. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03777-9>
43. Simon-Loriere E., Schwartz O. Towards SARS-CoV-2 serotypes? *Nat. Rev. Microbiol.* 2022; 20(4): 187–8. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00708-x>
44. Wu H., Xing N., Meng K., Fu B., Xue W., Dong P., et al. Nucleocapsid mutations R203K/G204R increase the infectivity, fitness, and virulence of SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe.* 2021; 29(12): 1788–801. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.11.005>
45. Bills C.J., Xia H., Chen J.Y.C., Yeung J., Kalveram B.K., Walker D., et al. Mutations in SARS-CoV-2 variant nsp6 enhance type-I interferon antagonism. *Emerg. Microbes Infect.* 2023; 12(1): 2209208. <https://doi.org/10.1080/22221751.2023.2209208>
46. Liu Y., Liu J., Plante K.S., Plante J.A., Xie X., Zhang X., et al. The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 infection and transmission. *Nature.* 2022; 602(7896): 294–99. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04245-0>
47. Escalera A., Gonzalez-Reiche A.S., Aslam S., Mena I., Laporte M., Pearl R.L., et al. Mutations in SARS-CoV-2 variants of concern link to increased spike cleavage and virus transmission. *Cell Host Microbe.* 2022; 30(3): 373–87.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.01.006>
48. Starr T.N., Greaney A.J., Hannon W.W., Loes A.N., Hauser K., Dillen J.R., et al. Shifting mutational constraints in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain during viral evolution. *Science.* 2022; 377(6604): 420–4. <https://doi.org/10.1126/science.abo7896>
49. Hirotsu Y., Maejima M., Shibusawa M., Natori Y., Nagakubo Y., Hosaka K., et al. SARS-CoV-2 Omicron sublineage BA.2 replaces BA.1.1: Genomic surveillance in Japan from September 2021 to March 2022. *J. Infect.* 2022; 85(2): 174–211. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.04.040>
50. Mastrorosa I., Cozzi-Lepri A., Colavita F., Lalle E., Mazzotta V., Cimaglia C., et al. SARS-CoV-2 nasopharyngeal viral load in individuals infected with BA.2, compared to Alpha, Gamma, Delta and BA.1 variants: A single-center comparative analysis. *J. Clin. Virol.* 2022; 157: 105299. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2022.105299>
51. Tozer K., Sjaarda C.P., Moslinger E., Wong H., Mubareka S., Manguire F., et al. Comparison of SARS-CoV-2 viral loads in the nasal mucosa of patients infected with BA.1, BA.2, or BA.5 Omicron lineages. *Open Forum Infect. Dis.* 2022; 9(12): ofac564. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac564>
52. Takatsuki Y., Takahashi Y., Nakajima J., Iwasaki Y., Nagano K., Tani-Sassa C., et al. Viral load of SARS-CoV-2 Omicron BA.5 is lower than that of BA.2 despite the higher infectivity of BA.5. *Immun. Inflamm. Dis.* 2023; 11(2): e783. <https://doi.org/10.1002/ibd3.783>
53. Cao Y., Yisimayi A., Jian F., Song W., Xiao T., Wang L., et al. BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 escape antibodies elicited by Omicron infection. *Nature.* 2022; 608(7923): 593–602. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04980-y>
54. Tuekprakhon A., Nutralai R., Djokaite-Guraliuc A., Zhou D., Ginn H.M., Selvaraj M., et al. Antibody escape of SARS-CoV-2 Omicron BA.4 and BA.5 from vaccine and BA.1 serum. *Cell.* 2022; 185(14): 2422–33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.005>
55. Rashid F., Xie Z., Suleman M., Shah A., Khan S., Luo S. Roles and functions of SARS-CoV-2 proteins in host immune evasion. *Front. Immunol.* 2022; 13: 940756. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.940756>
56. Github. BA.5.1.29 sublineage with S:K150E, S:460K, Orf8:F41C. Available at: <https://github.com/cov-lineages/pango-designation/issues/1187>
57. Khare S., Gurry C., Freitas L., Schultz M.B., Bach G., Diallo A., et al. GISAID’s role in pandemic response. *China CDC Wkly.* 2021; 3(49): 1049–51. <https://doi.org/10.46234/ccdcw2021.255>
58. Haslwanter D., Dieterle M.E., Wec A.Z., O’Brien C.M., Sakharkar M., Florez C., et al. A combination of receptor-binding domain and N-terminal domain neutralizing antibodies limits the generation of SARS-CoV-2 spike neutralization-escape mutants. *mBio.* 2021; 12(5): e0247321. <https://doi.org/10.1128/mBio.02473-21>
59. Kee J., Thudium S., Renner D.M., Glastad K., Pailzola K., Zhang Z., et al. SARS-CoV-2 disrupts host epigenetic regulation via histone mimicry. *Nature.* 2022; 610(7931): 381–8. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05282-z>
60. Hossain A., Akter S., Rashid A.A., Khair S., Alam A.S.M.R.U. Unique mutations in SARS-CoV-2 Omicron subvariants’ non-spike proteins: Potential impacts on viral pathogenesis and host immune evasion. *Microb. Pathog.* 2022; 170: 105699. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105699>
61. Github. BJ.1/BM.1.1.1 (=BA.2.75.3.1.1.1) recombinant with breakpoint in S1 (>=5 sequences, 3x Singapore, 2x US as of 2022-09-12). Available at: <https://github.com/cov-lineages/pango-designation/issues/1058>
62. Tamura T., Ito J., Uriu K., Zahradnik J., Kida I., Anraku Y., et al. Virological characteristics of the SARS-CoV-2 XBB variant derived from recombination of two Omicron subvariants. *Nat. Commun.* 2023; 14(1): 2800. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38435-3>

63. Ao D., He X., Hong W., Wei X. The rapid rise of SARS-CoV-2 Omicron subvariants with immune evasion properties: XBB.1.5 and BQ.1.1 subvariants. *MedComm. (2020)*. 2023; 4(2): e239. <https://doi.org/10.1002/mco2.239>
64. Parums D.V. Editorial: The XBB.1.5 ('Kraken') subvariant of Omicron SARS-CoV-2 and its rapid global spread. *Med. Sci. Monitor*. 2023; 29: e939580. <https://doi.org/10.12659/MSM.939580>

Информация об авторах:

Кустова Дарья Дмитриевна – младший научный сотрудник лаборатории механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия; аспирант кафедры вирусологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Россия. E-mail: kustovadaria@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8382-275X>.

Почтовый Андрей Андреевич – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: a.pochtovyy@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-0003-1107-9351>.

Шпакова Ольга Геннадьевна – заведующая лабораторией МНПЦЛИ Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия. E-mail: shpakovaog@dcli.ru; <https://orcid.org/>

Штинова Ирина Александровна – заведующая лабораторным центром МНПЦЛИ Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия. E-mail: shtinovaia@dcli.ru; <https://orcid.org/>

Кузнецова Надежда Анатольевна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: nadyakuznetsova0@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7399-7628>

Клейменов Денис Александрович – канд. мед. наук, заведующий лабораторией трансляционной биомедицины ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: mne10000let@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9422-7238>

Комаров Андрей Григорьевич – канд. мед. наук, директор МНПЦЛИ Департамента здравоохранения г. Москвы, Москва, Россия. E-mail: komarovag@zdrav.mos.ru; <https://orcid.org/0009-0000-8597-7125>

Гущин Владимир Алексеевич – д-р биол. наук, заведующий лабораторией механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов и референс-центра по коронавирусной инфекции ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия; старший научный сотрудник кафедры вирусологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия. E-mail: wowaniada@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9397-3762>

Для корреспонденции: Почтовый Андрей Андреевич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия. E-mail: a.pochtovyy@gamaleya.org.

Участие авторов: Кустова Д.Д. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, анализ и статистическая обработка полученных результатов, подготовка текста; Почтовый А.А. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, подготовка текста; Шпакова О.Г. – сбор материала, проведение экспериментов, подготовка текста; Штинова И.А. – сбор материала, проведение экспериментов; Кузнецова Н.А. – сбор материала, проведение экспериментов; Клейменов Д.А. – организационно-методическая работа по дизайну исследования, одобрение окончательного варианта статьи для публикации; Комаров А.Г. – организационно-методическая работа по дизайну исследования, одобрение окончательного варианта статьи для публикации; Гущин В.А. – концепция и дизайн исследования, организационно-методическая работа по дизайну исследования, одобрение окончательного варианта статьи для публикации. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Поступила 24.05.2024

Принята в печать 12.07.2024

Опубликована 31.08.2024

Information about the authors:

Daria D. Kustova – junior researcher, Laboratory of mechanisms of population variability of pathogenic microorganisms, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia; PhD student, Department of Virology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia. E-mail: kustovadaria@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8382-275X>

Andrei A. Pochtovyy – Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of mechanisms of population variability of pathogenic microorganisms, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: a.pochtovyy@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-0003-1107-9351>

Olga G. Shpakova – Head of the laboratory of the Moscow Scientific and Practical Center for Laboratory Research of the Moscow Department of Health, Moscow, Russia. E-mail: shpakovaog@dcli.ru; <https://orcid.org/>

Irina A. Shtinova – Head of Laboratory Center of the Moscow Scientific and Practical Center for Laboratory Research of the Moscow Department of Health, Moscow, Russia. E-mail: shtinovaia@dcli.ru; <https://orcid.org/>

Nadezhda A. Kuznetsova – Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of mechanisms of population variability of pathogenic microorganisms, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: nadyakuznetsova0@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7399-7628>

Denis A. Kleimenov – Cand. Sci. (Med.), Head, Laboratory of translational biomedicine, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: mne10000let@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9422-7238>

Andrey G. Komarov – Cand. Sci. (Med.), Head of the Moscow Scientific and Practical Center for Laboratory Research of the Moscow Department of Health, Moscow, Russia. E-mail: komarovag@zdrav.mos.ru; <https://orcid.org/0009-0000-8597-7125>

Vladimir A. Gushchin – Dr. Sci. (Biology), Head, Laboratory of mechanisms of population variability of pathogenic microorganisms, Reference center for coronavirus infection, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia; senior researcher, Department of virology, Biological faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia. E-mail: wowaniada@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9397-3762>

Contribution: Kustova D.D. – the study concept and design, conducting of the experiments, analysis and statistical processing of the results, preparing of the text; Pochtovyy A.A. – the study concept and design, conducting of the experiments, preparing of the text; Shpakova O.G. – collection of material, conducting of the experiments, preparing of the text; Shtinova I.A. – collection of material, conducting of the experiments; Kuznetsova N.A. – collection of material, conducting of the experiments; Kleimenov D.A. – organizational and methodological work on research design, final approval of the article for publication; Komarov A.G. – organizational and methodological work on research design, final approval of the article for publication; Gushchin V.A. – the study concept and design, organizational and methodological work on research design, final approval of the article for publication.

Received 24 May 2024

Accepted 12 July 2024

Published 31 August 2024

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-245>

© ZINAH FADHIL SALIM, BUSHRA JABBAR HAMAD, 2024



Molecular Study of Varicella zoster virus in Cerebrospinal Fluid from Stroke Patients of Thi-Qar province

Zinah Fadhil Salim^{1,2*}, Bushra Jabbar Hamad¹¹Department of Biology, College of Science, University of Thi-Qar, Thi-Qar, 64001, Iraq;²Ministry of Health, Thi-Qar Health Directorate, Nasiriyah, Iraq

Abstract

Introduction: Varicella zoster virus (VZV) is a type of alpha-herpesvirus that specifically targets the nervous system. The initial infection, typically occurring during childhood, results in varicella (commonly known as chickenpox), after which the virus enters a dormant state in cranial nerve ganglia, dorsal root ganglia, and autonomic ganglia throughout the entire neuroaxis.

Aim of the study: Molecular and genetic studies of viruses are an important tool for virus development and identifying viral treatments to combat the diseases. The aim of the study was to determine the whole ORF4 sequence of the local VZV strains for phylogenetic analysis to determine the variability in the viral sequence.

Material and methods: Ten samples of VZV DNA were subjected to the sequencing of the whole ORF4 region following identification using the PCR method.

Results: Sequences from five samples have been successfully analyzed. All clinical strains were discovered to possess a genome with a length of 124,884 base pairs. The sequences exhibited the occurrence of two distinct mutations, one being a transversion and the other a transition, with the latter resulting in an alteration of the amino acid. A phylogenetic tree was constructed using the maximum likelihood method based on the sequences of five nucleotide sequences from clinical samples and nine reference VZV strains. The tree displayed the evolutionary distances between these sequences. The analysis of the phylogenetic tree revealed the presence of five primary clades, with four of them originating from India (isolates S1, S2, S4, S5), while S3 exhibited similarity to a strain from the United Kingdom.

Keywords: *Varicella; Stroke; Cerebrospinal fluids; Chicken pox*

For citation: Salim Z.F., Hamad B.J. Molecular Study of Varicella zoster virus in Cerebrospinal Fluid from Stroke Patients of Thi-Qar province. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(4): 341–348. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-245> EDN: <https://elibrary.ru/ovtgzm>

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

Acknowledgement. Thanks, and appreciation to Al-Nasiriyah Teaching Hospital 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 University of Thi-Qar (Protocol No. 3/11/1260 dated 21/9/2023).

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-245>

Молекулярная диагностика вируса ветряной оспы в спинномозговой жидкости пациентов с инсультом из провинции Ди-Кар

Zinah Fadhil Salim^{1,2*}, Bushra Jabbar Hamad¹¹Кафедра биологии, Научный колледж, Университет Ди-Кар, Ди-Кар, 64001, Ирак;²Министерство здравоохранения, Управление здравоохранения Ди-Кар, Насирия, Ирак

Резюме

Введение: Вирус Varicella zoster (VZV) — это разновидность альфа-герпесвируса, который поражает нервную систему. Первичное заражение, обычно происходящее в детстве, приводит к ветряной оспе (известной как ветрянка), после чего вирус переходит в латентное состояние в ганглиях черепных нервов, дорсальных корешковых ганглиях и вегетативных ганглиях по всей ЦНС.

Цель исследования: Молекулярно-генетические исследования вирусов являются важными для обнаружения вирусов и разработки вирусных препаратов для борьбы с заболеваниями. Цель исследования – определение всей последовательности гена *ORF4* местных штаммов VZV для филогенетического анализа с целью определения изменчивости вирусной последовательности.

Материалы и методы: Десять образцов ДНК VZV были подвергнуты секвенированию всего участка *ORF4* после идентификации методом ПЦР.

Результаты: Нуклеотидные последовательности VZV были получены и проанализированы для 5 клинических образцов. Было обнаружено, что все клинические штаммы обладают геномом длиной 124 884 бп. Анализ последовательностей продемонстрировал наличие 2 различных мутаций, одна из которых является трансверсией, а другая – переходом, причем последняя приводит к изменению аминокислотного остатка. Филогенетическое дерево было построено методом максимального правдоподобия на основе нуклеотидных последовательностей из 5 клинических образцов и 9 референсных штаммов VZV. Дерево отображало эволюционные расстояния между этими последовательностями. Анализ филогенетического дерева показал наличие 5 первичных клад, 4 из которых происходят из Индии (изоляты S1, S2, S4, S5), а S3 демонстрирует сходство со штаммом из Великобритании.

Ключевые слова: *Varicella*, инсульт; спинномозговая жидкость; ветряная оспа

Для цитирования: Salim Z.F., Namad B.J. Молекулярная диагностика вируса ветряной оспы в спинномозговой жидкости пациентов с инсультом из провинции Ди-Кар. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(4): 341–348. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-245> EDN: <https://elibrary.ru/ovtgmz>

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

Благодарность. Авторы выражают благодарность учебному госпиталю Аль-Насирия за предоставленные разрешения и проведение данного 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 Университета Ди-Кар (Протокол № 3/11/1260 от 21.09.2023).

Introduction

Varicella-Zoster virus (VZV) is a pathogenic human herpesvirus that causes varicella (chicken pox) as a primary infection [1]. VZV, which was latent in the cranial nerve or dorsal root ganglia, reactivates to cause the viral shingle. VZV can reactivate due to immunosenescence which includes the known decrease in cell-mediated immunity with age [2]. It continues to be acknowledged as a significant global public health concern that impacts individuals across several geographic regions. Typically, 10–20% of people over 50 have experienced at least one zoster episode in their entire life [3]. The neurotropic human alpha herpesvirus VZV is endemic to every country in the world. It creates a permanent latency in neurons after initial infection, and periodically reactivates to cause a range of moderate to severe illnesses [4]. Studies of genetic diversity of VZV play an important role in further understanding of the epidemiology and evolution of the virus and may in future serve as a tool for genetic prediction of virus pathogenicity or resistance development [5].

The cerebrospinal fluid (CSF) of individuals with neurological consequences from VZV infection has a high concentration of chemokines and an inflammatory response, which attract immune cells and inflame central nervous system (CNS) tissues [6]. Reactivation of the VZV has been associated with a higher risk of stroke [7]. An infection with the VZV may result in vascular inflammatory alterations that raise the risk of stroke [8]. The VZV, which is a member of the subfamily Alphaherpesvirinae family within the Herpesviridae family, replicates and causes illness in the arteries of the human brain [9]. When VZV infects the cerebral arteries, it causes vasculopathy, which can lead to stroke. VZV encephalitis usually develops fol-

lowing primary infection and reactivation. Vasculopathy can also develop due to the primary infection or VZV reactivation [10]. According to statistics from the World Health Organization (WHO) in 2014, complications from VZV infection resulted in over 4 million hospital admissions and over 4,000 fatalities worldwide annually. The intraocular distribution of the trigeminal nerve harbors VZV, which is associated with a 4.5-fold higher risk of stroke [11].

Worldwide, one in five persons may encounter VZV at some point in their lives, and around one-third of those who do will go on to develop herpes zoster (HZ) [12]. Commonly used techniques for diagnosing VZV infection include advanced pathogen testing as well as conventional medical exams. CSF testing, standard blood testing and biochemical testing are among the common medical procedures [13].

Materials and methods

Patients and clinical specimens

In total, 120 samples were obtained from 90 symptomatic patients with the age between 1 year and 70 years, and 30 individuals were recruited as control group. The samples were obtained from a dermatological consultant at Al-Nasiriyah Teaching Hospital and clinical private between September 2023 and January 2024. From each patient, 3 mL of CSF sample was collected under sterile conditions and put in an EDTA tube, the samples which were stored frozen at -80°C were left to adjust to the room temperature after complete thawing.

The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Thi-Qar (Protocol No. 3/11/1260 dated 21/9/2023).

Nucleic Acid Extraction

A total of 60 μL of extracted material was recovered from 120 μL of clinical specimen using the FAVORGEN-TIWAN extraction method, following the manufacturer's instructions. The nucleic acid was subjected to real-time PCR and melting curve analysis.

Real-Time PCR and Melting Curve Analysis

The gene targets as well as the primers used for amplification are provided in table 1. Light cycler probe design software 2.0 (Roche, Penzberg, Germany) was used to design primers except for two for internal control. The reaction mixture of total volume 20 μL included 3.0 μL of isolated nucleic acid, and one Light Cycler FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche), 3 mM MgCl_2 , 0.3 M of HERV-3 primer, and each of the detection primers (1.0 μM of primers for VZV). The reaction mixture was first denatured for 10 min at 95 $^\circ\text{C}$. After that, the PCR was run in Light Cycler 2.0 (Roche) for 45 cycles for 5 sec at 95 $^\circ\text{C}$, 3 sec at 65 $^\circ\text{C}$, and 10 sec at 72 $^\circ\text{C}$ [14].

Primers

The primers that were used for nucleic acid amplification are listed in the **Table 1**.

DNA Sequencing

For constructing a phylogenetic tree and identifying the subtypes of VZV-positive samples, the ORF4 region was amplified using forward and reverse primers by PCR. The PCR products of VZV positive samples, with each tube labeled and containing 10 μL of forward and reverse primer (Table 1), were shipped to Macrogen Company in South Korea for sequencing. A phylogenetic tree was

constructed using the maximum likelihood method based on the sequences of five nucleotide sequences from clinical samples and nine reference VZV strains.

Results

A total of 120 samples of cerebral spinal fluid were collected for this study, with 90 samples from patients with stroke and 30 samples from the control group. The study found that 47 (39.17%) of the study population were infected with VZV, with 34 (37.78%) in the patient group and 13 (43.33%) in the control group. The remaining 73 (60.83%) individuals were not infected with the virus, with 56 (62.22%) in the patient group and 17 (56.67%) in the control group. The study also observed a significant difference in the frequency of the virus in the study population, with a *p*-value of less than 0.05, as shown in **Figure 1** and **2**.

Mutation Detection in VZV Sequence

When comparing the sequence of isolates of the current study with several sequences deposited in the GenBank, it was found that there are two types of point mutations compared with some isolates. The first type was a transversion mutation at positions 8, 11 and 57, while the second type was a transition mutation at positions 58, 60, 61, 354 as shown in Table 2.

Phylogenetic Tree

The phylogenetic trees of the viral sequences isolated in the current study was built according to the amino acid sequence matching with the sequences deposited in NCBI. The study showed that three isolates contained genetic mutations, while two isolates were 100% identical, as in **Figures 3–7**.

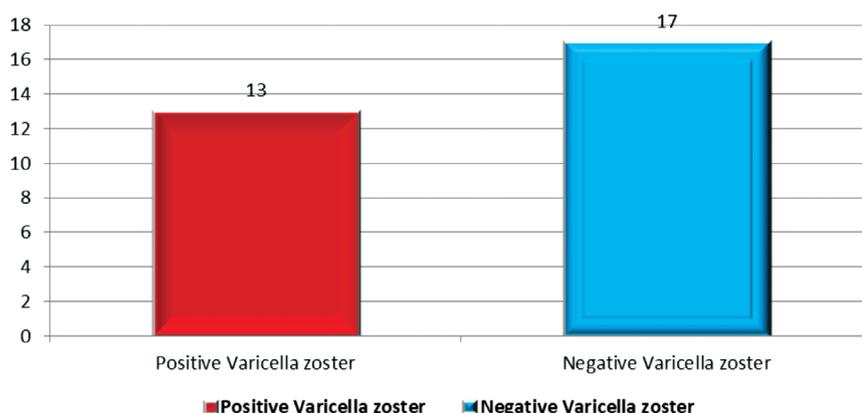


Fig. 1. Prevalence of VZV infection in control group.

Рис. 1. Распространенность VZV-инфекции в контрольной группе.

Table 1. Characteristics of primer used for nucleic acid amplification

Таблица 1. Характеристики праймеров, используемых для амплификации нуклеиновых кислот

Virus Вирус	Gene target Ген-мишень	Primer sequences (5'→3') Последовательности праймеров (5'→3')	Amplicon (bp) Ампликон (bp)	Reference Источник
VZV Ветряная оспа	ORF4	Forward primer / Прямой праймер: GCCCATGAATCACCCCTC Reverse primer / Обратный праймер: ACTCGGTACGCCATTGAT	79	[15]

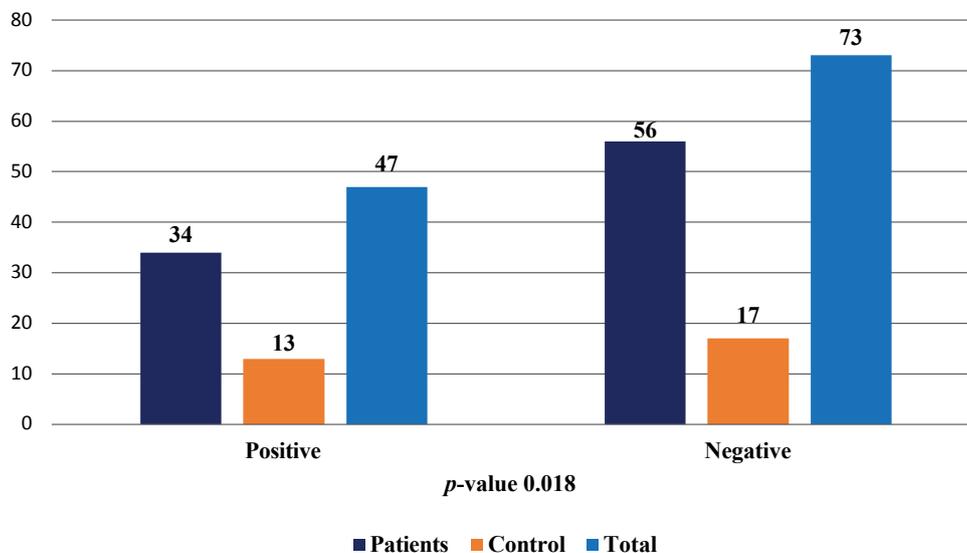


Fig. 2. Prevalence of VZV infection in stroke patients and in control group.

Рис. 2. Распространенность VZV-инфекции у пациентов с инсультом и в контрольной группе.

Table 2. Types and positions of mutations detected in VZV sequences

Таблица 2. Типы и положение мутаций, выявленных в последовательностях VZV

Isolate Изолят	Substitution Type Тип замены	Location Положение	Nucleotide Нуклеотид	Sequence ID Последовательность	Source Источник	Similarity Сходство
1.	Transversion / Трансверсия Transition / Переход	11 354	T/G A/G	OQ835722.1	HAHV	99% India 99% Индия
2.	Transversion / Трансверсия Transition / Переход	57 60	C/G G/A	OQ835722.1	HAHV	99% India 99% Индия
3.	Transversion / Трансверсия Transition / Переход Transition / Переход	8 58 61	G/T C/T G/A	KP771921.1	HHV	98% UK 98% Великобритания
4.	NONE	–	–	OQ835722.1	HAHV	100% India 100% Индия
5.	Transition / Переход Transition / Переход	58 61	C/T G/A	OQ835722.1	HAHV	99% India 99% Индия

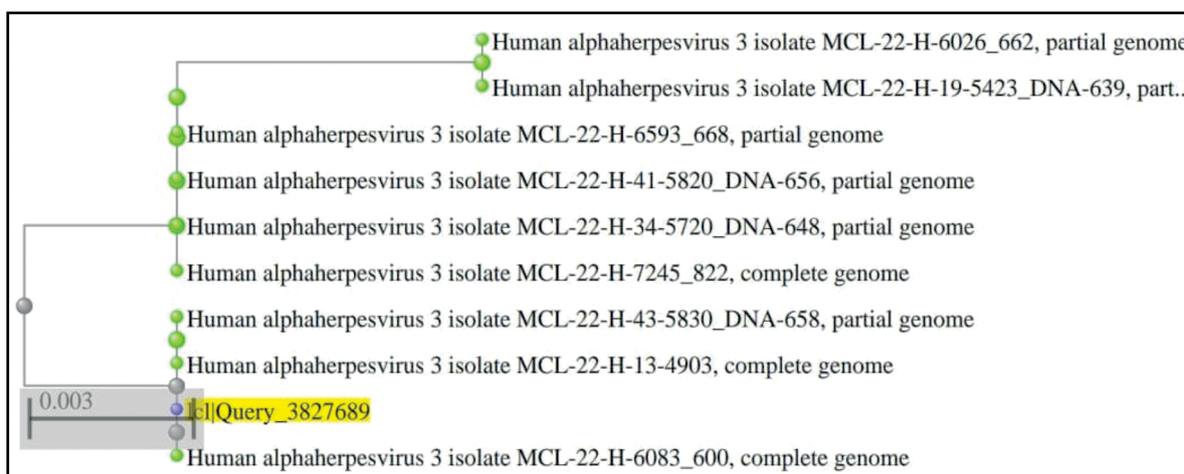


Fig. 3. Phylogenetic tree for the first isolate which has the level of divergence with reference sequences of 0.003.

Рис. 3. Филогенетическое дерево для 1-го изолята, у которого уровень различий с референсными последовательностями составил 0,003.

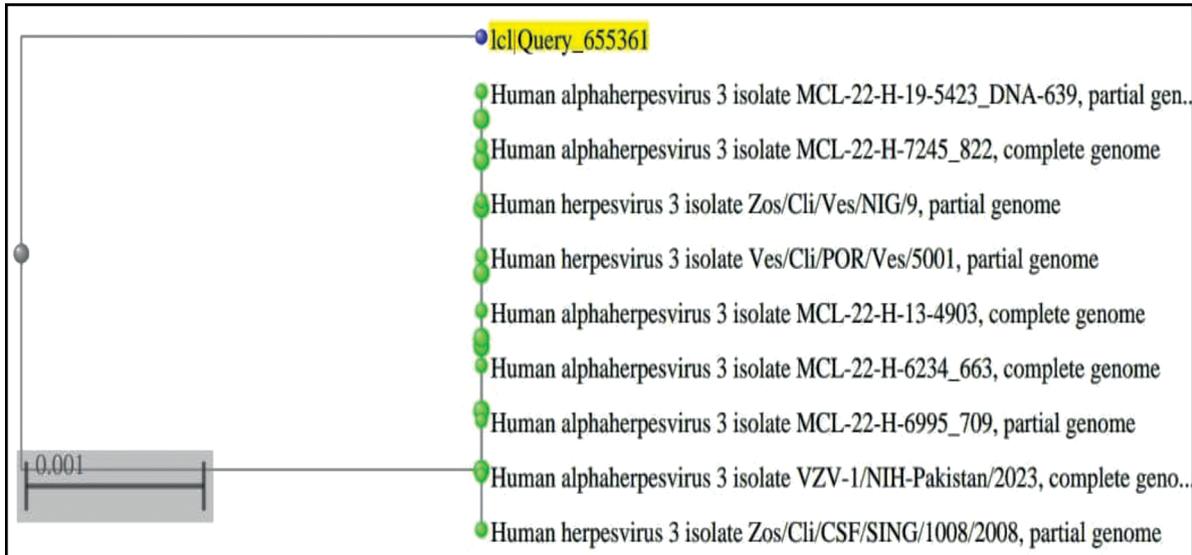


Fig. 4. Phylogenetic tree of the second isolate, which has the level of divergence with reference sequences of 0.001.

Рис. 4. Филогенетическое дерево для 2-го изолята, у которого уровень различий с референсными последовательностями составил 0,001.

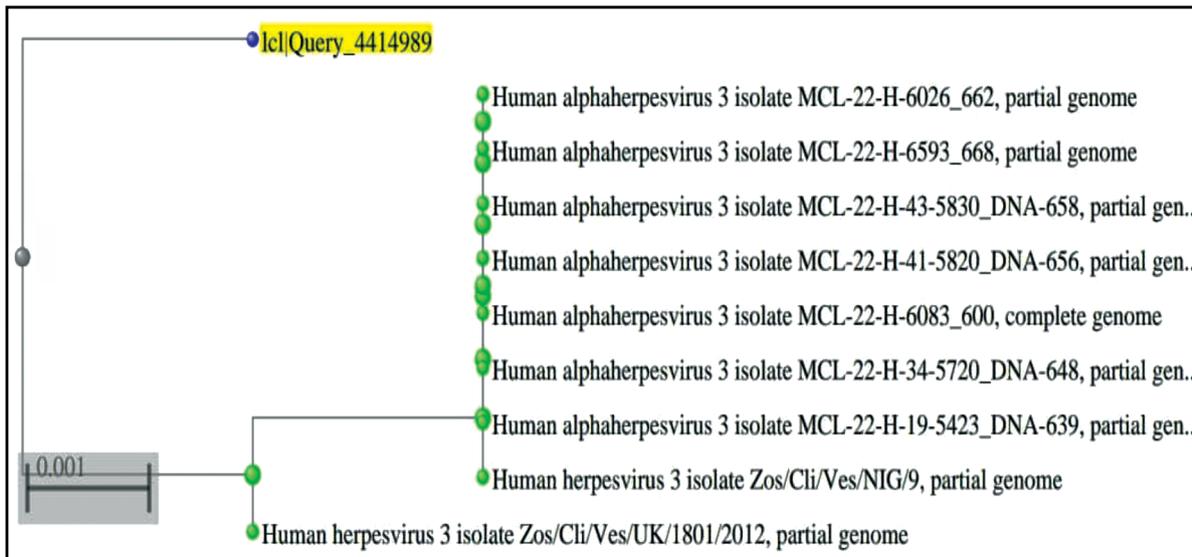


Fig. 5. Phylogenetic tree of the third isolate, which has the level of divergence with reference sequences of 0.001.

Рис. 5. Филогенетическое дерево для 3-го изолята, у которого уровень различий с референсными последовательностями составил 0,001.

Discussion

VZV belongs to the subfamily Alphaherpesvirinae. Genetically, it is divided into several genotypes based upon the genetic variations [16]. VZV is highly infectious, causes large outbreaks of varicella in the populations, and establishes lifelong latency; the subclinical reactivation of VZV, however, is believed to occur less frequently than the reactivation of other alpha herpesviruses [17]. The results of the current study are in agreement with study of Helmuth et al. [18] conducted in Denmark, that detected VSV in 9 (60%) of 15 children with arterial ischemic stroke. Also, our results are in agreement with data from Tung et al. [19] in

China, who recorded the prevalence of VZV in stroke patients as high as 12.18% per 1000 patients compared to 3.63 per 1000 person per year in controls. In addition, Schmidt et al. [20] showed that mood disorders, including depression, were associated with increased risk of HZ in stroke patients. However, our data differed from study of Sundström et al. [21], in Switzerland, who reported 20.6% VZV detection rate among 112 patients with stroke. Meanwhile, this study demonstrated 6.2% prevalence in control population, similar to data from the current study. The increased detection rates of the virus in stroke patients may be due to inflammatory reactions releasing inhibitory molecules within the immune system, which are usually self-limiting

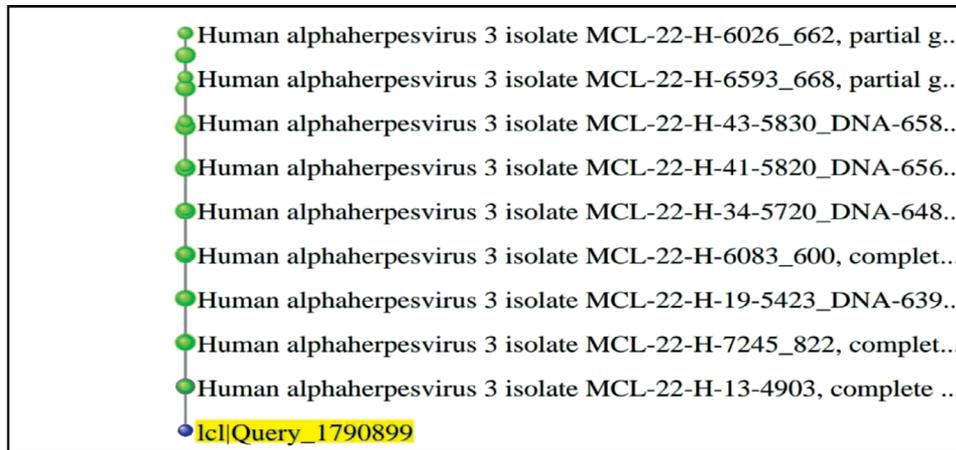


Fig. 6. Phylogenetic tree of the fourth isolate, which had 100% identity with reference sequences.

Рис. 6. Филогенетическое дерево для 4-го изолята, на 100% идентичного референсным последовательностям.

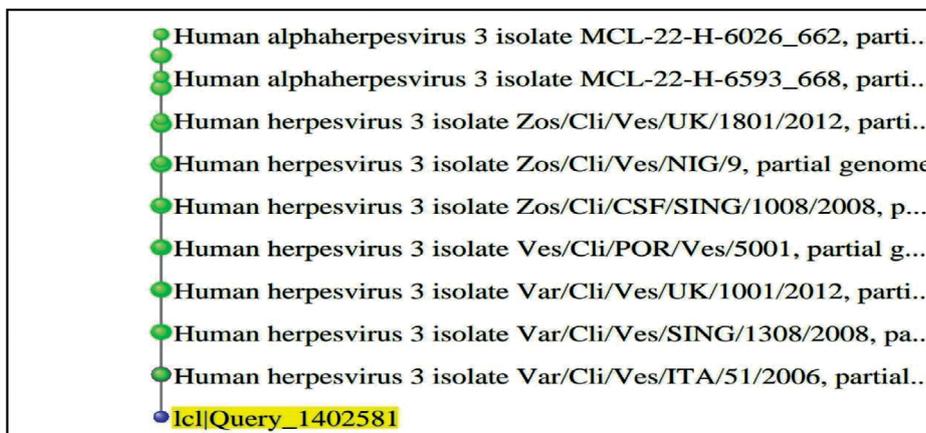


Fig. 7. Phylogenetic tree of the fifth isolate, isolate which had 100% identity with reference sequences.

Рис. 7. Филогенетическое дерево для 5-го изолята, на 100% идентичного референсным последовательностям.

and self-resolving. The release of pro-inflammatory cytokines in the brain stimulates the expansion of the immunosuppressive cell population that suppresses innate and adaptive immune responses [22]. Paradoxically, an excessive inflammatory response in the brain leads to an immunosuppressive state in peripheral tissues. Therefore, stroke patients are at risk of fatal secondary infections [23]. The study of Liu et al. [24] identified 38 polymorphic markers in four ORFs (ORFs 1, 21, 22, and 54) among 19 VZV isolates from different clinical samples in China, with considerable homology between 19 clinical strains. The previous study suggested that the ORF4 is necessary for virus replication in cell culture. Furthermore, this gene is essential for the establishment of latency, but it is not necessary for latent infection. As a result, the researchers deleted the ORF4 from the viral genome and were unable to produce an infectious virus. However, when they inserted the ORF4 into a cosmid at a nonnative site, they obtained virus. The results of the current study are consistent with the previous study by Sato et al. [25], who observed 13 positive samples in the control group and 34 in stroke patients, and suggested that ORF4 was required for replication and latency, but

not not required to induce acute infection. Recent studies in animal experiments have demonstrated based on the data from transcriptional analyzes of the ICP27 protein expressed by ORF4, that neither HSV infection nor global ICP27 overexpression inhibits splicing [26], but rather modulates alternative splicing of a subset of cells [27]. HSV virus causes host-induced shutdown, and another study suggested that exposure of the virus to deletion and substitution mutations in the ORF4 proteins may enable the virus to activate the binding mechanism and cause a latency state in the infected cell [28]. The ability of alpha herpesviruses to persist in sensory ganglia, their short reproductive cycle, their rapid dissemination, and their ability to eliminate infected cells effectively are four of their defining characteristics. VZV replication occurs primarily in cells of human and simian origin. The VZV genome has 73 genes, of which 70 are unique and three are duplicated [29]. The viral genome consists of two primary coding regions: unique long (UL) and unique short (US), as well as flanking inverted repeats known as terminal and internal repeats long (TRL, IRL) and short (TRS, IRS).

When the VZV sequences from present study were

compared to sequences deposited in the GenBank, two types of point mutations were discovered. The first type was a transversion mutation at positions 8, 11 and 57, while the second type was a transition mutation at positions 58, 60, 61, and 354, as shown in Table 2, which represents the matching of the nucleotide sequences of the isolates in this study with the isolates in the database. In the isolate 1, the present study found a transversion mutation at position 11, where the purine base G was replaced with the pyrimidine base T, and other type found a mutation of the transition type at position 354, where the purine base A was replaced with the purine base G, and the strain was identical to the strain found in India. In isolate 2, the present study found a transversion mutation at position 57, where the pyrimidine base C was replaced with the purine base G, and other type found a mutation of the transition type at position 60, where the purine base G was replaced with the purine base A, and the strain was identical to the strain found in India. The current study identified three mutations in isolate 3 that corresponded to a strain of VZV found in the UK. A transversion mutation was observed at position 8, where the purine base G was replaced with the pyrimidine base T. Two transition mutations occurred at positions 58 and 61. The first involved the replacement of the pyrimidine base C with the pyrimidine base T, while the second involved the substitution of the purine base G with A. The fourth isolate, labeled as 4, did not exhibit any mutations and was found to be genetically identical to the Indian strain. In isolate 5, two mutations occurred - the same type transition in position 58 where the pyrimidine base C was replaced with the pyrimidine base T and at position 61 when the purine base G took place A, the strain matched with Indian strain. In Basrah city a comprehensive genome study revealed a resemblance to the E genotype seen in nations with a history of European colonization. The same study found the sequences contained a variety of mutations or SNPs, some of which were silent, and others produced amino acid changes [5]. VZV genotype B was detected in an isolated strain in Najaf province. No significant correlation was found between VZV genotype and life expectancy [30]. The present study demonstrated that nearly 40% of people in Thi-Qar province have been infected with VZV gene type of ORF4 in all age groups, also in fact, this gene was not actually linked to stroke infections. The emergence of the two strains in the region may be due to the frequent movement between countries in terms of travel and trade, especially since the virus is transmitted quickly through the respiratory tract between sick and healthy people.

Conclusions

The study found that about 40 percent of people in Thi-Qar had a previous infection with VZV. No significant association was observed between the occurrence of a stroke and the presence of the studied *ORF4* gene of VZV in affected patients. Furthermore, two strains that were identified in the study belonged to a European clade and an Asian clade, respectively. In addition, two types of mutations, transversion and transition, occur in the viral gene *ORF4*.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Kennedy P.G., Montague P. Variable gene expression in human ganglia latently infected with varicella-zoster virus. *Viruses*. 2022; 14(6): 1250. <https://doi.org/10.3390/v14061250>
- Rashad I. Estimation of cytokine level IL-4, IL-12, IL-17 and some immune features among patients with Herpes zoster in Thi-Qar Province/Southern Iraq. *Univ. Thi-Qar J. Sci.* 2023; 10(1): 87–90. <https://doi.org/10.32792/utq/utjsci/v10i1.943>
- Nasser H.A., Shallal M.J., Naif A., Kadhim K.A. Detection of shingles and correlation with gender, weather and residency. *Biochem. Cell. Arch.* 2022; 22(1): 835.
- Heinz J.L., Swagemakers S.M., von Hofsten J., Helleberg M., Thomsen M.M., De Keukeleere K., et al. Whole exome sequencing of patients with varicella-zoster virus and herpes simplex virus induced acute retinal necrosis reveals rare disease-associated genetic variants. *Front. Mol. Neurosci.* 2023; 16: 1253040. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2023.1253040>
- Almarjan M., Al-Hmudi H.A., Habib H.N. Hologenome sequences of local varicella-zoster virus (VZV) strains of Basrah city/Iraq. *Turk. J. Physiother. Rehabil.* 2021; 32(3): 16094–103.
- Pormohammad A., Goudarzi H., Eslami G., Falah F., Taheri F., Ghadiri N., et al. Epidemiology of herpes simplex and varicella zoster virus in cerebrospinal fluid of patients suffering from meningitis in Iran. *New Microbes New Infect.* 2020; 36: 100688. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100688>
- Marais G., Naidoo M., McMullen K., Stanley A., Bryer A., van der Westhuizen D., et al. Varicella-zoster virus reactivation is frequently detected in HIV-infected individuals presenting with stroke. *J. Med. Virol.* 2022; 94(6): 2675–83. <https://doi.org/10.1002/jmv.27651>
- Lu P., Cui L., Zhang X. Stroke risk after varicella-zoster virus infection: a systematic review and meta-analysis. *J. Neurovirol.* 2023; 29(4): 449–59. <https://doi.org/10.1007/s13365-023-01144-0>
- Kuriakose D., Xiao Z. Pathophysiology and treatment of stroke: present status and future perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(20): 7609. <https://doi.org/10.3390/ijms21207609>
- Kawada J.I. Neurological disorders associated with human alphaherpesviruses. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018; 1045: 85–102. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7230-7_5
- Wang T., Shen H., Deng H., Pan H., He Q., Ni H., et al. Quantitative proteomic analysis of human plasma using tandem mass tags to identify novel biomarkers for herpes zoster. *J. Proteomics.* 2020; 225: 103879. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103879>
- Grahn A., Studahl M. Varicella-zoster virus infections of the central nervous system – Prognosis, diagnostics and treatment. *J. Infect.* 2015; 71(3): 281–93. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.06.004>
- Stránská R., Schuurman R., de Vos M., van Loon A.M. Routine use of a highly automated and internally controlled real-time PCR assay for the diagnosis of herpes simplex and varicella-zoster virus infections. *J. Clin. Virol.* 2004; 30(1): 39–44. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2003.08.006>
- Hieran A., Albadry B.J. A Human CCL3L1 gene expression in blood donors infected with HIV-1. *Univ. Thi-Qar J. Sci.* 2023; 10(1): 181–4. <https://doi.org/10.32792/utq/utjsci/v10i1.1060>
- Hong Y.J., Lim M.S., Hwang S.M., Kim T.S., Park K.U., Song J., et al. Detection of herpes simplex and varicella-zoster virus in clinical specimens by multiplex real-time PCR and melting curve analysis. *Biomed. Res. Int.* 2014; 2014: 261947. <https://doi.org/10.1155/2014/261947>
- Peters G.A., Tyler S.D., Grose C., Severini A., Gray M.J., Upton C., et al. A full-genome phylogenetic analysis of varicella-zoster virus reveals a novel origin of replication-based genotyping scheme and evidence of recombination between major circulating clades. *J. Virol.* 2006; 80(19): 9850–60. <https://doi.org/10.1128/jvi.00715-06>
- Loparev V.N., Gonzalez A., Deleon-Carnes M., Tipples G., Fickenscher H., Torfason E.G., et al. Global identification of three major genotypes of varicella-zoster virus: longitudinal clustering and strategies for genotyping. *J. Virol.* 2004; 78(15): 8349–58. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.15.8349-8358.2004>
- Helmuth I.G., Mølbak K., Uldall P.V., Poulsen A. Post-varicella Arterial Ischemic Stroke in Denmark 2010 to 2016. *Pediatr. Neurol.* 2018; 80: 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2017.11.018>
- Tung Y.C., Tu H.P., Wu M.K., Kuo K.L., Su Y.F., Lu Y.Y., et al. Higher risk of herpes zoster in stroke patients. *PLoS One.* 2020;

- 15(2): e0228409. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228409>
20. Schmidt S.A.J., Langan S.M., Pedersen H.S., Schönheyder H.C., Thomas S.L., Smeeth L., et al. Mood disorders and risk of herpes zoster in 2 population-based case-control studies in Denmark and the United Kingdom. *Am. J. Epidemiol.* 2018; 187(5): 1019–28. <https://doi.org/10.1093/aje/kwx338>
 21. Sundström K., Weibull C.E., Söderberg-Löfdal K., Bergström T., Sparén P., Arnheim-Dahlström L. Incidence of herpes zoster and associated events including stroke – a population-based cohort study. *BMC Infect. Dis.* 2015; 15: 488. <https://doi.org/10.1186/s12879-015-1170-y>
 22. Jih J.S., Chen Y.J., Lin M.W., Chen Y.C., Chen T.J., Huang Y.L., et al. Epidemiological features and costs of herpes zoster in Taiwan: a national study 2000 to 2006. *Acta Derm. Venereol.* 2009; 89(6): 612–6. <https://doi.org/10.2340/00015555-0729>
 23. Liesz A., Dalpke A., Mracsko E., Antoine D.J., Roth S., Zhou W., et al. DAMP signaling is a key pathway inducing immune modulation after brain injury. *J. Neurosci.* 2015; 35(2): 583–98. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.2439-14.2015>
 24. Liu J., Wang M., Gan L., Yang S., Chen J. Genotyping of clinical varicella-zoster virus isolates collected in China. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(5): 1418–23. <https://doi.org/10.1128/jcm.01806-08>
 25. Sato B., Sommer M., Ito H., Arvin A.M. Requirement of varicella-zoster virus immediate-early 4 protein for viral replication. *J. Virol.* 2003; 77(22): 12369–72. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.22.12369-12372.2003>
 26. Tang S., Patel A., Krause P.R. Herpes simplex virus ICP27 regulates alternative pre-mRNA polyadenylation and splicing in a sequence-dependent manner. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2016; 113(43): 12256–61. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609695113>
 27. Rutkowski A.J., Erhard F., L'Hernault A., Bonfert T., Schilhabel M., Crump C., et al. Widespread disruption of host transcription termination in HSV-1 infection. *Nat. Commun.* 2015; 6: 7126. <https://doi.org/10.1038/ncomms8126>
 28. Kennedy P.G.E., Mogensen T.H., Cohrs R.J. Recent issues in varicella-zoster virus latency. *Viruses.* 2021; 13(10): 2018. <https://doi.org/10.3390/v13102018>
 29. Davison A.J. In: Arvin A.M., Gershon A.A., ed. *Varicella-Zoster Virus*. Cambridge: Cambridge University Press; 2000; 25–50. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511601194>
 30. Al-Khafaji Z.A., Mahmood T.A., Alhuchaimi S.N. Molecular study of varicella-zoster virus infection among individuals in Najaf province/Iraq. *Int. J. ChemTech Res.* 2017; 10(2): 683–91.

Information about the authors:

Zinah Fadhil Salim – Master Student, lecturer of Department of Biology, College of Science, University of Thi-Qar, Thi-Qar, Iraq. E-mail: Zeena.salim.ph@utq.edu.iq; za4389452@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0007-5565-502X>

Bushra Jabbar Hamad – Assistant Professor, lecturer of Department of Biology, College of Science, University of Thi-Qar, Nasiriyah, Iraq. E-mail: bushra.jh.bio@sci.utq.edu.iq; <https://orcid.org/0000-0002-5129-7700>

Contribution: Zinah Fadhil Salim – Conceptualization, Data Curation, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Software, Validation, Visualization, Writing – original draft and Writing – review & editing; Bushra Jabbar Hamad – Conceptualization, Data Curation, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Writing – original draft and Writing – review & editing.

Received 05 June 2024
Accepted 17 July 2024
Published 31 August 2024

Информация об авторах:

Zinah Fadhil Salim – студент, лектор Кафедры биологии, Научный колледж, Университет Ди-Кар, Ди-Кар, Ирак. E-mail: Zeena.salim.ph@utq.edu.iq; za4389452@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0007-5565-502X>;

Bushra Jabbar Hamad – доцент, лектор Кафедры биологии, Научный колледж, Университет Ди-Кар, Насирия, Ирак. E-mail: bushra.jh.bio@sci.utq.edu.iq; <https://orcid.org/0000-0002-5129-7700>

Участие авторов: Zinah Fadhil Salim – концепция, обработка данных, исследование, методология, администрирование проекта, ресурсы, программное обеспечение, проверка, визуализация, написание статьи, рецензирование и редактирование; Bushra Jabbar Hamad – концепция, обработка данных, исследование, методология, администрирование проекта, ресурсы, надзор, написание статьи, рецензирование и редактирование.

Поступила 05.06.2024
Принята в печать 17.07.2024
Опубликована 31.08.2024

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-250>

© АСАТРЯН М.Н., ШМЫР И.С., ТИМОФЕЕВ Б.И., ЩЕРБИНИН Д.Н., АГАСАРЯН В.Г., ТИМОФЕЕВА Т.А., ЕРШОВ И.Ф., ГЕРАСИМУК Э.Р., НОЗДРАЧЕВА А.В., СЕМЕНЕНКО Т.А., ЛОГУНОВ Д.Ю., ГИНЦБУРГ А.Л., 2024



Разработка, изучение и сравнение моделей перекрестного иммунитета к вирусу гриппа с применением статистических методов и машинного обучения

Асатрян М.Н.^{1✉}, Шмыр И.С.¹, Тимофеев Б.И.¹, Щербинин Д.Н.¹, Агасарян В.Г.¹, Тимофеева Т.А.¹, Ершов И.Ф.¹, Герасимук Э.Р.^{1,2}, Ноздрачева А.В.¹, Семененко Т.А.¹, Логунов Д.Ю.¹, Гинцбург А.Л.¹

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

²ФГБОУ ВО «Университет «Дубна», 141982, г. Дубна, Россия

Резюме

Введение. Всемирная организация здравоохранения в качестве одного из важнейших критериев оценки успешно проводимой вакцинации и способности предотвращать заболевание у населения рассматривает значения титров антител в реакции торможения гемагглютинации. Математическое моделирование перекрестного иммунитета позволяет оперативно выявлять новые антигенные варианты, что имеет первостепенное значение для эпидемиологического надзора и здоровья человека.

Материалы и методы. В настоящей работе применены статистические методы и техники машинного обучения от простого к сложному – регрессионная логистическая модель, метод случайного леса и градиентный бустинг. В расчетах, параллельно дистанции Хемминга, также использовали матрицы AAindex. Вычисления проводили с разными типами и величинами порогов антигенного ускользания, на четырех наборах данных (временных периодах). Результаты сравнивали по принятым метрикам бинарной классификации.

Результаты. Показана существенная дифференциация в зависимости от применяемых наборов данных. Лучшие результаты продемонстрировали все три модели на прогнозный осенний сезон 2022 г., предварительно обученные на февральском сезоне этого же года (AUROC 0,934; 0,958; 0,956 соответственно). Наименьшие результаты были получены на весь прогнозный 2023 г., настроенные на данных двух сезонов 2022 г. (AUCROC 0,614; 0,658; 0,775 соответственно). При этом зависимость результатов от применяемых типов порогов и их величин оказалась незначительной. Дополнительное применение матриц AAindex не улучшило существенно результаты моделей, но в то же время не внесло значимых ухудшений.

Заключение. Более сложные модели показывают лучший результат. При разработке моделей перекрестного иммунитета, для убедительного утверждения об их прогностической устойчивости важно проводить тестирование на разных наборах данных.

Ключевые слова: вирус гриппа А; подтип H3N2; титры антител в РТГА; перекрестный иммунитет; антигенное расстояние; антигенный сайт; дистанция Хемминга; базы AAindex; логистическая регрессия; метод случайного леса; градиентный бустинг; эпидемиологическая модель; иммунный ландшафт; вакцинный штамм; методы машинного обучения

Для цитирования: Асатрян М.Н., Шмыр И.С., Тимофеев Б.И., Щербинин Д.Н., Агасарян В.Г., Тимофеева Т.А., Ершов И.Ф., Герасимук Э.Р., Ноздрачева А.В., Семененко Т.А., Логунов Д. Ю., Гинцбург А.Л. Разработка, изучение и сравнение моделей перекрестного иммунитета к вирусу гриппа с применением статистических методов и машинного обучения. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(4): 349–362. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-250> EDN: <https://elibrary.ruphejeu>

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

Благодарности. Выражаем искреннюю благодарность сотрудникам Центра им. Н.Ф. Гамалеи, главному научному сотруднику Ф.И. Ершову, руководителю отдела экологии вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского Е.И. Бурцевой, руководителю лаборатории молекулярной биотехнологии М.М. Шмарову, ведущему научному сотруднику лаборатории физиологии вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского И.А. Рудневой за многочисленные консультации в процессе выполнения работы.

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

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-250>

Development, study, and comparison of models of cross-immunity to the influenza virus using statistical methods and machine learning

Marina N. Asatryan^{1✉}, Ilya S. Shmyr¹, Boris I. Timofeev¹, Dmitrii N. Shcherbinin¹, Vaagn G. Agasaryan¹, Tatiana A. Timofeeva¹, Ivan F. Ershov¹, Elita R. Gerasimuk^{1,2}, Anna V. Nozdracheva¹, Tatyana A. Semenenko¹, Denis Yu. Logunov¹, Aleksander L. Gintsburg¹

¹National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia;

²State University «Dubna», 141982, Dubna, Russia

Abstract

Introduction. The World Health Organization considers the values of antibody titers in the hemagglutination inhibition assay as one of the most important criteria for assessing successful vaccination. Mathematical modeling of cross-immunity allows for identification on a real-time basis of new antigenic variants, which is of paramount importance for human health.

Materials and methods. This study uses statistical methods and machine learning techniques from simple to complex: logistic regression model, random forest method, and gradient boosting. The calculations used the AAindex matrices in parallel to the Hamming distance. The calculations were carried out with different types and values of antigenic escape thresholds, on four data sets. The results were compared using common binary classification metrics.

Results. Significant differentiation is shown depending on the data sets used. The best results were demonstrated by all three models for the forecast autumn season of 2022, which were preliminary trained on the February season of the same year (Auroc 0.934; 0.958; 0.956, respectively). The lowest results were obtained for the entire forecast year 2023, they were set up on data from two seasons of 2022 (Aucroc 0.614; 0.658; 0.775). The dependence of the results on the types of thresholds used and their values turned out to be insignificant. The additional use of AAindex matrices did not significantly improve the results of the models without introducing significant deterioration.

Conclusion. More complex models show better results. When developing cross-immunity models, testing on a variety of data sets is important to make strong claims about their prognostic robustness.

Keywords: influenza A virus; subtype H3N2; antibody titers in HIA; cross immunity; antigenic distance; antigenic site; Hamming distance; AAindex databases; logistic regression; random forest method; gradient boosting; epidemiological model; immune landscape; vaccine strain, machine learning methods.

For citation: Asatryan M.N., Shmyr I.S., Timofeev B.I., Shcherbinin D.N., Agasaryan V.G., Timofeeva T.A., Ershov I.F., Gerasimuk E.R., Nozdracheva A.V., Semenenko T.A., Logunov D.Yu., Gintsburg A.L. Development, study and comparison of models of cross-immunity to the influenza virus using statistical methods and machine learning. *Voprosy virusologii (Problems of Virology)*. 2024; 69(4): 349–362. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-250> EDN: <https://elibrary.ru/phejeu>

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

Acknowledgements. We gratefully acknowledge the staff of the N.F. Gamaleya Center, Chief Researcher F.I. Ershov, Head of the Department of Virus Ecology at the Ivanovskiy Institute of Virology E.I. Burtseva, Head of the Laboratory of Molecular Biotechnology M.M. Shmarov, Leading Researcher at the Laboratory of Virus Physiology of the Ivanovskiy Institute of Virology I.A. Rudneva for numerous consultations during the study.

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

*Посвящается памяти д-ра биол. наук,
профессора Бориса Савельевича Народицкого
Dedicated to the memory of Doctor of Biological Sciences,
Professor Boris Savelyevich Naroditsky*

Введение

Общеизвестно, что вирус гриппа А, относящийся к семейству *Orthomyxoviridae* [1], обладает высокой мутационной изменчивостью, в связи с чем в циркулирующих штаммах (популяции) присутствуют

мутантные варианты, избегающие защитного действия антител, которые вырабатываются как в результате перенесенного заболевания, так и вакцинации. Мутантные формы вируса, несущие определенные замены и приводящие к конформационным изменениям

поверхностного белка, способны вызывать затруднения во взаимодействии антигенных сайтов с нейтрализующими антителами, что является важным при выборе и оценке штаммов для создания вакцин.

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) в качестве одного из важнейших критериев оценки успешно проводимой вакцинации и способности предотвращать заболевание у населения рассматривает значения титров антител в реакции торможения гемагглютинации (РТГА)¹. Вместе с тем лабораторно-экспериментальные исследования достаточно затратны по времени и трудоемки. Математическое моделирование перекрестного иммунитета позволяет оперативно выявлять новые антигенные варианты, что имеет первостепенное значение для эпидемиологического надзора и здоровья человека [2, 3].

Перспективным направлением является моделирование распространения вируса гриппа на больших временных интервалах, с учетом факторов сезонности и мутаций, для рекомендаций вакцинного штамма на предстоящий сезон. Коллективом НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи в 2020 г. была разработана и успешно зарегистрирована компьютерная программа Influenza IDE (эпидемиологическая мультиштаммовая модель (ЭММ)) с моделью перекрестного иммунитета и постоянно обновляющейся базой данных разных видов и подтипов вируса гриппа Influenza DB [4]. ЭММ использует популяционную (агентную) модель для имитации распространения вируса гриппа среди населения, а также вложенные модели (перекрестного иммунитета и иммунного ответа) для формирования иммунного ландшафта (количественного распределения антигенных вариантов с выработанными на них антителами среди населения к рассматриваемому моменту времени в соответствии с индивидуальными историями болезней агентов (индивидуумов)), непосредственно влияющего на скорость и степень распространения отдельных штаммов вируса гриппа среди населения, и на его фоне рекомендует наиболее эффективный вакцинный штамм. Компьютерная программа спроектирована с возможностью интегрирования многочисленных моделей перекрестного иммунитета [5]. В рамках исследований по модификации компьютерной программы коллективом авторов проводятся разработки моделей перекрестного иммунитета на примере вируса гриппа A(H3N2) с использованием математических методов.

Цель исследования – разработка, изучение и сравнение моделей перекрестного иммунитета с применением статистических методов и машинного обучения.

Материалы и методы

Описание данных

Для разработки моделей и расчетов использовался массив данных Influenza DB с информацией из:

– опубликованных ежесезонных данных ВОЗ по результатам тестирования сывороток в РТГА (весь массив данных с 2014–2023 гг.: как референсных, так и тестовых штаммов вируса гриппа A(H3N2));

– платформы GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data) (последовательности и сопроводительная информация).

После очистки и согласования данных из GISAID с последующим выравниванием на референсную последовательность и объединением в антигенные сайты, согласно предложенному собственному лекалу, формировали матрицу дистанций Хемминга для каждого из 6 антигенных сайтов (с присвоением каждой последовательности уникального идентификатора).

В предыдущих вычислениях [5] с помощью настройки и прогноза на более поздние данные мы показали, что на точность результатов оказывают существенное влияние объем и качество проводимых исследований РТГА. Для разработки моделей перекрестного иммунитета было выбрано подмножество с наибольшим количеством (36 509) наблюдений Cell-Cell (с пассажной историей в культуре клеток). Учитывая принципиальное увеличение наблюдений в 2022 и 2023 гг., мы приняли решение в качестве прогнозных периодов выбрать эти сезоны. А в качестве ретроспективных настраиваемых периодов – промежутки с 2014 по 2021 г., также 2022 и 2023 гг. соответственно (**табл. 1**).

В предшествующих расчетах в качестве значений дистанции Хемминга использовали целые числовые значения в соответствии с количеством аминокислотных замен (например, 0, 1, 2, 3 ... 8). Для более чувствительного анализа, оценки вклада каждой аминокислоты и сравнения в настоящем исследовании применяли матрицы AAindex. Это база данных числовых показателей, отражающих разные физико-химические и биохимические свойства аминокислот и аминокислотных пар. Тем самым параллельно заменяли значение дистанции Хемминга на присущее числовое значение конкретной физико-химической характеристики.

База данных AAindex состоит из трех разделов и выпускается ежегодно. Матрицы представлены в виде плоских файлов: AAindex1 для индексов аминокислот, AAindex2 для матриц аминокислотных замен и AAindex3 для потенциалов контакта аминокислот. В настоящее время исследователями продолжается сбор и пополнение базы данных с расширением коллекции² [6].

Определение антигенного расстояния и выбор порогов

Общепринятым «золотым стандартом» для оценки присутствия и определения концентрации вируснейтрализующих антител в исследуемых образцах сыворотки является реакция торможения гемагглютина-

¹WHO. World Health Organization. Available at: <https://www.who.int/initiatives/global-influenza-surveillance-and-response-system> (accessed June 24, 2024).

²DBGET/LinkDB в GenomeNet (http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind?aaindex; <ftp://ftp.genome.jp/pub/db/community/aaindex/>).

Таблица 1. Характеристика данных

Table 1. Data characteristics

Обучение модели / Model training			Тестирование модели / Model testing		
период period	число пар штаммов number of strain pairs	титр titer	период period	число пар штаммов number of strain pairs	титр titer
2014–2021	10 272	160 [40; 320]	2022	8183	80 [40; 320]
2022	8183	80 [40; 320]	2023	6143	160 [80; 320]
2023 (фев.) / (feb.)	2518	80 [40; 320]	2023 (сен.) / (sep.)	3689	160 [80; 320]
2022 (фев.) / (feb.)	1994	160 [40; 320]	2022 (сен.) / (sep.)	6675	80 [40; 320]

ции (РТГА). По сути, в РТГА оценивается уровень перекрестного иммунитета против вируса гриппа [7–9].

В значительном числе работ по изучению антигенных различий между штаммами (антигенного расстояния) в качестве меры перекрестного иммунитета при инфицировании и/или для изучения эффективности вакцин используют как сами значения титров, так и различные выражения от титров РТГА или логарифмы от этих выражений: $R_{ij} = c_{ij} / c_{ii}$ [10]; $\log_2(R_{ij})$ [11–13]. При этом определенные значения указанных титров и выражений могут свидетельствовать о наличии или отсутствии защиты против инфицирования конкретным штаммом вируса гриппа. В этом случае переходное значение называют порогом антигенного ускользания. Значения вероятностных порогов антигенного ускользания, выраженных в титрах, основываясь на данных научной литературы, для текущей работы определили как 1 : 40 и 1 : 80 [14, 15].

Кроме того, общеизвестно, что на результаты существенно влияют индивидуальные особенности лабораторных животных. Чтобы уменьшить влияние этих факторов, в качестве порога антигенного ускользания принимается не само значение титра, а соотношение титра рассматриваемой реакции, нормированное на его максимальное разведение для данной сыворотки. В настоящей работе было решено провести расчеты для всего массива тестовых штаммов и взять в качестве порогов антигенного ускользания соотношение максимального значения титра в проведенном эксперименте и значение титра тестового штамма ($ref_max/titer$) больше 4; и больше или равно 4 [12, 13, 16–19].

Таким образом, для дальнейших расчетов были применены пороги антигенного ускользания, выраженные в титрах (разведения 1 : 40; 1 : 80), и нормированные ($ref_max/titer > 4$; $ref_max/titer \geq 4$).

Модели перекрестного иммунитета

Для выбранной цели и для решения задач бинарной классификации (антигенного ускользания) рассматривали статистические методы и техники машинного обучения: от простого к сложному, такие как регрессионная логистическая модель, метод случайного леса (*random forest*) и градиентный бустинг (*gradient boosting*).

Логистическая регрессия (logistic regression) – тип статистического моделирования, который позво-

ляет количественно связать одну или несколько независимых переменных (предикторов) с бинарным признаком через определение отношения шансов возможных исходов [20].

Метод случайного леса (random forest) – алгоритм машинного обучения, заключающийся в использовании ансамбля деревьев решений. Деревья решений – непараметрический алгоритм, используемый для решения задач классификации и регрессии. Алгоритм работает по принципу древовидной структуры, где каждый внутренний узел представляет собой проверку значения некоторого атрибута, каждая ветвь – результат этой проверки, а каждый листовой узел – метку класса или числовое значение. При классификации методом случайных деревьев объект относится к классу, который выбрало большинство деревьев решений, входящих в ансамбль³.

Градиентный бустинг (gradient boosting) – техника машинного обучения, которая используется для задач классификации и регрессии. Основная идея градиентного бустинга заключается в построении ансамбля слабых моделей, обычно деревьев принятия решений, таким образом, что каждая последующая модель корректирует ошибки, допущенные предыдущими моделями [21]. В рамках настоящей работы для реализации градиентного бустинга была использована библиотека CatBoost⁴.

Для предварительной обработки данных, описательной статистики, обучения и оценки качества моделей использовали библиотеки языка программирования Python:

- pandasql 0.7.3 – предварительная обработка данных;
- pandas 2.0.3 – описательная статистика, оформленные результаты;
- sklearn 1.2.2 – логистическая регрессия, метод случайного леса, оценка качества моделей;
- matplotlib 3.7.1 – графики.

Анализ стабильности прогностической способности моделей перекрестного иммунитета проводили на основе ретроспективных данных с наибольшим

³IBM. Available at: <https://www.ibm.com/topics/random-forest>

⁴Catboost. Available at: <https://catboost.ai/en/docs/> (accessed June 24, 2024).

числом наблюдений с последующим прогнозом. В качестве меры адекватности (качества и точности прогноза) моделей и сравнения различных алгоритмов использовали принятые в задачах машинного обучения метрики качества (показатели, которые зависят от результатов классификации и не зависят от внутреннего состояния модели):

– **Accuracy** (точность) – доля воспроизводимости правильных результатов модели;

– **Sensitivity** (чувствительность) (полнота) или доля истинно положительных результатов (true positive rate, TPR), определяется как число истинно положительных классификаций относительно общего числа положительных наблюдений;

– **Specificity** (специфичность) – доля истинно отрицательных результатов (true negative rate, TNR), определяется как число истинно отрицательных классификаций в общем числе отрицательных классификаций;

– **MCC** (коэффициент корреляции Мэтьюса) – сбалансированная мера эффективности, которую можно использовать, даже если один класс содержит гораздо больше выборок, чем другой. Диапазон значений: от -1 до $+1$;

– **F1** (F-мера, или F-score) – сбалансированная метрика, объединяющая в себе информацию о точности (precision) и чувствительности (полноте) с использованием их среднего гармонического значения. Максимизация F1 достигается при одновременном равенстве единице полноты и точности^{5,6}.

Также использовали **ROC-анализ** как наиболее объединенный показатель адекватности модели. ROC-кривая показывает зависимость числа верно классифицированных положительных примеров от количества неверно классифицированных отрицательных примеров. Количественную интерпретацию ROC-анализа дает показатель AUC (Area Under Curve, площадь под ROC-кривой). Чем выше показатель AUROC, тем качественнее классификатор. Обычно применяется следующая градация: отлично ($0,9-1,0$); очень хорошо ($0,8-0,9$); хорошо ($0,7-0,8$); средне ($0,6-0,7$); неудовлетворительно ($0,5-0,6$)^{7,8}.

Исследования проводили согласно дизайну, представленному на **рис. 1**.

Результаты

В настоящем исследовании бинарную классификацию, реализованную с помощью разных методов (регрессионная логистическая модель, метод случайного леса (*random forest*) и градиентный бустинг (*gradient boosting*)) применяли для предсказания вероятности возникновения определенного исхода (защищен или нет) по значениям титров в разведениях ($1 : 40$; $1 : 80$) или нормированных ($\text{ref_max/titer} > 4$; $\text{ref_max/titer} \geq 4$).

Пороги, выраженные в титрах (разведения $1 : 40$ и $1 : 80$)

В расчетах в качестве порогового значения перекрестного иммунитета между двумя произвольными штаммами было решено взять величину титра РТГА в разведении как от 40 , так и от 80 .

Распределение положительного признака (антигенного ускользания) для порогов $1 : 40$ и $1 : 80$ как во всех настраиваемых, так и прогнозных периодах варьировалось от 30 до 40% и от 47 до 53% соответственно. Исключение составил 2023 г., в котором для порога $1 : 80$ ранжирование этого же признака менялось от 37 до 44% , а для порога $1 : 40$ – от 15 до 26% . Подробная информация для всех порогов и периодов представлена в **Приложении**.

Для каждого временного отрезка все три модели настраивали и тестировали согласно дизайну исследования. Результаты расчетов по всем трем моделям в титрах ($1 : 40$) представлены в **табл. 2** и на графиках (**рис. 2–5**). Оценку адекватности каждой модели на выбранных прогнозных периодах определяли с помощью общепринятых показателей.

Как видно из **табл. 2**, более сложные модели демонстрируют лучший результат практически по всем показателям. Выбиваются из этого ряда с небольшой разницей результаты для прогнозного периода 2023 г., с предварительного настроенного периодом за 2022 г. Что касается сравнения отдельных показателей по всем трем моделям, то следует обратить внимание на величины специфичности и чувствительности. По всем прогнозным и настраиваемым периодам обе метрики сбалансированы. Исключение составляет прогнозный период 2023 г., настроенный на 2022 г., в котором наблюдаются высокие значения для чувствительности и низкие для специфичности.

На **рис. 2–5** представлены результаты ROC-анализа всех трех моделей. Согласно принятой метрике качества классификатора, хорошие показатели под ROC-кривой иллюстрируют все три модели на прогнозный 2023 г. с предварительным обучением на данных за 2022 г. Очень хорошие результаты получились для настроенного периода с 2014 по 2021 г. с прогнозом на 2022 г. Аналогичные результаты показал прогнозный сентябрьский сезон 2023 г., с предварительным настроенным на февральский период этого же года. Достаточно устойчивыми оказались результаты всех трех моделей на прогнозный осенний сезон 2022 г. Обученные на февральском сезоне 2022 г. модели продемонстрировали отличные значения показателей

⁵Top 10 Machine Learning Evaluation Metrics for Classification – Implemented In R. 2022. Available at: <https://www.appsilon.com/post/machine-learning-evaluation-metrics-classification> (accessed June 24, 2024).

⁶F1 Score in Machine Learning: Intro & Calculation. 2022. Available at: <https://www.v7labs.com/blog/f1-score-guide> (accessed June 24, 2024).

⁷Метрики качества моделей бинарной классификации. 2023. Available at: <https://loginom.ru/blog/classification-quality> (accessed June 24, 2024).

⁸Оценка результатов экспериментов с автоматизированным машинным обучением. Microsoft Learn. 2023. Available at: <https://learn.microsoft.com/ru-ru/azure/machine-learning/how-to-understand-automated-ml?view=azureml-api-2>

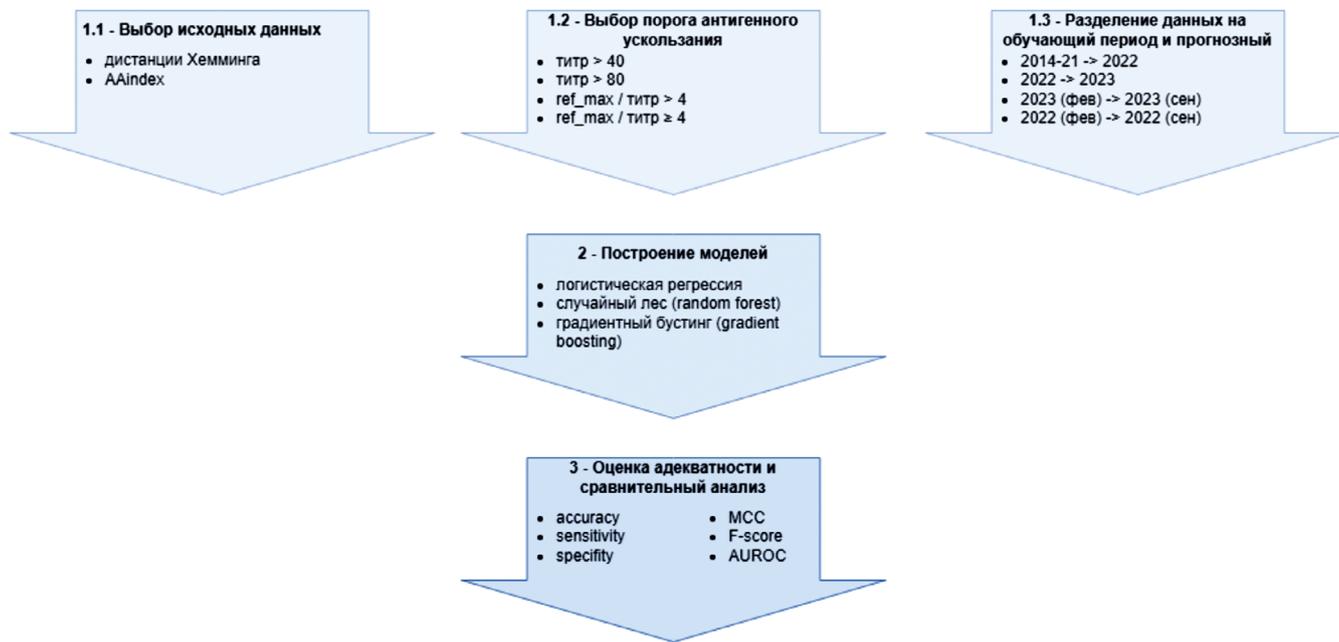


Рис. 1. Блок-схема исследования.

1.1. Выбор исходных данных; 1.2. Выбор порога антигенного ускользания; 1.3. Разделение данных на обучающий период и прогнозный; 2. Построение моделей; 3. Оценка адекватности и сравнительный анализ. Пояснения в тексте.

Fig. 1. Study flowchart.

1.1. Selection of source data; 1.2. Selecting the threshold for antigen release; 1.3. Dividing the data into a training and a forecast periods; 2. Model development; 3. Adequacy assessment and comparative analysis. Explanations in the text.

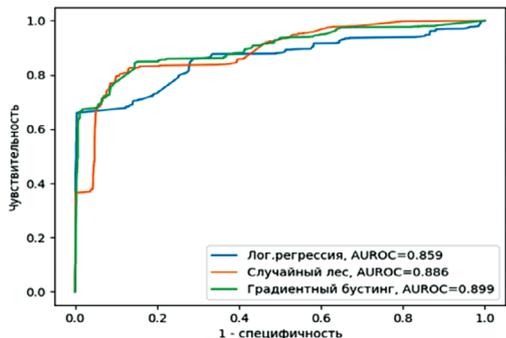


Рис. 2. 2014–2021 => 2022 (1 : 40).

Здесь и на рис. 3–5: модель логистической регрессии выделена синим цветом; случайного леса – желтым цветом; градиентного бустинга – зеленым цветом, для одного типа порога, выраженного в титрах (разведение 1 : 40). По оси Y отложена чувствительность (sensitivity), а по оси X отложена: 1 минус специфичность (specificity). Пояснения в тексте.

Fig. 2. 2014–2021 => 2022 (1 : 40).

Here and in Fig. 3–5: the logistic regression model is shown in blue; random forest – in yellow; gradient boosting – in green, for one type of threshold expressed in titers (dilution 1 : 40). The sensitivity is plotted on the Y-axis, and the 1 minus specificity represent on the X-axis. Explanations are given in the text.

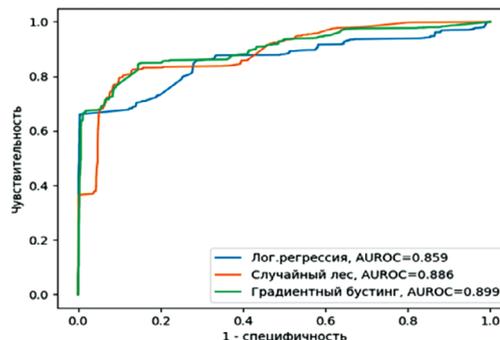


Рис. 3. 2022 (фев.) => 2022 (сен.) (1 : 40).

Fig. 3. 2022 (feb.) => 2022 (sep.) (1 : 40).

AUROC. Эти результаты совпадают с нашими показателями с применением множественной линейной регрессии [4].

Мы также решили проверить качество наших моделей для порогового значения титра перекрестного иммунитета, равного 80. Подробные расчеты (таблицы, ROC-кривые) представлены в Приложении.

При сравнении результатов, полученных с использованием различных значений порогового ускользания, привлекает внимание тот факт, что вне зависимости от значения порога, при всех настраиваемых периодах, сохраняются тенденции: лучшие результаты получились при прогнозе на 2022 г. и чуть умеренные при прогнозе на 2023 г.

Таблица 2. Порог в титрах (1 : 40)

Table 2. Threshold titer (1 : 40)

Параметр Parameter	Accuracy	Sensitivity	Specificity	MCC	F1	AUROC
2014–2021 => 2022						
Лог. регрессия Logistic regression	0,764	0,704	0,858	0,548	0,785	0,859
Случайный лес Random forest	0,803	0,727	0,924	0,635	0,819	0,886
Градиентный бустинг Gradient boosting	0,814	0,750	0,913	0,647	0,831	0,899
2022 (фев. / feb.) => 2022 (сен. / sep.)						
Лог. регрессия Logistic regression	0,861	0,804	0,949	0,735	0,875	0,934
Случайный лес Random forest	0,886	0,931	0,815	0,759	0,909	0,958
Градиентный бустинг Gradient boosting	0,880	0,944	0,781	0,747	0,906	0,956
2023 (фев. / feb.) => 2023 (сен. / sep.)						
Лог. регрессия Logistic regression	0,637	0,607	0,806	0,297	0,739	0,760
Случайный лес Random forest	0,734	0,719	0,815	0,399	0,821	0,854
Градиентный бустинг Gradient boosting	0,869	0,953	0,402	0,420	0,925	0,851
2022 => 2023						
Лог. регрессия Logistic regression	0,837	0,970	0,304	0,393	0,905	0,775
Случайный лес Random forest	0,838	0,968	0,316	0,398	0,905	0,658
Градиентный бустинг Gradient boosting	0,837	0,968	0,311	0,395	0,905	0,614

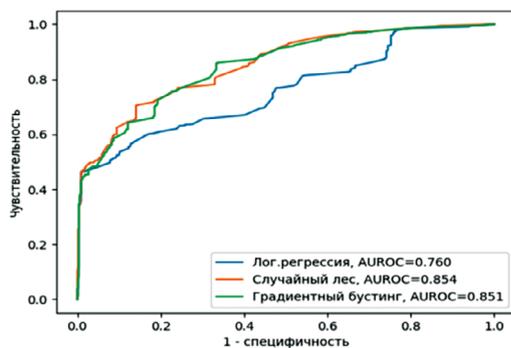


Рис. 4. 2023 (фев.) => 2023 (сен.) (1 : 40).

Fig. 4. 2023 (feb.) => 2023 (sep.) (1 : 40).

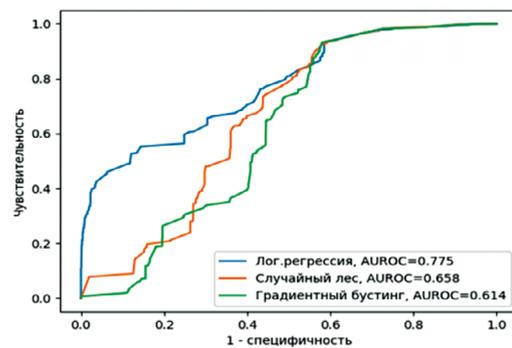


Рис. 5. 2022 => 2023 (1 : 40).

Fig. 5. 2022 => 2023 (1 : 40).

Пороги, выраженные соотношением $ref_max/titer > 4$ и $ref_max/titer \geq 4$

Как уже не раз отмечалось исследователями, несмотря на все усилия по стандартизации проведения РТГА [22], изначально заложенная высокая погрешность методики РТГА (17%) [23] остается фактором, существенно влияющим на результаты. Кроме того,

на конечный итог существенно влияют индивидуальные особенности лабораторных животных. Чтобы уменьшить влияние этих факторов, в качестве порога антигенного ускользания мы в расчетах применили нормированный $ref_max/titre > 4$ и ≥ 4 .

Наблюдается достаточно ровное распределение положительного признака (антигенного ускольза-

Таблица 3. Нормированный порог больше 4

Table 3. Threshold normalized more than 4

Параметр Parameter	Accuracy	Sensitivity	Specificity	MCC	F1	AUROC
2014–2021 => 2022						
Лог. регрессия Logistic regression	0,817	0,915	0,714	0,644	0,836	0,840
Случайный лес Random forest	0,816	0,893	0,736	0,638	0,832	0,861
Градиентный бустинг Gradient boosting	0,821	0,900	0,738	0,648	0,837	0,899
2022 (фев. / feb.) => 2022 (сен. / sep.)						
Лог. регрессия Logistic regression	0,883	0,929	0,837	0,769	0,888	0,942
Случайный лес Random forest	0,890	0,897	0,883	0,780	0,891	0,951
Градиентный бустинг Gradient boosting	0,890	0,904	0,876	0,781	0,892	0,951
2023 (фев. / feb.) => 2023 (сен. / sep.)						
Лог. регрессия Logistic regression	0,750	0,791	0,715	0,505	0,745	0,821
Случайный лес Random forest	0,770	0,840	0,710	0,550	0,771	0,849
Градиентный бустинг Gradient boosting	0,762	0,804	0,726	0,528	0,757	0,848
2022 => 2023						
Лог. регрессия Logistic regression	0,624	0,249	0,965	0,310	0,386	0,664
Случайный лес Random forest	0,613	0,257	0,938	0,268	0,388	0,748
Градиентный бустинг Gradient boosting	0,614	0,259	0,937	0,268	0,389	0,725

ния) для нормированного порога $ref_max/titre > 4$ как во всех настраиваемых, так и прогнозных периодах – от 44 до 54%. Для нормированного порога $ref_max/titre \geq 4$ ранжирование этого же признака меняется от 21 до 28%. Подробная информация представлена в Приложении.

Как видно из табл. 3, сохраняются тенденции с результатами расчетов с применением порога, равного 40. Как и в предыдущем случае, от общего тренда отличаются результаты для прогнозного периода 2023 г., с предварительно настроенным периодом за 2022 г.

На рис. 6–9 представлены результаты ROC-анализа всех трех моделей для нормированного порога (> 4).

Во всех прогнозных периодах значения площадей под ROC-кривыми больше 0,8, как и в случае расчетов для порогов, выраженных в титрах (1 : 40 и 1 : 80), за исключением графиков на рис. 9, где величина AU-ROC больше 0,7 для моделей случайного леса и градиентного бустинга.

Основной причиной меньших показателей AU-ROC является низкая чувствительность моделей. Следует отметить, что в отличие от типа порога

(1 : 40 и 1 : 80) для периода, настроенного на данных 2022 г., и прогноза на 2023 г. логистическая регрессия показывает меньший результат, чем в случае более сложных моделей.

Результаты для нормированного порога, больше и равного 4, в целом аналогичны, для всех периодов, но, как и ожидалось, имеют более высокую чувствительность и слабую специфичность. Особенно заметна разница на прогнозе 2023 г., настроенном на данных 2022 г. Полные расчеты представлены в Приложении.

Применение матриц AAindex

На следующем этапе исследований применяли матрицы AAindex, тем самым заменяя значение дистанции Хемминга на присущее числовое значение конкретной физико-химической и биохимической характеристики. Зарубежные коллеги в своих исследованиях применяли матрицы AAindex в разных комбинациях. Они представлены довольно солидным количеством. И применять все матрицы без подтвержденной теории или логики мы сочли напрасным. Таким образом, было принято решение сначала

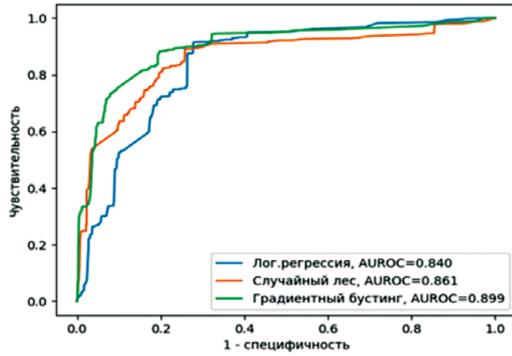


Рис. 6. 2014–2021 => 2022 (> 4).

Здесь и на рис. 7–9: модели логистической регрессии выделены синим цветом; случайного леса – желтым цветом; градиентного бустинга – зеленым цветом. По оси *Y* отложена чувствительность (sensitivity), а по оси *X* отложена: 1 минус специфичность (specificity). Пояснения в тексте.

Fig. 6. 2014–2021 => 2022 (> 4).

Here and in Fig. 7–9: logistic regression models are shown in blue; random forest models are shown in yellow; gradient boosting models are shown in green. Sensitivity is plotted on the *Y*-axis, and 1 minus specificity represents on the *X*-axis. Explanations are given in the text.

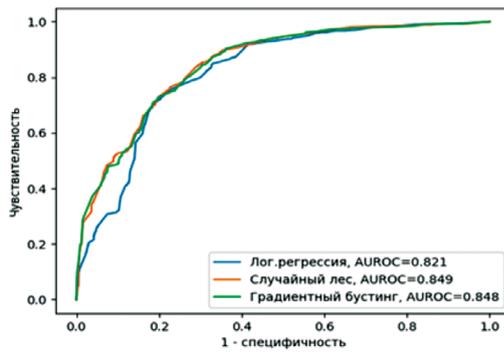


Рис. 8. 2023 (фев) => 2023 (сен.) (> 4).

Fig. 8. 2023 (feb) => 2023 (sep.) (> 4).

использовать наиболее часто пересекающиеся матрицы, показавшие лучшие результаты у коллег [24–27] и далее провести сравнение полученных результатов:

– AZAE970101 The single residue substitution matrix from interchanges of spatially neighbouring residues (Azarya-Sprinzak и соавт., 1997).

– BENS940104 Genetic code matrix (Benner и соавт., 1994).

– MUET010101 Non-symmetric substitution matrix (SLIM) for detection of homologous transmembrane proteins (Mueller и соавт., 2001).

Результаты расчетов по всем трем моделям для порога в титрах (1 : 40) и нормированных больше 4 представлены в табл. 4, 5. Все остальные расчеты представлены в Приложении.

На основе представленных в табл. 4–5 сравнительных результатов можно констатировать, что показатели AUROC, рассчитанные как с помощью дистанции Хемминга, так и с использованием выбранных матриц AAindex, существенно не отличаются. Обращает на себя внимание тот факт, что в основном выполняется правило: более сложные модели демонстрируют луч-

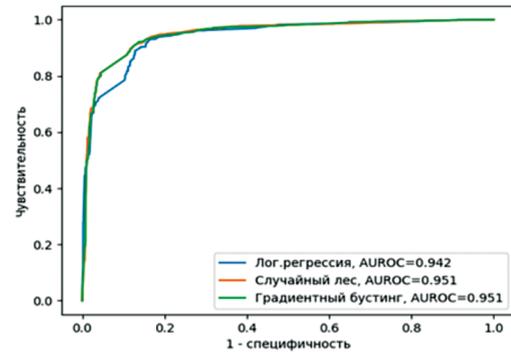


Рис. 7. 2022 (фев.) => 2022 (сен.) (> 4).

Fig. 7. 2022 (feb.) => 2022 (sep.) (> 4).

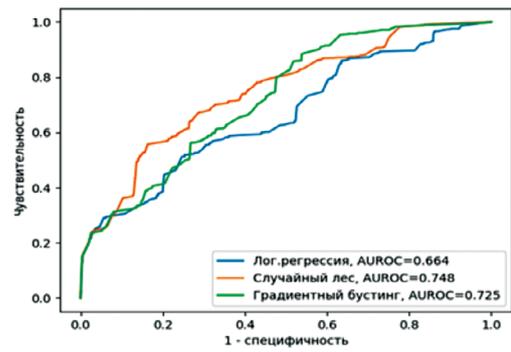


Рис. 9. 2022 => 2023 (> 4).

Fig. 9. 2022 => 2023 (> 4).

ший результат, включая прогноз для периода 2023 г., настроенного на данных 2022 г., с нормированным порогом больше 4. Для вычислений с матрицами AAindex это правило выполняется лучше, лишь с единичными исключениями. Результаты полных исследований представлены в Приложении.

Обсуждение

Основной целью настоящей работы было изучение влияния разных типов применяемых моделей перекрестного иммунитета на результаты исследования. Для более объективной и устойчивой оценки обучали и тестировали разработанные нами модели на разных временных периодах. При этом варьировали как тип порога антигенного усвоения, так и его значение.

В основном, как и ожидалось, более сложные модели продемонстрировали лучший результат. Единственный временной период с применением типа порога, выраженного в титрах (1 : 40; 1 : 80), выбивающийся из этой закономерности, – это прогнозный период 2023 г., с предварительно настроенным периодом за 2022 г., где лучший результат показала наибо-

Таблица 4. Порог в титрах (1 : 40). Сравнение результатов

Table 4. Threshold titer (1 : 40). Comparison of results

Параметр Parameter	Дистанция Хемминга Hamming distance	AAindex-AZAE_40	AAindex-BENS_40	AAindex-MUET_40
	AUROC	AUROC	AUROC	AUROC
2014–2021 => 2022				
Лог. регрессия Logistic regression	0,850	0,856	0,857	0,874
Случайный лес Random forest	0,879	0,876	0,878	0,878
Градиентный бустинг Gradient boosting	0,893	0,894	0,908	0,898
2022 (фев. / feb.) => 2022 (сен. / sep.)				
Лог. регрессия Logistic regression	0,912	0,887	0,937	0,932
Случайный лес Random forest	0,958	0,956	0,958	0,957
Градиентный бустинг Gradient boosting	0,956	0,957	0,959	0,957
2023 (фев. / feb.) => 2023 (сен. / sep.)				
Лог. регрессия Logistic regression	0,772	0,796	0,758	0,790
Случайный лес Random forest	0,854	0,882	0,886	0,884
Градиентный бустинг Gradient boosting	0,851	0,883	0,878	0,875
2022 => 2023				
Лог. регрессия Logistic regression	0,790	0,685	0,749	0,737
Случайный лес Random forest	0,659	0,654	0,659	0,649
Градиентный бустинг Gradient boosting	0,624	0,629	0,581	0,590

лее простая модель логистической регрессии. В то же время важно отметить, что наши расчеты однозначно продемонстрировали существенное влияние рассматриваемых временных периодов, т.е. массивов данных, на результаты прогноза.

Наилучшие результаты прогноза, с применением всех видов моделей и различных типов величин порогов антигенного ускользания были получены на сентябрьский сезон 2022 г., предварительно настроенный на февральском сезоне. Хорошие результаты прогноза на полный 2022 г. продемонстрировали модели, обученные на данных с 2014 по 2021 г. Далее в убывающей градации представлены результаты прогноза на февральский период 2023 г., с настроенным сентябрьским сезоном этого же года. И самые низкие значения показали вычисления на полный 2023 г., с обучением на данных двух сезонов 2022 г.

При сравнении результатов с применением различных типов порогов антигенного ускользания не выявлены существенные отличия. При этом следует отметить, что для значения порогов в титрах (1 : 80) и нормированного больше 4 распределение исследуемого

признака антигенного ускользания (положительного исхода) более равномерное, от 37 до 54% соответственно. Несколько другое, более резкое распределение положительного исхода (от 15 до 40%), демонстрируют результаты, полученные для значений порогов в титрах (1 : 40) и нормированного ≥ 4 .

Также привлекает внимание тот факт, что при замене величины порога, выраженного как в титрах, так и нормированного, с меньшего значения на большее, в некоторой степени взаимосвязанными выступают два конкретных параметра оценки моделей, чувствительность и специфичность. В расчетах чувствительность увеличивается и уменьшается специфичность.

Впервые очень высокие результаты прогноза на сентябрьский сезон 2022 г., с предварительно настроенной моделью на февральских данных этого же года, были получены в ранней работе [5] с использованием беспрецедентного количества данных за 2022 г. В настоящем исследовании мы повторили расчеты подобным образом, но уже с применением разработанных новых моделей. Дополнительно провели аналогич-

Таблица 5. Нормированный порог больше 4. Сравнение результатов

Table 5. Threshold normalized more than 4. Comparison of results

Параметр Parameter	Дистанция Хемминга Hamming distance	AAindex-AZAE ref_max/titre >4	AAindex-BENS ref_max/titre >4	AAindex-MUET ref_max/titre >4
	AUROC	AUROC	AUROC	AUROC
2014–2021 => 2022				
Лог. регрессия Logistic regression	0,821	0,833	0,762	0,821
Случайный лес Random forest	0,876	0,881	0,880	0,884
Градиентный бустинг Gradient boosting	0,899	0,884	0,904	0,908
2022 (фев. / feb.) => 2022 (сен. / sep.)				
Лог. регрессия Logistic regression	0,936	0,902	0,944	0,943
Случайный лес Random forest	0,950	0,941	0,948	0,947
Градиентный бустинг Gradient boosting	0,951	0,946	0,950	0,943
2023 (фев. /feb.) => 2023 (сен. / sep.)				
Лог. регрессия Logistic regression	0,819	0,821	0,820	0,823
Случайный лес Random forest	0,848	0,842	0,846	0,841
Градиентный бустинг Gradient boosting	0,848	0,844	0,849	0,848
2022 => 2023				
Лог. регрессия Logistic regression	0,740	0,575	0,644	0,709
Случайный лес Random forest	0,734	0,732	0,739	0,747
Градиентный бустинг Gradient boosting	0,714	0,714	0,676	0,736

ные расчеты с данными за 2023 г. И в первом и во втором случае получены хорошие результаты. Устойчивость предложенного подхода необходимо проверить на данных следующих сезонов.

Активное использование баз данных AAindex в разработке моделей перекрестного иммунитета было отмечено в ряде научных работ за последние годы [24–27]. Поскольку матрицы AAindex содержат числовые показатели, отражающие разные физико-химические свойства аминокислот и пар аминокислот, то, предположительно, их использование в расчетах должно привести к улучшению точности модели.

Проведенные нами расчеты с применением трех матриц AAindex, выбранных по принципу наиболее часто пересекающихся матриц в нескольких зарубежных научных работах, не показали существенного улучшения результатов. При этом необходимо отметить, что их применение не ухудшило результаты.

Вышеизложенное может свидетельствовать о том, что для объективной оценки результатов при использовании конкретных матриц AAindex необходимо

биологическое обоснование целесообразности их применения в том или ином случае.

В опубликованных к настоящему моменту исследованиях по разработке моделей перекрестного иммунитета авторы обычно используют один набор данных, на которых проводят обучение модели, а на другом множестве данных выполняется ее тестирование. Бывают случаи, когда вся выборка (совокупность данных) случайным образом делится на две части, при этом больший объем предназначен для настройки модели, а меньшее количество для валидации [13, 16, 24, 27–31]. Результаты текущей работы показывают, что такой алгоритм недостаточен для обоснования предсказательной способности модели. Наши вычисления позволяют утверждать, что результаты достаточно сильно отличаются в зависимости от использованных наборов данных. Чтобы обойти это ограничение и убедительно утверждать о прогностической устойчивости модели, на наш взгляд, необходимо проводить как настройку, так и тестирование на нескольких разных множествах.

Заключение

В рамках текущих исследований разработанные статистическими методами и машинного обучения более сложные модели продемонстрировали лучший результат. При этом выборочное применение типов порогов антигенного ускользания и замена его численных значений не вносят существенного вклада. Их выбор должен обосновываться факторами, независимыми от самой модели.

Для моделей перекрестного иммунитета, основанных на поиске зависимости титров РТГА от изменений в аминокислотных позициях последовательностей вируса гриппа, важно и необходимо проводить обучение и тестирование на различных множествах (наборах данных).

Имеющийся задел знаний и навыки исследователей как в техническом, так и биологическом направлениях позволяют осуществлять дальнейшее развитие моделей перекрестного иммунитета, с применением более сложных техник глубокого обучения.

ЛИТЕРАТУРА

- Walker P.J., Siddell S.G., Lefkowitz E.J., Mushegian A.R., Adriaenssens E.M., Alfenas-Zerbini P., et al. Recent changes to viruses taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* 2022; 167(11): 2429–40. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05516-5>
- Chen J., Li K., Rong H., Bilal K., Yang N., Li K. A disease diagnosis and treatment recommendation system based on big data mining and cloud computing. *Inf. Sci.* 2018; 435: 124–49. <https://doi.org/10.1016/j.ins.2018.01.001>
- Qiu J., Qiu T., Yang Y., Wu D., Cao Z. Incorporating structure context of HA protein to improve antigenicity calculation for influenza virus A/H3N2. *Sci. Rep.* 2016; 6: 31156. <https://doi.org/10.1038/srep31156>
- Асарян М.Н., Агасарян В.Г., Щербинин Д.Н., Тимофеев Б.И., Ершов И.Ф., Шмыр И.С. и др. Influenza IDE. Патент РФ № 2020617965; 2020.
- Асарян М.Н., Тимофеев Б.И., Шмыр И.С., Хачатрян К.Р., Щербинин Д.Н., Тимофеева Т.А. и др. Математическая модель для оценки уровня перекрестного иммунитета между штаммами вируса гриппа подтипа H3N2. *Вопросы вирусологии.* 2023; 68(3): 252–64. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-179> <https://elibrary.ru/rexvea>
- Nakai K., Kidera A., Kanehisa M. Cluster analysis of amino acid indices for prediction of protein structure and function. *Protein Eng.* 1988; 2(2): 93–100. <https://doi.org/10.1093/protein/2.2.93>
- Virology Research Services. The Hemagglutination Inhibition Assay; 2023. Available at: <https://virologyresearchservices.com/2023/04/07/understanding-the-hai-assay/>
- Spackman E., Sitaras I. Hemagglutination Inhibition Assay. In: *Animal Influenza Virus*. 2020; 11–28. Available at: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-0346-8_2
- Kaufmann L., Syedbasha M., Vogt D., Hollenstein Y., Hartmann J., Linnik J.E., et al. An optimized Hemagglutination Inhibition (HI) assay to quantify influenza-specific antibody titers. *J. Vis Exp.* 2017; (130): 55833. <https://doi.org/10.3791/55833>
- Burnet F.M., Lush D. The action of certain surface active agents on viruses. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1940; 18(2): 141–50.
- Bedford T., Suchard M.A., Lemey P., Dudas G., Gregory V., Hay A.J., et al. Integrating influenza antigenic dynamics with molecular evolution. *Elife.* 2014; 3: e01914. <https://doi.org/10.7554/eLife.01914>
- Anderson C.S., McCall P.R., Stern H.A., Yang H., Topham D.J. Antigenic cartography of H1N1 influenza viruses using sequence-based antigenic distance calculation. *BMC Bioinformatics.* 2018; 19(1): 51. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2042-4>
- Lee M.S., Chen J.S. Predicting antigenic variants of influenza A/H3N2 viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10(8): 1385–90. <https://doi.org/10.3201/eid1008.040107>
- МУ 3.1.3490–17. Изучение популяционного иммунитета к

гриппу у населения Российской Федерации: Методические указания; 2017.

- Lin X., Lin F., Liang T., Ducatez M.F., Zanin M., Wong S.S. Antibody responsiveness to influenza: what drives it? *Viruses.* 2021; 13(7): 1400. <https://doi.org/10.3390/v13071400>
- Lees W.D., Moss D.S., Shepherd A.J. A computational analysis of the antigenic properties of haemagglutinin in influenza A H3N2. *Bioinformatics.* 2010; 26(11): 1403–8. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq160>
- Zhou X., Yin R., Kwok C.K., Zheng J. A context-free encoding scheme of protein sequences for predicting antigenicity of diverse influenza A viruses. *BMC Genomics.* 2018; 19(Suppl. 10): 936. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5282-9>
- Peng Y., Wang D., Wang J., Li K., Tan Z., Shu Y., et al. A universal computational model for predicting antigenic variants of influenza A virus based on conserved antigenic structures. *Sci. Rep.* 2017; 7: 42051. <https://doi.org/10.1038/srep42051>
- Huang J.W., Yang J.M. Changed epitopes drive the antigenic drift for influenza A (H3N2) viruses. *BMC Bioinformatics.* 2011; 12(Suppl. 1): S31. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-S1-S31>
- Tolles J., Meurer W.J. Logistic regression: relating patient characteristics to outcomes. *JAMA.* 2016; 316(5): 533–4. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.7653>
- Hastie T., Tibshirani R., Friedman J. *The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference, and Prediction.* Springer; 2009.
- Zacour M., Ward B.J., Brewer A., Tang P., Boivin G., Li Y. Standardization of hemagglutination inhibition assay for influenza serology allows for high reproducibility between laboratories. *Clin. Vaccine Immunol.* 2016; 23(3): 236–42. <https://doi.org/10.1128/0161-1261.01613-15>
- Кильбурн Э.Д., ред. *Вирусы гриппа и грипп.* Пер. с англ. М.: Медицина; 1978.
- Yao Y., Li X., Liao B., Huang L., He P., Wang F., et al. Predicting influenza antigenicity from Hemagglutinin sequence data based on a joint random forest method. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 1545. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01699-z>
- Lee E.K., Tian H., Nakaya H.I. Antigenicity prediction and vaccine recommendation of human influenza virus A (H3N2) using convolutional neural networks. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2020; 16(11): 2690–708. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1734397>
- Shah S.A.W., Palomar D.P., Barr I., Poon L.L.M., Quadeer A.A., McKay M.R. Seasonal antigenic prediction of influenza A H3N2 using machine learning. *Nat. Commun.* 2024; 15(1): 3833. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2924528/v1>
- Wang P., Zhu W., Liao B., Cai L., Peng L., Yang J. Predicting influenza antigenicity by matrix completion with antigen and antiserum similarity. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 2500. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02500>
- Huang L., Li X., Guo P., Yao Y., Liao B., Zhang W., et al. Matrix completion with side information and its applications in predicting the antigenicity of influenza viruses. *Bioinformatics.* 2017; 33(20): 3195–201. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx390>
- Liao Y.C., Lee M.S., Ko C.Y., Chao A.H. Bioinformatics models for predicting antigenic variants of influenza A/H3N2 virus. *Bioinformatics.* 2008; 24(4): 505–12. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm638>
- Yang J., Zhang T., Wan X.F. Sequence-based antigenic change prediction by a sparse learning method incorporating co-evolutionary information. *PLoS One.* 2014; 9(9): e106660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106660>
- Adabor E.S. A statistical analysis of antigenic similarity among influenza A (H3N2) viruses. *Heliyon.* 2021; 7(11): e08384. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08384>

REFERENCES

- Walker P.J., Siddell S.G., Lefkowitz E.J., Mushegian A.R., Adriaenssens E.M., Alfenas-Zerbini P., et al. Recent changes to viruses taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* 2022; 167(11): 2429–40. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05516-5>
- Chen J., Li K., Rong H., Bilal K., Yang N., Li K. A disease diagnosis and treatment recommendation system based on big data mining and cloud computing. *Inf. Sci.* 2018; 435: 124–49. <https://doi.org/10.1016/j.ins.2018.01.001>
- Qiu J., Qiu T., Yang Y., Wu D., Cao Z. Incorporating structure context

- of HA protein to improve antigenicity calculation for influenza virus A/H3N2. *Sci. Rep.* 2016; 6: 31156. <https://doi.org/10.1038/srep31156>
4. Asatryan M.N., Agasaryan V.G., Shcherbinin D.N., Timofeev B.I., Ershov I.F., Shmyr I.S., et al. Influenza IDE. Patent RF № 2020617965; 2020. (in Russian)
 5. Asatryan M.N., Timofeev B.I., Shmyr I.S., Khachatryan K.R., Shcherbinin D.N., Timofeeva T.A., et al. Mathematical model for assessing the level of cross-immunity between strains of influenza virus subtype H3N2. *Voprosy virusologii.* 2023; 68(3): 252–64. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-179> <https://elibrary.ru/rexvea> (in Russian)
 6. Nakai K., Kidera A., Kanehisa M. Cluster analysis of amino acid indices for prediction of protein structure and function. *Protein Eng.* 1988; 2(2): 93–100. <https://doi.org/10.1093/protein/2.2.93>
 7. Virology Research Services. The Hemagglutination Inhibition Assay; 2023. Available at: <https://virologyresearchservices.com/2023/04/07/understanding-the-hai-assay/>
 8. Spackman E., Sitaras I. Hemagglutination Inhibition Assay. In: *Animal Influenza Virus.* 2020; 11–28. Available at: https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-0346-8_2
 9. Kaufmann L., Syedbasha M., Vogt D., Hollenstein Y., Hartmann J., Linnik J.E., et al. An optimized Hemagglutination Inhibition (HI) assay to quantify influenza-specific antibody titers. *J. Vis Exp.* 2017; (130): 55833. <https://doi.org/10.3791/55833>
 10. Burnet F.M., Lush D. The action of certain surface active agents on viruses. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1940; 18(2): 141–50.
 11. Bedford T., Suchard M.A., Lemey P., Dudas G., Gregory V., Hay A.J., et al. Integrating influenza antigenic dynamics with molecular evolution. *Elife.* 2014; 3: e01914. <https://doi.org/10.7554/eLife.01914>
 12. Anderson C.S., McCall P.R., Stern H.A., Yang H., Topham D.J. Antigenic cartography of H1N1 influenza viruses using sequence-based antigenic distance calculation. *BMC Bioinformatics.* 2018; 19(1): 51. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2042-4>
 13. Lee M.S., Chen J.S. Predicting antigenic variants of influenza A/H3N2 viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10(8): 1385–90. <https://doi.org/10.3201/eid1008.040107>
 14. МУ 3.1.3490–17. The study of population immunity to influenza in the population of the Russian Federation: Methodological guidelines; 2017. (in Russian)
 15. Lin X., Lin F., Liang T., Ducatez M.F., Zanin M., Wong S.S. Antibody responsiveness to influenza: what drives it? *Viruses.* 2021; 13(7): 1400. <https://doi.org/10.3390/v13071400>
 16. Lees W.D., Moss D.S., Shepherd A.J. A computational analysis of the antigenic properties of haemagglutinin in influenza A H3N2. *Bioinformatics.* 2010; 26(11): 1403–8. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq160>
 17. Zhou X., Yin R., Kwok C.K., Zheng J. A context-free encoding scheme of protein sequences for predicting antigenicity of diverse influenza A viruses. *BMC Genomics.* 2018; 19(Suppl. 10): 936. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5282-9>
 18. Peng Y., Wang D., Wang J., Li K., Tan Z., Shu Y., et al. A universal computational model for predicting antigenic variants of influenza A virus based on conserved antigenic structures. *Sci. Rep.* 2017; 7: 42051. <https://doi.org/10.1038/srep42051>
 19. Huang J.W., Yang J.M. Changed epitopes drive the antigenic drift for influenza A (H3N2) viruses. *BMC Bioinformatics.* 2011; 12(Suppl. 1): S31. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-S1-S31>
 20. Tolles J., Meurer W.J. Logistic regression: relating patient characteristics to outcomes. *JAMA.* 2016; 316(5): 533–4. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.7653>
 21. Hastie T., Tibshirani R., Friedman J. *The Elements of Statistical Learning: Data Mining, Inference, and Prediction.* Springer; 2009.
 22. Zacour M., Ward B.J., Brewer A., Tang P., Boivin G., Li Y. Standardization of hemagglutination inhibition assay for influenza serology allows for high reproducibility between laboratories. *Clin. Vaccine Immunol.* 2016; 23(3): 236–42. <https://doi.org/10.1128/0100613-15>
 23. Kilbourne E.D., ed. *The Influenza Viruses and Influenza.* New York, London: Academic Press; 1975.
 24. Yao Y., Li X., Liao B., Huang L., He P., Wang F., et al. Predicting influenza antigenicity from Hemagglutinin sequence data based on a joint random forest method. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 1545. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01699-z>
 25. Lee E.K., Tian H., Nakaya H.I. Antigenicity prediction and vaccine recommendation of human influenza virus A (H3N2) using convolutional neural networks. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2020; 16(11): 2690–708. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1734397>
 26. Shah S.A.W., Palomar D.P., Barr I., Poon L.L.M., Quadeer A.A., McKay M.R. Seasonal antigenic prediction of influenza A H3N2 using machine learning. *Nat. Commun.* 2024; 15(1): 3833. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2924528/v1>
 27. Wang P., Zhu W., Liao B., Cai L., Peng L., Yang J. Predicting influenza antigenicity by matrix completion with antigen and antiserum similarity. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 2500. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02500>
 28. Huang L., Li X., Guo P., Yao Y., Liao B., Zhang W., et al. Matrix completion with side information and its applications in predicting the antigenicity of influenza viruses. *Bioinformatics.* 2017; 33(20): 3195–201. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx390>
 29. Liao Y.C., Lee M.S., Ko C.Y., Chao A.H. Bioinformatics models for predicting antigenic variants of influenza A/H3N2 virus. *Bioinformatics.* 2008; 24(4): 505–12. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm638>
 30. Yang J., Zhang T., Wan X.F. Sequence-based antigenic change prediction by a sparse learning method incorporating co-evolutionary information. *PLoS One.* 2014; 9(9): e106660. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106660>
 31. Adabor E.S. A statistical analysis of antigenic similarity among influenza A (H3N2) viruses. *Heliyon.* 2021; 7(11): e08384. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08384>

Информация об авторах:

Асатрян Марина Норайровна  – канд. мед. наук, старший научный сотрудник группы эпидемиологической кибернетики отдела эпидемиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Москва, Россия. E-mail: masatryan@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-0001-6273-8615>

Шмыр Илья Сергеевич – научный сотрудник группы эпидемиологической кибернетики отдела эпидемиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Москва, Россия. E-mail: shmyris@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-00028514-5174>

Тимофеев Борис Игоревич – канд. физ.-мат. наук, старший научный сотрудник лаборатории физиологии вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Москва. E-mail: timofeevbi@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-0001-7425-0457>

Щербинин Дмитрий Николаевич – канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела генетики и молекулярной биологии бактерий ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», 123098, Москва, Россия. E-mail: shcherbinindn@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>.

Агасарян Ваагн Гагикович – научный сотрудник группы эпидемиологической кибернетики отдела эпидемиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Москва, Россия. E-mail: agasaryanvg@gamaleya.org; <https://orcid.org/0009-0009-3824-7061>

Тимофеева Татьяна Анатольевна – канд. биол. наук, заведующая лабораторией физиологии вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Москва, Россия. E-mail: timofeeva.tatyana@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-0002-8991-8525>

Ершов Иван Феликсович – научный сотрудник группы эпидемиологической кибернетики отдела эпидемиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Москва, Россия. E-mail: ershovif@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-0002-3333-5347>

Герасимук Элита Русиндапутри – канд. мед. наук, доцент, Государственный Университет «Дубна», Дубна, Россия. E-mail: ealita@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7364-163X>

Ноздрачева Анна Валерьевна – канд. мед. наук, заведующая лабораторией неспецифической профилактики инфекционных заболеваний отдела эпидемиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Москва, Россия. E-mail: nozdrachevaav@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-0002-8521-1741>

Семененко Татьяна Анатольевна – д-р мед. наук, профессор, академик РАЕН, главный научный сотрудник отдела эпидемиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Москва, Россия. E-mail: semenenko@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>

Логунов Денис Юрьевич – д-р биол. наук, академик РАН, заместитель директора по научной работе ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Москва, Россия. E-mail: logunov@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

Гинцбург Александр Леонидович – д-р биол. наук, профессор, академик РАН, директор ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Москва, Россия. E-mail: gintsburg@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

Участие авторов: Асатрян М.Н. – участие в разработке концепции и дизайна исследований; руководство группой разработчиков; участие в создании моделей; анализ и интерпретация данных; написание статьи; Шмыр И.С. – участие в разработке концепции и дизайна исследований; создание моделей, проведение расчетов и статистическая обработка; участие в написании статьи; Тимофеев Б.И. – сбор, обработка, анализ и интерпретация данных; участие в разработке концепции и дизайна исследований; Щербинин Д.Н., Тимофеева Т.А. – научное обоснование моделей; консультации по экспериментальным данным; Ершов И.Ф. – сбор и обработка данных; Герасимук Э.Р., Ноздрачева А.В. – участие в написании статьи; Семеновко Т.А. – участие в разработке концепции и дизайна исследований; редактирование; Агасарян В.Г., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. – участие в разработке концепции и дизайна исследований. Все авторы внесли существенный вклад в подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Поступила 11.07.2024
Принята в печать 22.08.2024
Опубликована 31.08.2024

Information about the authors:

Marina N. Asatryan  – PhD (Med.), senior researcher epidemiological cybernetics group of the Epidemiology Department, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. E-mail: masatryan@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-0001-6273-8615>

Ilya S. Shmyr – researcher epidemiological cybernetics group of the Epidemiology Department, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. E-mail: shmyris@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-0002-8514-5174>

Boris I. Timofeev – PhD (Phys.-Mat.), senior researcher D.I. Ivanovsky Institute of Virology Division of N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. E-mail: timofeevbi@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-0001-7425-0457>

Dmitrii N. Shcherbinin – PhD (Biol.), senior researcher, Department of Genetics and Molecular Biology of Bacteria, N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. E-mail: shcherbinindn@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>

Vaagn G. Agasaryan – researcher epidemiological cybernetics group of the Epidemiology Department, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. E-mail: agasaryanvg@gamaleya.org; <https://orcid.org/0009-0009-3824-7061>

Tatiana A. Timofeeva – PhD (Biol.), head of laboratory D.I. Ivanovsky Institute of Virology Division of N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology 123098, Moscow, Russia. E-mail: timofeeva.tatiana@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-0002-8991-8525>

Ivan F. Ershov – researcher epidemiological cybernetics group of the Epidemiology Department, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. E-mail: ershovif@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-0002-3333-5347>

Elita R. Gerasimuk – PhD (Med.), Assoc. Prof., Dubna State University, Dubna, Russia. E-mail: ealita@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7364-163X>

Anna V. Nozdracheva – PhD (Med.), head of laboratory for non-specific prevention of infectious diseases, Department of Epidemiology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. E-mail: nozdrachevaav@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-0002-8521-1741>

Tatyana A. Semenenko – D. Sci. (Med.), Prof., Full Member of RANS, chief researcher Department of Epidemiology, N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. E-mail: semenenko@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>

Denis Yu. Logunov – D. Sci. (Biol.), Full Member of RAS, Deputy Director for research, N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. E-mail: logunov@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

Aleksander L. Gintsburg – D. Sci. (Biol.), Prof., Full Member of RAS, Director, N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. E-mail: gintsburg@gamaleya.org; <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

Contribution: Asatryan M.N. – participation in the development of the concept and design of research; leading a development team; participation in the creation of models; analysis and interpretation of data; writing an article; Shmyr I.S. – participation in the development of the concept and design of the study; creation of models, calculations and statistical processing; participation in writing the article; Timofeev B.I. – collection, processing, analysis and interpretation of data. participation in the development of the concept and design of the study; Shcherbinin D.N., Timofeeva T.A. – scientific substantiation of models; consulting on experimental data; Ershov I.F. – collection and processing of data; Gerasimuk E.R., Nozdracheva A.V. – participation in writing the article; Semenenko T.A. – participation in the development of the concept and design of the study; editing; Agasaryan V.G., Logunov D.Yu., Gintsburg A.L. – participation in the development of the concept and design of the study. All authors contributed significantly to the preparation of the article and read and approved the final version before publication.

Received 11 July 2024
Accepted 22 August 2024
Published 31 August 2024

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-254>

© ВЕЛИКЖАНИНА Е.И., САШИНА Т.А., МОРОЗОВА О.В., КАШНИКОВ А.Ю., ЕПИФАНОВА Н.В., НОВИКОВА Н.А., 2024



Необычные BA222-подобные штаммы *Rotavirus A* (Sedoreoviridae: *Rotavirus: Rotavirus A*): молекулярно-генетический анализ на основе всех сегментов генома

Великжанина Е.И.^{1,2✉}, Сашина Т.А.¹, Морозова О.В.¹, Кашников А.Ю.¹, Епифанова Н.В.¹, Новикова Н.А.¹¹ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 603950, г. Нижний Новгород, Россия;²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», 603022, г. Нижний Новгород, Россия

Резюме

Введение. Ротавирусная инфекция является основной причиной тяжелых дегидратирующих диарей, требующих госпитализации, у детей младшего возраста во всем мире. Благодаря сегментированному геному ротавирусы способны к реассортации генов, что делает возможным появление и распространение генетически новых штаммов.

Цель исследования – поиск необычных ротавирусов, циркулировавших в Нижнем Новгороде в 2021–2023 гг., и их молекулярно-генетическая характеристика на основе всех сегментов генома.

Материалы и методы. Ротавирус-положительные образцы стула детей исследовали методами ПЦР-генотипирования и электрофореза в полиакриламидном геле. Для отобранных штаммов были секвенированы фрагменты комплементарной ДНК каждого из 11 генов (VP1–VP4, VP6, VP7, NSP1–NSP5) длиной от 570 до 850 пар нуклеотидов. Филогенетический анализ проводили в программе MEGA X.

Результаты. В исследуемый период 2021–2023 гг. было идентифицировано 11 G[P]-комбинаций с преобладанием G3P[8] (59,5%). Выявлено 6 нетипичных штаммов ротавируса A (PВА): 2 штамма генотипа G2P[4] (G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T3-E2-H3, G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T3-E3-H2) и 4 штамма G3P[9] (все штаммы имели генотип G3-P[9]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T3-E3-H3). Филогенетический анализ на основе всех генов показал эволюционное родство между ротавирусами, подобными ротавирусам кошек и собак (BA222-подобными), и необычными штаммами генотипа G2P[4], для которых смешанная комбинация генотипов была выявлена и охарактеризована впервые.

Заключение. Полученные результаты расширяют представления о разнообразии реассортантных PВА, а также дополняют данные о генотиповой структуре популяции ротавирусов на территории Нижнего Новгорода. Результаты исследования в совокупности с полученными ранее данными расширяют представление о генетическом разнообразии ротавирусов и роли реассортантов в его поддержании, что важно для создания новых ротавирусных вакцин и понимания эволюционных процессов в популяции PВА.

Ключевые слова: ротавирус A; генотипирование; полный генотип; филогенетический анализ; генетические варианты; генетическое разнообразие; реассортанты

Для цитирования: Великжанина Е.И., Сашина Т.А., Морозова О.В., Кашников А.Ю., Епифанова Н.В., Новикова Н.А. Необычные BA222-подобные штаммы *Rotavirus A* (Sedoreoviridae: *Rotavirus: Rotavirus A*): молекулярно-генетический анализ на основе всех сегментов генома. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(4): 363–376. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-254> EDN: <https://elibrary.ru/ogouq>

Финансирование. Исследование проведено в рамках выполнения Государственного задания Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор).

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 Локальным этическим комитетом ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (Протокол № 6 от 24.03.2021).

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-254>

Unusual BA222-like strains of *Rotavirus A* (Sedoreoviridae: *Rotavirus: Rotavirus A*): molecular and genetic analysis based on all genome segments

Elena I. Velikzhanina^{1,2✉}, Tatiana A. Sashina¹, Olga V. Morozova¹, Alexander Yu. Kashnikov¹, Natalia V. Epifanova¹, Nadezhda A. Novikova¹

¹Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 603950, Nizhny Novgorod, Russia;

²Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 603022, Nizhny Novgorod, Russia

Abstract

Introduction. Rotavirus infection is the major cause of severe dehydrating diarrhea requiring hospitalization in young children worldwide. Due to their segmented genome, rotaviruses are capable of gene reassortment, which makes the emergence and spread of genetically novel strains possible. The purpose of this study was to search for unusual rotaviruses circulating in Nizhny Novgorod in 2021–2023 and their molecular genetic characterization based on all genome segments.

Materials and methods. Rotavirus-positive stool samples of children were examined by PCR genotyping and electrophoresis in PAAG. cDNA fragments of each of the 11 genes (*VP1–VP4*, *VP6*, *VP7*, *NSP1–NSP5*), 570 to 850 nucleotide pairs in length were sequenced for the selected strains. The phylogenetic analysis was performed in the MEGA X program.

Results. In the study period 2021–2023, 11 G[P] combinations with a predominance of G3P[8] (59.5%) were identified. Six atypical *Rotavirus A* (RVA) strains were identified: 2 strains of the G2P[4] genotype (G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T3-E2-H3, G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T3-E3-H2) and 4 G3P[9] strains (all strains had the genotype G3-P[9]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T3-E3-H3). Phylogenetic analysis based on all genes showed an evolutionary relationship between rotaviruses similar to rotaviruses of cats and dogs (BA222-like) and unusual strains of the G2P[4] genotype, for which a mixed combination of genotypes was identified and characterized for the first time.

Discussion. The results obtained expand the understanding of the diversity of reassortant RVAs, as well as complement the data on the genotypic structure of the rotavirus population in Nizhny Novgorod.

Conclusion. The wide genetic diversity of reassortant RVA can help rotaviruses overcome the immunological pressure provided by natural and vaccine-induced immunity. In this regard, to control the emergence of new variants and assess changes in the virulence of rotaviruses after reassortment processes, continuous molecular monitoring for circulating RVA is necessary.

Keywords: *Rotavirus A*; genotyping; full genotype; phylogenetic analysis; genetic variants; genetic diversity; reassortment

For citation: Velikzhanina E.I., Sashina T.A., Morozova O.V., Kashnikov A.Y., Epifanova N.V., Novikova N.A. Unusual BA222-like strains of *Rotavirus A* (Sedoreoviridae: *Rotavirus: Rotavirus A*): molecular and genetic analysis based on all genome segments. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(4): 363–376. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-254> EDN: <https://elibrary.ru/ogoquq>

Funding. The study was conducted as part of the State Task of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being (Rosпотребнадзор).

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 Local Ethics Committee of the FSBI «Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Right Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор) (Protocol No. 6 dated 24.03.2021).

Введение

В настоящее время большинство кишечных инфекций установленной этиологии вызывают вирусные патогены. Спектр кишечных вирусов весьма разнообразен, но ведущее место по заболеваемости среди детей занимает ротавирус А (РВА, *Rotavirus A*, род *Rotavirus*, семейство *Sedoreoviridae*, порядок *Reovirales*, класс *Resentoviricetes*, тип *Duplornaviricota*). Ежегодно на долю ротавирусной инфекции (РВИ)

во всем мире приходится около 228 000 смертельных случаев, в том числе примерно 128 500 среди детей в возрасте до 5 лет [1, 2]. Наибольшее бремя РВИ приходится на детей, живущих в странах с низким и средним уровнем дохода, особенно из-за неблагоприятных условий жизни, ограниченного снабжения чистой питьевой водой и плохих санитарных условий [3]. В России, несмотря на ежегодно увеличивающееся число вакцинированных против РВИ

детей, охват вакцинацией целевой когорты остается крайне низким, для того чтобы оказать влияние на эпидемический процесс (2020 г. – 3,68%; 2021 г. – 6,23%; 2022 г. – 7,15%; 2023 г. – 12,7%) [4, 5].

Отличительной чертой ротавирусов (РВ) является сегментированный геном, состоящий из 11 сегментов двухнитевой РНК в сумме длиной около 18 555 нуклеотидов, кодирующих 6 структурных (VP1–VP4, VP6–VP7) и 6 неструктурных (NSP1–NSP6) белков [6–8]. РВ характеризуются широким антигенным и генетическим разнообразием. Наиболее полно охарактеризованы гены *VP4* и *VP7*, на основе которых с использованием бинарной классификации определяют G- и P-генотипы [9]. На сегодняшний день для РВА известно 42 G-генотипа и 58 P-генотипов [10]. Наиболее распространенными в мире, в том числе в России, считаются 6 комбинаций G[P]-типов РВА: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и G12P[8], на долю которых приходится примерно 90% случаев заражения РВИ [11, 12]. Число менее распространенных G[P]-вариантов значительно больше, но они составляют всего 4,9% случаев инфекции. Например, к ним относятся такие генотипы, как G9P[4], G9P[9], G8P[8], G2P[8], G4P[4], G3P[9] и др. [13–16].

Бинарная система классификации фокусируется только на сегментах генов *VP4* и *VP7* и не дает информации о разнообразии других генов. Поэтому для более глубокого изучения эпидемиологии и эволюции РВ была предложена система полногеномной классификация, позволяющая отнести каждый сегмент генома вируса к определенному генотипу. Для описания полного генотипа используют обозначение Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Eх-Nх для генов, кодирующих белки VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/NSP6 соответственно [17]. Определение полного генотипа облегчает выявление редких и необычных РВА и обеспечивает более глубокое понимание происхождения и разнообразия штаммов, что, в свою очередь, важно для успешного прогнозирования эпидемической ситуации и оценки влияния вакцинопрофилактики на популяцию возбудителя.

Основываясь на полногеномном типировании, среди РВА выделяют 3 геногруппы. Во всем мире часто встречающиеся комбинации G1, G3, G4, G9, G12 и P[8] обычно ассоциируются с Wa-подобной (1-й) геногруппой (G1/G3/G4/G9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-N1), имеющей отдаленное родство с РВ свиной [18, 19]. Такие РВ характеризуются «длинным» профилем миграции сегментов генома в полиакриламидном геле (ПААГ). Штаммы генотипа G2P[4], в свою очередь, относятся к DS-1-подобной (2-й) геногруппе (G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-N2), эволюционно связанной с РВ крупного рогатого скота [17, 19]. Они имеют «короткий» профиль миграции геномных сегментов. Существует 3-я, минорная, AU-1-подобная геногруппа (G3P[9]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-N3), которая включает штаммы, подобные РВ кошек и собак, характеризующиеся «широким» профилем миграции сегментов [20, 21]. Штаммы

с чистым AU-1-подобным сочетанием редко встречаются у людей, в то время как более распространены варианты со смешанным набором AU-1-подобных и DS-1-подобных генов. Их принято объединять в отдельную группу, прототипным для которой является штамм РВА BA222 (G3-P[9]-I2-R2-C2-M2-A3-N1-T3-E2-N3), выделенный от домашнего кота в Италии в 2005 г. [22, 23].

Наличие сегментированного генома обуславливает способность РВ к обмену сегментами (реассортации) при одновременном инфицировании клетки двумя или более штаммами, что позволяет генам с разной специфичностью группироваться независимо друг от друга, тем самым поддерживая разнообразие в популяции. В мире все чаще отмечают распространение эпидемически значимых реассортантных штаммов РВА, которые несут генетический материал нескольких геногрупп [9, 24, 25].

В связи с этим, целью настоящей работы явились поиск необычных РВ на территории Нижнего Новгорода и их молекулярно-генетическая характеристика на основе всех сегментов генома.

Материалы и методы

В работе использовали образцы стула детей, госпитализированных в детский инфекционный стационар Нижнего Новгорода с симптомами острой кишечной инфекции (ОКИ) в период 2021–2023 гг.

Экстракцию нуклеиновых кислот и постановку полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) выполняли с помощью наборов реагентов РИБО-преп и РЕВЕРТА-Л (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора (ЦНИИЭ), Россия). Обнаружение ротавирусной РНК проводили с помощью ПЦР-тест-систем с детекцией результата в реальном времени «АмплиСенс Rotavirus/Norovirus/Astrovirus FL» и «АмплиСенс ОКИ виро-скрин-FL» (ЦНИИЭ). Дополнительно РНК вирусов исследовали методом электрофореза в полиакриламидном геле (РНК-ПААГ) [26].

G[P]-генотип РВ определяли методом мультиплексной ПЦР на основе праймеров, специфичных в отношении генотипов G1–G4, G6, G8, G9, G12, P[4], P[6], P[8], P[9] [26–32]. Детекцию результатов осуществляли с помощью электрофореза в агарозном геле, содержащем бромид этидия.

Для каждого гена был получен один фрагмент комплементарной ДНК (кДНК) длиной от 570 до 850 пар нуклеотидов с помощью праймеров, опубликованных ранее [32]. Фрагменты кДНК секвенировали по двум цепям с помощью прямого и обратного праймеров на приборе «Нанофор 05» (Институт аналитического приборостроения (ИАП) РАН, Россия) с применением набора для секвенирования BigDye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific, США). Нуклеотидные последовательности доступны в базе данных GenBank под номерами PP475712–PP475777.

Поиск родственных последовательностей выполняли с использованием онлайн-сервиса BLAST. Для про-

ведения филогенетического анализа из GenBank были взяты нуклеотидные последовательности 11 генов РВ, циркулировавших в разных странах, в том числе в России (Новосибирск, Омск, Москва), а также последовательности РВ из Нижнего Новгорода, полученные ранее. Регистрационные номера GenBank этих штаммов приведены в названиях изолятов на филогенетических деревьях. Выравнивание и анализ нуклеотидных последовательностей проводили в программе MEGA X версия 10.0.5. Филогенетические деревья строили методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) [33, 34]. Bootstrap-анализ осуществляли на основе 1000 случайных выборок. Проценты сходства нуклеотидных последовательностей были рассчитаны методом попарных дистанций (Pairwise Distances). Принадлежность изучаемых штаммов к филогенетическим линиям и сублиниям определяли на основе кластеризации изолятов на филогенетических деревьях с индексом поддержки узлов более 75 и высокого уровня сходства нуклеотидных последовательностей (98,5–100,0% для разных генов). Филогенетические линии и сублинии обозначали согласно принятой в литературе классификации [32, 35–40].

Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов.

Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (Протокол № 6 от 24.03.2021).

Результаты

Характеристика спектра G[P]-генотипов РВА в Нижнем Новгороде

На наличие ротавирусной РНК было исследовано 3715 образцов стула детей, госпитализированных в инфекционный стационар с симптомами

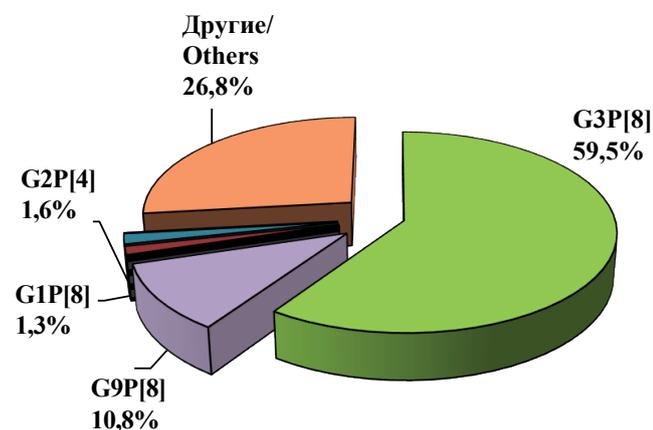


Рис. 1. Распределение штаммов РВА основных G[P]-генотипов в Нижнем Новгороде в сезон 2021–2023 гг. (в %).

Fig. 1. Distribution of RVA strains of the main G[P]-genotypes in Nizhny Novgorod in the season 2021–2023 (in %).

острого гастроэнтерита в период 2021–2023 гг. В 1085 случаях (29,2%) была обнаружена РНК РВ, которую в дальнейшем использовали для G/[P]-генотипирования методом ОТ-ПЦР и/или секвенирования. В 792 образцах (72,9%) был определен G[P]-генотип РВ. В 192 образцах (17,7%) был частично установлен G- либо Р-генотип. Результаты генотипирования, проведенного по двум генам (*VP4* и *VP7*), показали, что РВА, циркулирующие на территории Нижнего Новгорода, характеризовались высоким разнообразием. Спектр идентифицированных методом ПЦР G-генотипов РВ включал 4 широко распространенных в мире (G1, G2, G3 и G9), и 2 редких для России (G6 и G8). Набор Р-генотипов включал 4 типа, среди которых были часто встречающиеся Р[4], Р[8] и редкие Р[6] и Р[9]. Всего было обнаружено 11 G/P-комбинаций: широко распространенные G3P[8], G9P[8], G2P[4], G1P[8], а также редкие G8P[8], G3P[9], G9P[4], G3P[6], G2P[8], G6P[9] и G3P[4] (рис. 1).

Доминирующую позицию в изучаемый период занимали штаммы генотипа G3P[8] (59,5%), за ним следовали штаммы генотипа G9P[8] (10,8%). Для остальных генотипов был показан низкий долевого вклад: G9P[4] – 2,1%, G1P[8] – 1,3%, G2P[4] – 1,6%, G3P[4]–1,3%, G8P[8]–1,1%, G3P[6]–0,8%, G3P[9]–1,0%, G2P[8] – 0,8%, G6P[9] – 0,1%.

Выявление реассортантных ротавирусов и установление их полных генотипов

В ходе изучения РВА-содержащих образцов методом РНК-ПААГ были выявлены 6 штаммов (2 штамма генотипа G2P[4] и 4 – G3P[9]), которые имели так называемые «широкие» (AU-1-подобные) профили миграции геномных сегментов в ПААГ (медленно мигрирующий 5-й сегмент, быстро мигрирующие 6-й и 11-й сегменты) (рис. 2).

Штаммы были секвенированы по 11 генам (*VP1–VP4*, *VP6*, *VP7*, *NSP1–NSP5/6*), что позволило определить их полные генотипы: G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T3-E2-H3, G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T3-E3-H2 и G3-P[9]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T3-E3-H3. Исследуемые штаммы имели смешанный набор генов двух разных геногрупп – DS-1-подобной (генотипы под номером 2) и AU-1-подобной (генотипы под номером 3), что свидетельствует об их реассортантном происхождении.

Филогенетический анализ ротавирусов на основе всех сегментов генома

Для изучения филогенетических взаимоотношений 6 выявленных РВ генотипов G2P[4] и G3P[9] были использованы нуклеотидные последовательности 11 генов. Филогенетический анализ позволил изучить внутригенотиповое разнообразие исследуемых штаммов на уровне линий и сублиний. Адаптированные деревья показаны на рис. 3, 4.

По каждому гену исследуемые штаммы входили в состав 1 или 2 кластеров. Наибольшее разнообразие показали гены *VP4*, *VP7*, *NSP4* и *NSP5/6* (таблица).

Штаммы, подобные кошачьему ротавирусу BA222

Выявленные в данной работе 4 штамма генотипа G3P[9] относились к группе PB, подобных штамму BA222, выделенному от кошки. Эти штаммы (2853/21, 2885/21, 347/22 и 2619/21) были сходны по 9 генам (*VP1–VP4, VP6, VP7, NSP1, NSP3, NSP5/6*) с прототипным штаммом PBA BA222, но отличались от него генами *NSP2* и *NSP4*, которые обладали другими генотипами. Наибольший уровень сходства нуклеотидных последовательностей был установлен для генов *VP2, VP3, VP7, NSP1, NSP3, NSP5/6* и составил 98,7–100,0%. Для генов *VP1, VP4* и *VP6* показан более низкий уровень гомологии – 96,3–98,1%.

Также исследуемые штаммы были родственны нижегородским BA222-подобным PB генотипов G3P[9] (NN148/17, NN2748/18) и G6P[9] (NN1061-16), выявленным ранее, в 2016–2018 гг. С изолятами генотипа G3P[9] (NN148/17 и NN2748/18) исследуемые штаммы имели высокий уровень гомологии нуклеотидных последовательностей по всем 11 генам (99,1–100,0%). Со штаммом генотипа G6P[9] (NN1061/16) было показано наиболее близкое родство по 8 генам (*VP1–VP4, NSP1–NSP3, NSP5/6*) с уровнем идентичности нуклеотидных последовательностей 98,7–100,0%. Для гена *VP6* установлен более низкий уровень сходства (96,0%). Гены *VP7* и *NSP4* имели другой генотип.

Нетипичные штаммы генотипа G2P[4]

Выявленные в настоящей работе два штамма PBA генотипа G2P[4] (1473/21 и 2924/21) имели смешанный набор генов. Они несли BA222-подобную основу, в то время как гены *VP4, VP7* и в одном случае ген *NSP5/6* были получены в результате реассортации от типичных представителей DS-1-подобной геногруппы.

Наиболее близкородственными по дивергентным генам (*VP4, VP7* и в одном случае *NSP5/6*) явились штаммы генотипа G2P[4] из Нижнего Новгорода, выявленные ранее в 2018 г. (NN560/18, NN96/18 и NN425/18). Уровень сходства нуклеотидных последовательностей при этом был довольно высок и составил 98,7–99,9%.

По остальным генам (*VP1–VP3, VP6, NSP1–NSP5/6*) исследуемые штаммы имели близкое родство с BA222-подобной группой PB. Непосредственно с прототипным BA222 образцы 1473/21 и 2924/21 были наиболее родственны по 3 генам: *VP2, NSP3, NSP4* и *VP2, VP3, NSP3* соответственно. Сходство нуклеотидных последовательностей в случае этих генов достигало 98,6–99,8%, в то время как для остальных генов было ниже – 95,2–97,6%.

Также была установлена родственная связь исследуемых штаммов генотипа G2P[4] с нижегородскими PB генотипов G3P[9] и G6P[9] (NN1061/16, NN148/17, NN2748/18), выявленными ранее, по всем BA222-подобным генам. Так, исследуемый штамм 1473/21 разделял наибольшее количество генов (8 из 11) со штаммом NN148/17 (G3P[9]) (*VP1–VP3, VP6, NSP1–NSP3, NSP5/6*), демонстрируя при этом высокую идентичность нуклеотидных последовательностей –

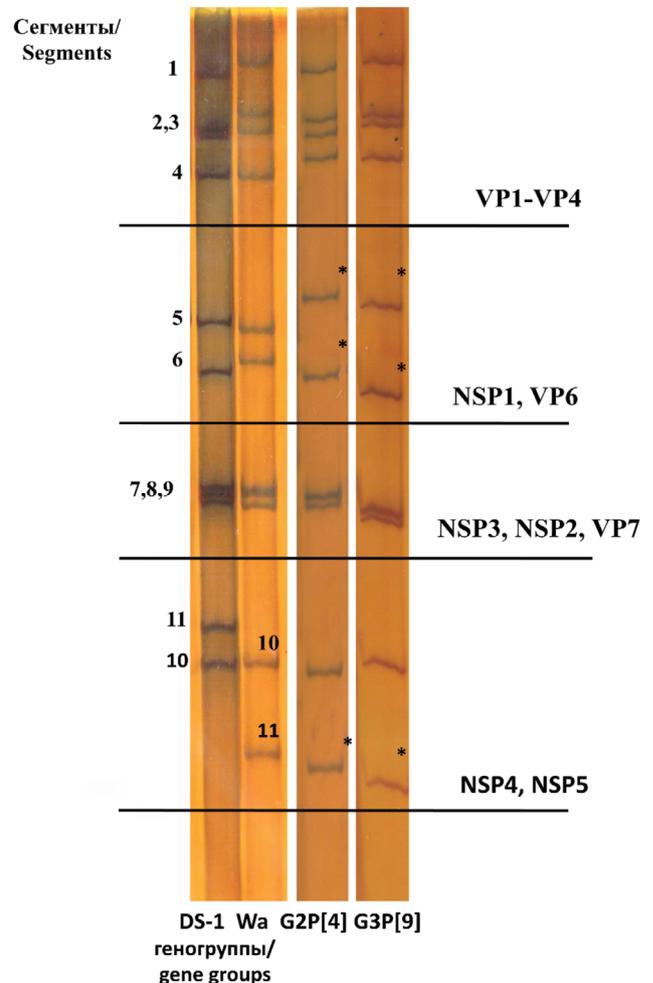


Рис. 2. Профили миграции сегментов днРНК типичных представителей DS-1-/Wa-подобных ротавирусов и исследуемых штаммов генотипов G2P[4] и G3P[9] в ПААГ.

* – необычное положение сегмента относительно типичных представителей DS- и Wa-подобных геногрупп.

Fig. 2. Migration profiles of dsRNA segments of typical representatives of DS-1-/Wa-like rotaviruses and studied strains of genotypes G2P[4] and G3P[9] in PAGE.

* – an unusual position of the segment relative to typical representatives of DS- and Wa-like gene groups.

99,1–99,9%. Со штаммом NN1061/16 (G6P[9]) он разделял 7 генов (*VP1–VP3, NSP2–NSP5/6*) с уровнем сходства нуклеотидных последовательностей 98,6–99,8%. Пять генов были родственны таковым у штамма NN2748/18 (G3P[9]) (*VP1, VP2, VP6, NSP2, NSP3*). Гомология их нуклеотидных последовательностей составила 98,7–99,7%.

Аналогично, штамм 2924/21 имел тесное филогенетическое родство со штаммом NN148/17 (G3P[9]) по 8 генам (*VP1–VP3, VP6, NSP1–NSP4*), демонстрируя высокую идентичность нуклеотидных последовательностей – 98,8–99,8%. Со штаммом NN2748/18 (G3P[9]) он разделял 6 генов (*VP1–VP3, VP6, NSP2, NSP3*) с уровнем гомологии 98,5–99,5%. В случае штамма NN1061/16 (G6P[9]) показано близкое род-

Таблица. Геномные констелляции ротавирусов Нижнего Новгорода на уровне субгенотипов

Table. Subgenotype-level genomic constellations of rotaviruses from Nizhny Novgorod

№	Штаммы/ Strains	Сегменты генома / Genome segments										
		VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5/6
Штаммы, подобные РВ кошек / Feline-like strains												
1	BA222	G3-3-e	P[9]	I2-XIV	R2-XIII	C2-IX	M2-XI	A3	N1	T3	E2-XVII	H3
2	NN1061/16	G6-I	P[9]	I2-XIV	R2-XIII	C2-IX	M2-XI	A3	N2-XVI	T3	E2-XVII	H3
3	NN148/17	G3-3-e	P[9]	I2-XIV	R2-XIII	C2-IX	M2-XI	A3	N2-XVI	T3	E3	H3
4	NN2748/18	G3-3-e	P[9]	I2-XIV	R2-XIII	C2-IX	M2-XI	A3	N2-XVI	T3	E3	H3
Типичные Ds-1-подобные штаммы / Typical DS-1-like strains												
5	NN96/18	G2-IVa-3	P[4]-IV-b	I2-V-1	R2-V-1	C2-IVa-1	M2-VII	A2-IVa-1	N2-V-1	T2-V-1	E2-VI	H2-IVa-1
6	NN425/18	G2-IVa-3	P[4]-IV-b	I2-V-1	R2-V-1	C2-IVa-1	M2-VII	A2-IVa-1	N2-V-1	T2-V-1	E2-VI	H2-IVa-1
7	NN437/18	G2-IVa-1	P[4]-IV-b	I2-V-1	R2-V-1	C2-IVa-1	M2-VII	A2-IVa-1	N2-V-1	T2-V-1	E2-VI	H2-IVa-1
8	NN560/18	G2-IVa-2	P[4]-IV-a	I2-V-2	R2-V-2	C2-IVa-2	M2-V	A2-IVa-2	N2-V-2	T2-V-2	E2-VII	H2-IVa-2
Штаммы, полученные в данной работе / Strains obtained in this work												
9	2853/21	G3-3-e	P[9]	I2-XIV	R2-XIII	C2-IX	M2-XI	A3	N2-XVI	T3	E3	H3
10	2885/21	G3-3-e	P[9]	I2-XIV	R2-XIII	C2-IX	M2-XI	A3	N2-XVI	T3	E3	H3
11	347/22	G3-3-e	P[9]	I2-XIV	R2-XIII	C2-IX	M2-XI	A3	N2-XVI	T3	E3	H3
12	2619/22	G3-3-e	P[9]	I2-XIV	R2-XIII	C2-IX	M2-XI	A3	N2-XVI	T3	E3	H3
13	1473/21	G2-IVa-3	P[4]-IV	I2-XIV	R2-XIII	C2-IX	M2-XI	A3	N2-XVI	T3	E2-XVII	H3
14	2924/21	G2-IVa-3	P[4]-IV	I2-XIV	R2-XIII	C2-IX	M2-XI	A3	N2-XVI	T3	E3	H2-IVa

Примечание. Исследуемые штаммы выделены жирным шрифтом. Красным цветом отмечены DS-1-подобные аллели, голубым – аллели РВ кошек, зеленым – Wa-подобные аллели.

Note. The studied strains are highlighted in bold. DS-1-like alleles are marked in red, alleles of RV cats are blue, and Wa-like alleles are green.

ство по 5 генам (*VP1–VP3*, *NSP2*, *NSP3*) с высоким уровнем сходства нуклеотидных последовательностей – 99,1–99,8%.

Обсуждение

В настоящей работе дана характеристика разнообразия генотипов РВА, циркулировавших в Нижнем Новгороде в 2021–2023 гг. Спектр представлен 11 типами с доминированием G3P[8] (59,5%), за которым следовал G9P[8] (10,8%). К июню 2021 г. отмечалось снижение доли генотипов G9P[8] в нижегородской популяции РВ, с последующей сменой доминирующего генотипа на G3P[8] в июле 2021 г. [41]. Полученные сведения служат дополнением к информации о генетических перестройках в популяции РВ в процессе их многолетней циркуляции в Нижнем Новгороде, наблюдения за которыми ведутся с 1984 г. [13, 26, 32, 40–44].

Представленные результаты также дополняют имеющиеся данные о генотиповой структуре популяций РВ на территории России. По данным референс-центра по мониторингу ОКИ, в зимне-весенний период 2021 г. на территории Российской Федерации (Московская, Томская, Иркутская, Свердловская, Новосибирская области, Республика Дагестан, Хабаровский край, Камчатский край) сохранялось доминирование генотипа G9P[8], но уже отмечалось постепенное возрастание доли генотипа G3P[8]. В 2022 г. произошло значительное уменьшение частоты встречаемости генотипа G9P[8] и показано превалирование в циркуляции на территории Российской Федерации РВ генотипа G3P[8], которое сохранилось и в 2023 г. [4, 5]. Представленная информация согласуется с данными, полученными в настоящей работе.

РВ генотипа G3 гена *VP7* обладают широким спектром хозяев и встречаются у большинства восприимчивых видов животных (включая человека, кроликов, обезьян, свиней, птиц, кошек, собак, лошадей, мышей, коров и ягнят) [7, 45, 46]. У РВ человека он в большинстве случаев ассоциирован с генотипом P[8] гена *VP4*, но реже встречается в сочетании с генотипом P[9] [47–49]. Комбинация G3P[9] распространена в основном у РВ кошек и собак [50], но благодаря реассортации, штаммы, подобные РВ животных, могут встречаться у человека [51]. Впервые РВА генотипа G3P[9] были обнаружены у человека в 1982 г. в Японии и Израиле [17, 22, 52]. Позднее их появление было зарегистрировано в Таиланде и Испании [53–59]. На территории Нижнего Новгорода штаммы G3P[9] эпизодически наблюдались в популяции с 1984 г. В ранних исследованиях они изучались на основе отдельно взятых генов (*VP4*, *VP6*, *VP7*, *NSP4*) [60, 61], первое изучение данных штаммов на основе всех сегментов генома было проведено в 2023 г. [40].

РВ G3P[9] спорадически обнаруживаются у людей, образуя отдельную геногруппу, генетически обособленную от Wa-подобных и DS-1-подобных вирусов [49, 59, 62–64]. Для человеческого G3P[9] показана возможность существования как минимум 8 разных комбинаций полных генотипов: G3-P[9]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3 [9, 17], G3-P[9]-I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H6 [16, 22, 51], G3-P[9]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T1-E2-H3 [46, 52], G3-P[9]-I2-R2-C2-M2-A3-N1-T6-E2-H3, G3-P[9]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T6-E2-H3 [65], G3-P[9]-I2-R2-C2-M2-A3-N1-T3-E2-H3 [66, 67], G3-P[9]-I3-R3-C2-M3-A3-N1-T6-E3-H3 [68, 69] и G3-P[9]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T3-E3-H3 [68, 70]. Инте-

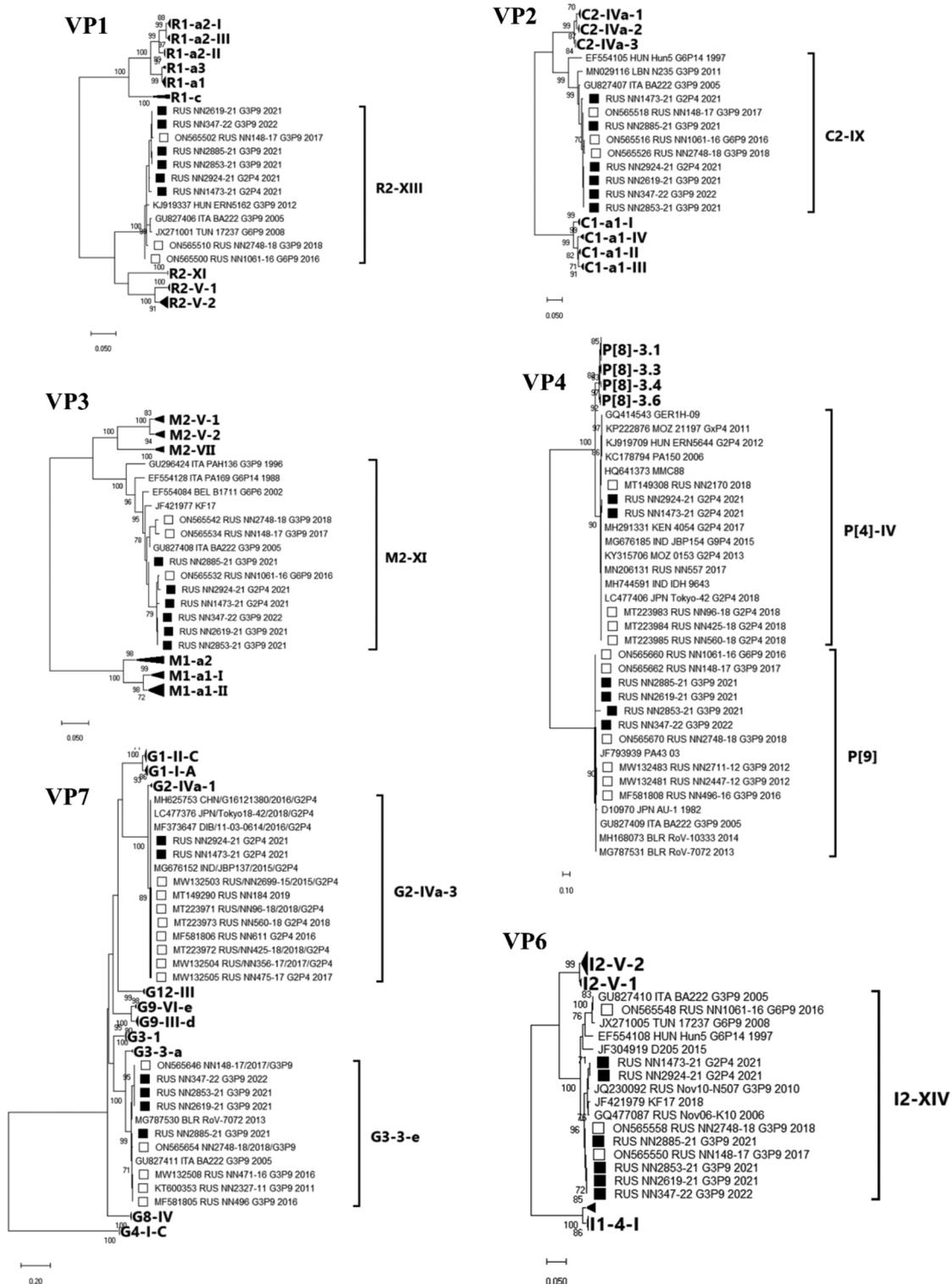


Рис. 3. Филогенетические деревья, построенные на основе нуклеотидных последовательностей структурных генов (*VP1–VP4*, *VP6*, *VP7*) штаммов ротавируса А.

■ – штаммы, полученные в данной работе; □ – нижегородские штаммы, взятые из GenBank.

Fig. 3. Phylogenetic trees based on nucleotide sequences structural genes (*VP1–VP4*, *VP6*, *VP7*) of rotavirus strains А.

■ – strains obtained in this work; □ – Nizhny Novgorod strains retrieved from GenBank.

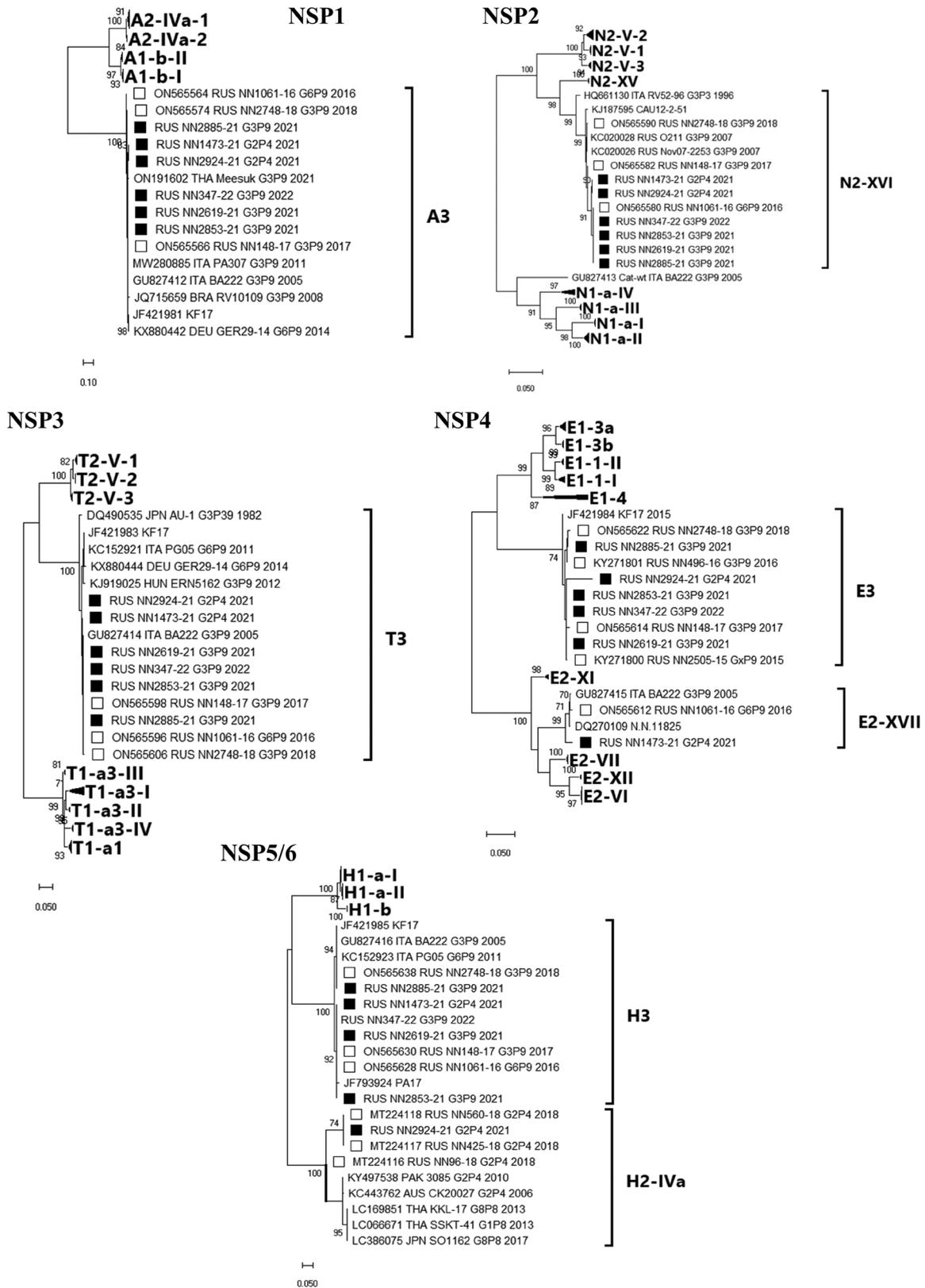


Рис. 4. Филогенетические деревья, построенные на основе нуклеотидных последовательностей неструктурных генов (NSP1–NSP5/6) штаммов ротавируса А.

■ – штаммы, полученные в данной работе; □ – нижегородские штаммы, взятые из GenBank.

Fig. 4. Phylogenetic trees based on nucleotide sequences: nonstructural genes (NSP1–NSP5/6) of rotavirus strains A.

■ – strains obtained in this work; □ – Nizhny Novgorod strains retrieved from GenBank.

ресно, что ген *NSP1* всех штаммов G3P[9] животного и человеческого происхождения неизменно обладает генотипом А3, то время как генотип остальных генов может варьировать (*VP6* – I2/I3; *VP1* – R2/R3; *VP2* – C2/C3; *VP3* – M2/M3; *NSP2* – N1/N2/N3; *NSP3* – T1/T3/T6; *NSP4* – E2/E3; *NSP5/6* – H3/H6).

Выявленные и исследованные в настоящей работе РВА G3P[9] обладали комбинацией генотипов G3-P[9]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T3-E3-H3. Филогенетический анализ показал, что они разделяли 9 генов (*VP1-VP4*, *VP6*, *VP7*, *NSP1*, *NSP3*, *NSP5/6*) с кошачьим РВ BA222 (Италия, 2005 г.). Из них гены *VP2*, *VP3*, *VP7*, *NSP1*, *NSP3* и *NSP5* имели высокий процент идентичности нуклеотидных последовательностей (98,7–100,0%), а *VP1*, *VP4* и *VP6* – более низкий (96,3–98,1%). Нижегородские штаммы отличались от типового BA222 генами *NSP2* и *NSP4*, которые обладали другими генотипами.

Полученные результаты показывают близкое родство исследованных РВ с более ранними штаммами генотипа G3P[9] из Нижнего Новгорода. В период 2016–2018 гг. были выявлены и исследованы на основе всех сегментов генома 3 аналогичных штамма РВА генотипа G3P[9] [40]. Их нуклеотидные последовательности использовались для проведения филогенетического анализа в настоящей работе. Сходство нижегородских штаммов G3P[9] разных лет составило для разных генов 99,7–100,0%.

Межгрупповые реассортанты на основе BA222-подобной комбинации ранее встречались на территории Южной Кореи. S. Jeong и соавт. (2014) в своей работе исследовали РВА генотипа G3P[9], выделенный в 2012 г. от невакцинированной 9-летней девочки с симптомами тяжелого гастроэнтерита. Исследуемый штамм имел генотип G3-P[9]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T3-E3-H3. Филогенетический анализ показал, что он разделял 9 генов (*VP1-VP4*, *VP6*, *VP7*, *NSP1*, *NSP3*, *NSP5/6*) с прототипным BA222, с разным уровнем сходства нуклеотидных последовательностей. По гену *NSP2* была установлена кластеризация исследуемых штаммов с типичными DS-1-подобными РВ человека, а для *NSP4* – с австралийским штаммом РВА кошек и собак. Этот штамм имел сложное эволюционное происхождение, потенциально включающее события реассортации между РВ кошек и DS-1-подобных РВА человека [70].

Аналогичные данные были получены группой исследователей из Китая. М. Сао и соавт. в 2023 г. исследовали 2 штамма генотипа G3P[9], выделенные в 2020 и 2023 гг. от 12-месячной девочки и 16-месячного мальчика соответственно. Оба штамма имели комбинацию генотипов: G3-P[9]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T3-E3-H3. Филогенетический анализ установил, что оба исследуемых РВА разделяли 8 генов (*VP1-VP4*, *VP7*, *NSP1*, *NSP3* и *NSP4*) с РВА, подобными РВ кошек и собак, с разным уровнем сходства нуклеотидных последовательностей (99,3–99,6%). Оставшиеся 3 гена (*VP6*, *NSP2* и *NSP5/6*) были связаны с типичными DS-1-подобными РВ человека (99,3–100,0%) [68].

В проведенном исследовании показана циркуляция необычных штаммов, которые имели генотипы G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T3-E2-H3 и G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A3-N2-T3-E3-H2. Гены *VP1-VP3*, *VP6*, *NSP1*, *NSP3-NSP5/6* одного из них и *VP1-VP3*, *VP6*, *NSP1*, *NSP3*, *NSP4* второго были связаны с прототипным штаммом BA222 РВА (Италия, 2005 г.). Остальные гены (а именно *VP4*, *VP7* и в случае одного штамма *NSP5/6*) произошли от человеческого DS-1-подобных штаммов генотипа G2P[4]. Штаммы с такой комбинацией генотипов были выявлены и охарактеризованы с помощью секвенирования всех сегментов генома впервые. В России и в мире сообщений о выявлении аналогичных штаммов G2P[4] ранее не отмечено. По всем генам, как по BA222, так и по DS-1-подобным, данные штаммы имели ближайших родственников из Нижнего Новгорода, что позволяет предположить их локальное происхождение.

Реассортантные штаммы, охарактеризованные в данной работе, не могли быть выявлены с помощью G/[P]-генотипирования методом ПЦР, которое рутинно используется для изучения РВ. Это подчеркивает важность применения полногеномной системы классификации и современных методов секвенирования для мониторинга циркуляции этого возбудителя.

Заключение

Результаты исследования в совокупности с полученными ранее данными расширяют представление о значительном генетическом разнообразии РВ и роли реассортантов в его поддержании. Эта информация важна для создания новых ротавирусных вакцин, понимания эволюционных процессов в популяции РВА и указывает на актуальность изучения генетической эволюции редких и новых штаммов вирусов. Для контроля появления новых вариантов необходим постоянный молекулярный мониторинг циркулирующих РВА с использованием полногеномной классификации.

ЛИТЕРАТУРА

1. GBD 2016 Diarrheal Disease Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and etiologies of diarrhea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect. Dis.* 2018; 18(11): 1211–28. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30362-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30362-1)
2. Troeger C., Khalil I.A., Rao P.C., Cao S., Blacker B.F., Ahmed T., et al. Rotavirus vaccination and the global burden of rotavirus diarrhea among children younger than 5 years. *JAMA Pediatr.* 2018; 172(10): 958–65. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2018.1960>
3. Sindhu K.N., Babji S., Ganesan S. Impact of rotavirus vaccines in low and middle-income countries. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2017; 30(5): 473–81. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000397>
4. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году». М.; 2023.
5. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 году». М.; 2024.
6. Rixon F., Taylor P., Desselberger U. Rotavirus RVA segments sized by electron microscopy. *J. Gen. Virol.* 1984; 56(1): 233–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-65-1-233>
7. Estes M.K., Kapikian A.Z. Rotaviruses. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 1917–73.

8. Estes M.K., Greenberg H.B. Rotaviruses. In: Knipe D.M., Howley P.M. eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2013: 1347–1401.
9. Matthijnsens J., Ciarlet M., Rahman M., Attoui H., Banyai K., Estes M.K., et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 2008; 153(8): 1621–9. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>
10. RCWG. Rotavirus classification working group; 2024. Available at: <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>
11. Matthijnsens J., Heylen E., Zeller M., Rahman M., Lemey P., Van Ranst M. Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol. Biol. Evol.* 2010; 27(10): 2431–6. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq137>
12. Maes P., Matthijnsens J., Rahman M., Van Ranst M. Rota C: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 238. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-238>
13. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Predominance of new G9P[8] rotaviruses closely related to Turkish strains in Nizhny Novgorod (Russia). *Arch. Virol.* 2017; 162(8): 2387–92. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3364-7>
14. Kiseleva V., Faizuloev E., Meskina E., Marova A., Oksanich A., Samartseva T., et al. Molecular-genetic characterization of human rotavirus A strains circulating in Moscow, Russia (2009–2014). *Viral Sin.* 2018; 33(4): 304–13. <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0043-0>
15. Doro R., Laszlo B., Martella V., Leshem E., Gentsch J., Parashar U., et al. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: is there evidence of strain selection from vaccine pressure? *Infect. Genet. Evol.* 2014; 28: 446–61. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.08.017>
16. Santos N., Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* 2005; 15(1): 29–56. <https://doi.org/10.1002/rmv.448>
17. Matthijnsens J., Ciarlet M., Heiman E., Arijs I., Delbeke T., McDonald S.M., et al. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J. Virol.* 2008; 82(7): 3204–19. <https://doi.org/10.1128/JVI.02257-07>
18. Heiman E.M., McDonald S.M., Barro M., Taraporewala Z.F., Bar-Magen T., Ndpattan J.T. Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *J. Virol.* 2008; 82(22): 11106–16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01402-08>
19. Upreti T., Wang D., Li F. Recent advances in rotavirus reverse genetics and its utilization in basic research and vaccine development. *Arch. Virol.* 2021; 166(9): 2369–86. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05142-7>
20. Nakagomi O., Ohshima A., Aboudy Y., Shif I., Mochizuki M., Nakagomi T., et al. Molecular identification by RNA-RNA hybridization of a human rotavirus that is closely related to rotaviruses of feline and canine origin. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(6): 1198–203. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.6.1198-1203.1990>
21. Matthijnsens J., Van Ranst M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr. Opin. Virol.* 2012; 2(4): 426–33. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.04.007>
22. Nakagomi T., Nakagomi O. RNA-RNA hybridization identifies a human rotavirus that is genetically related to feline rotavirus. *J. Virol.* 1989; 63(3): 1431–4. <https://doi.org/10.1128/JVI.63.3.1431-1434.1989>
23. Tsugawa T., Rainwater-Lovett K., Tsutsumi H. Human G3P[9] rotavirus strains possessing an identical genotype constellation to AU-1 isolated at high prevalence in Brazil, 1997–1999. *J. Gen. Virol.* 2015; 96(Pt. 3): 590–600. <https://doi.org/10.1099/vir.0.071373-0>
24. Cook N., Bridger J., Kendall K., Gomara M.I., El-Attar L., Gray J. The zoonotic potential of rotavirus. *J. Infect.* 2004; 48(4): 289–302. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2004.01.018>
25. Jain S., Vashist J., Changotra H. Rotaviruses: is their surveillance needed? *Vaccine.* 2014; 32(27): 3367–78. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.037>
26. Novikova N.A., Sashina T.A., Epifanova N.V., Kashnikov A.U., Morozova O.V. Long-term monitoring of G1P[8] rotaviruses circulating without vaccine pressure in Nizhny Novgorod, Russia, 1984–2019. *Arch. Virol.* 2020; 165(4): 865–75. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04553-2>
27. Gouvea V., Glass R.I., Woods P., Taniguchi K., Clark H.F., Forrester B., et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(2): 276–82. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.2.276-282.1990>
28. Gentsch J.R., Glass R.I., Woods P., Gouvea V., Gorziglia M., Flores J., et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30(6): 1365–73. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.6.1365-1373.1992>
29. Maunula L., von Bonsdorff C.H. Short sequences define genetic lineages: phylogenetic analysis of group A rotaviruses based on partial sequences of genome segments 4 and 9. *J. Gen. Virol.* 1998; 79(Pt. 2): 321–32. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-2-321>
30. Iturriza-Gómara M., Isherwood B., Desselberger U., Gray J. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J. Virol.* 2001; 75(8): 3696–705. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.8.3696-3705.2001>
31. Iturriza-Gómara M., Kang G., Gray J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J. Clin. Virol.* 2004; 31(4): 259–65. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.04.009>
32. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Genotype constellations of the rotavirus A strains circulating in Nizhny Novgorod, Russia, 2017–2018. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 85: 104578. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104578>
33. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 1980; 16(2): 111–20. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
34. Kumar S., Stecher G., Li M., Nnyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
35. Rahman M., Matthijnsens J., Yang X., Delbeke T., Arijs I., Taniguchi K., et al. Evolutionary history and global spread of the emerging g12 human rotaviruses. *J. Virol.* 2007; 81(5): 2382–90. <https://doi.org/10.1128/JVI.01622-06>
36. Mukherjee A., Dutta D., Ghosh S., Bagchi P., Chattopadhyay S., Nagashima S., et al. Full genomic analysis of a human group A rotavirus G9P[6] strain from Eastern India provides evidence for porcine-to-human interspecies transmission. *Arch. Virol.* 2009; 154(5): 733–46. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0363-3>
37. Ndze V.N., Esona M.D., Achidi E.A., Gonsu K.H., Doro R., Marton S., et al. Full genome characterization of human Rotavirus A strains isolated in Cameroon, 2010–2011: diverse combinations of the G and P genes and lack of reassortment of the backbone genes. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 28: 537–60. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.009>
38. Wang Y.H., Pang B.B., Zhou X., Shintani T., Urushibara N., et al. Molecular epidemiology and genetic evolution of the whole genome of G3P[8] human rotavirus in Wuhan, China, from 2000 through 2013. *PLoS One.* 2014; 9(3): e88850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088850>
39. Agbemabiese C.A., Nakagomi T., Doan Y.H., Nakagomi O. Whole genomic constellation of the first human G8 rotavirus strain detected in Japan. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 35: 184–93. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.033>
40. Sashina T.A., Velikzhanina E.I., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Detection and full-genotype characterization of rare and reassortant Rotavirus A strains in Nizhny Novgorod, European part of Russia. *Arch. Virol.* 2023; 168(8): 215. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05838-y>
41. Morozova O.V., Sashina T.A., Epifanova N.V., Velikzhanina E.I., Novikova N.A. Phylodynamic characteristics of reassortant DS-1-like G3P[8]-strains of rotavirus type A isolated in Nizhny Novgorod (Russia). *Braz. J. Microbiol.* 2023; 54(4): 2867–77. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01155-3>
42. Новикова Н.А., Сашина Т.А., Солнцев Л.А., Епифанова Н.В., Кашников А.Ю., Погодина Л.В. и др. Проявления эпидемического процесса ротавирусной инфекции в Нижнем Новгороде в предвакцинальный период. *Журнал микробиологии, эпиде-*

- миологии и иммунобиологии. 2017; 94(5): 46–52. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-5-46-52> <https://elibrary.ru/ysqaeq>
43. Морозова О.В., Сашина Т.А., Новикова Н.А. Обнаружение и молекулярная характеристика реассортантных DS-1-подобных G1P[8] штаммов ротавируса группы А. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(2): 91–6. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-91-96> <https://elibrary.ru/yjkhhh>
 44. Сашина Т.А., Морозова О.В., Епифанова Н.В., Кашников А.Ю., Леонов А.В., Новикова Н.А. Молекулярный мониторинг ротавирусов (Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus А), циркулирующих в Нижнем Новгороде (2012–2020 гг.): обнаружение штаммов с новыми генетическими характеристиками. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(2): 140–51. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-46> <https://elibrary.ru/azvpec>
 45. Martella V., Ciarlet M., Camarda A., Pratelli A., Tempesta M., Greco G. et al. Molecular characterization of the VP4, VP6, VP7, and NSP4 genes of lapine rotaviruses identified in Italy: emergence of a novel VP4 genotype. *Virology*. 2003; 314(1): 358–70. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(03\)00418-5](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(03)00418-5)
 46. Grant L., Esona M., Gentsch J., Watt J., Reid R., Weatherholtz R., et al. Detection of G3P[3] and G3P[9] rotavirus strains in American Indian children with evidence of gene reassortment between human and animal rotaviruses. *J. Med. Virol.* 2011; 83(7): 1288–99. <https://doi.org/10.1002/jmv.22076>
 47. Nakagomi O., Kaga E. Distinctness of NSP1 gene of human rotavirus AU-1 from NSP1 gene of other human genogroups. *Res. Virol.* 1995; 146(6): 423–8. [https://doi.org/10.1016/0923-2516\(96\)80902-2](https://doi.org/10.1016/0923-2516(96)80902-2)
 48. Theamboonlers A., Veravivrom M., Yambangyang O., Trairatvorakul P., Chongsrisawat V., Poovorawan Y. The incidence of rotavirus а isolates of G genotype in Thailand in 2002–2004. *Acta Virol.* 2005; 49(2): 111–5.
 49. Martella V.A., Potgieter C., Lorusso E., De Grazia S., Giammanco G.M., Matthijssens J., et al. A feline rotavirus G3P[9] carries traces of multiple reassortment events and resembles rare human G3P[9] rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 2011; 92(Pt. 5): 1214–21. <https://doi.org/10.1099/vir.0.027425-0>
 50. Matthijssens J., Ciarlet M., McDonald S.M., Attoui H., Banyai K., Brister J.R. et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the rotavirus classification working group (RCWG). *Arch. Virol.* 2011; 156(8): 1397–413. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1006-z>
 51. Theamboonlers A., Maiklang O., Thongmee T., Chieochansin T., Vuthitanachot V., Poovorawan Y. Complete genome analysis of a rare human G3P[9] rotavirus posing as an AU-1 like strain. *Springerplus*. 2013; 2: 569. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-569>
 52. Wang Y.H., Pang B.B., Zhou X., Ghosh S., Tang W.F. Peng J.S., et al. Complex evolutionary patterns of two rare human G3P[9] rotavirus strains possessing a feline/canine-like H6 genotype on an AU-1-like genotype constellation. *Infect. Genet. Evol.* 2013; 16: 103–12. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.01.016>
 53. Sanchez-Fauquier A., Montero V., Moreno S., Sole M., Colomina J., Iturriza-Gomara M., et al. Human rotavirus G9 and G3 as major cause of diarrhea in hospitalized children, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(10): 1536–41. <https://doi.org/10.3201/eid1210.060384>
 54. Khamrin P., Maneekarn N., Peerakome S., Tonusin S., Phan T.G., Okitsu S., et al. Molecular characterization of rare G3P[9] rotavirus strains isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis. *J. Med. Virol.* 2007; 79(6): 843–51. <https://doi.org/10.1002/jmv.20840>
 55. Inoue Y., Kitahori Y. Rare group a rotavirus G3P[9] isolated in Nara Prefecture, Japan. *Jpn J. Infect. Dis.* 2006; 59(2): 139–40.
 56. Iizuka M., Chiba M., Masamune O., Kaga E., Nakagomi T., Nakagomi O. A highly conserved genomic RNA constellation of Japanese isolates of human rotaviruses carrying G serotype 3 and P serotype 9. *Res. Virol.* 1994; 145(1): 21–4. [https://doi.org/10.1016/s0923-2516\(07\)80003-3](https://doi.org/10.1016/s0923-2516(07)80003-3)
 57. Griffin D.D., Nakagomi T., Hoshino Y., Nakagomi O., Kirkwood C.D., Parashar U.D., et al. Characterization of nontypeable rotavirus strains from the United States: identification of a new rotavirus reassortant (P2A[6], G12) and rare P3[9] strains related to bovine rotaviruses. *Virology*. 2002; 294(2): 256–69. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1333>
 58. Gollop R., Nakagomi O., Silberstein I., Shulman L.M., Greenberg H.B., Mendelson E., et al. Three forms of AU-1 like human rotaviruses differentiated by their overall genomic constellation and by the sequence of their VP8*. *Arch. Virol.* 1998; 143(2): 263–77. <https://doi.org/10.1007/s007050050285>
 59. Kaga E., Iizuka M., Nakagomi T., Nakagomi O. The distribution of G (VP7) and P (VP4) serotypes among human rotaviruses recovered from Japanese children with diarrhea. *Microbiol. Immunol.* 1994; 38(4): 317–20. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1994.tb01784.x>
 60. Сашина Т.А., Морозова О.В., Новикова Н.А. G/[P]-типы ротавируса А в г. Нижнем Новгороде: 2012–2014 гг. *Инфекция и иммунитет*. 2014; 4(1): 91. <https://elibrary.ru/vzqyan>
 61. Новикова Н.А., Пономарева Н.В., Новиков Д.В., Прилипов А.Г., Епифанова Н.В., Голицына Л.Н. Анализ нуклеотидных последовательностей гена NSP4 ротавирусов группы А, изолированных в Нижнем Новгороде. *Вопросы вирусологии*. 2008; 53(6): 35–9. <https://elibrary.ru/kaxfub>
 62. Nakagomi O., Nakagomi T., Oyamada H., Suto T. Relative frequency of human rotavirus subgroups 1 and 2 in Japanese children with acute gastroenteritis. *J. Med. Virol.* 1985; 17(1): 29–34. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890170105>
 63. Nakagomi O., Nakagomi T. Molecular evidence for naturally occurring single VP7 gene substitution reassortant between human rotaviruses belonging to two different genogroups. *Arch. Virol.* 1991; 119(1-2): 67–81. <https://doi.org/10.1007/BF01314324>
 64. Nakagomi O., Nakagomi T. Molecular epidemiology of human rotaviruses: genogrouping by RNA–RNA hybridization. *Arch. Virol.* 1996; 12: 93–8. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6553-9_11
 65. De Grazia S., Giammanco G.M., Potgieter C.A., Matthijssens J., Banyai K., Platia M.A., et al. Unusual assortment of segments in 2 rare human rotavirus genomes. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16(5): 859–62. <https://doi.org/10.3201/eid1605.091826>
 66. Banyai K., Laszlo B., Duque J., Steele A.D., Nelson E. Anthony S., et al. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine*. 2012; 30(1): 122–30. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.111>
 67. Tsugawa T., Hoshino Y. Whole genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. *Virology*. 2008; 380(2): 344–53. <https://doi.org/10.1016/j.viro.2008.07.041>
 68. Cao M., Yuan F., Zhang W., Wang X., Ma J., Ma X., et al. Genomic analysis of two rare human G3P[9] rotavirus strains in Ningxia, China. *Infect. Genet. Evol.* 2023; 116: 105518. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2023.105518>
 69. Mijatovic-Rustempasic S., Roy S., Sturgeon M., Rungrisuriyachai K., Esona M.D., Degroot D., et al. Full-genome sequence of a rare human G3P[9] rotavirus strain. *Genome Announc.* 2014; 2(2): e00143–14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00143-14>
 70. Jeong S., Lim I., Kim W. Whole-genome analysis of a rare human Korean G3P[9] rotavirus strain suggests a complex evolutionary origin potentially in evolving reassortment events between feline and bovine rotaviruses. *PLoS One*. 2014; 9(5): e97127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097127>

REFERENCES

1. GBD 2016 Diarrheal Disease Collaborators. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and etiologies of diarrhea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect. Dis.* 2018; 18(11): 1211–28. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30362-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30362-1)
2. Troeger C., Khalil I.A., Rao P.C., Cao S., Blacker B.F., Ahmed T., et al. Rotavirus vaccination and the global burden of rotavirus diarrhea among children younger than 5 years. *JAMA Pediatr.* 2018; 172(10): 958–65. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2018.1960>
3. Sindhu K.N., Babji S., Ganesan S. Impact of rotavirus vaccines in low and middle-income countries. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2017; 30(5): 473–81. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000397>
4. State Report «On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2022». Moscow; 2023. (in Russian)
5. State report «On the state of sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2023». Moscow; 2024. (in Russian)

6. Rixon F., Taylor P., Desselberger U. Rotavirus RVA segments sized by electron microscopy. *J. Gen. Virol.* 1984; 56(1): 233–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-65-1-233>
7. Estes M.K., Kapikian A.Z. Rotaviruses. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 1917–73.
8. Estes M.K., Greenberg H.B. Rotaviruses. In: Knipe D.M., Howley P.M. eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2013: 1347–1401.
9. Matthijnsens J., Ciarlet M., Rahman M., Attoui H., Banyai K., Estes M.K., et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 2008; 153(8): 1621–9. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>
10. RCWG. Rotavirus classification working group; 2024. Available at: <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>
11. Matthijnsens J., Heylen E., Zeller M., Rahman M., Lemey P., Van Ranst M. Phylodynamic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol. Biol. Evol.* 2010; 27(10): 2431–6. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq137>
12. Maes P., Matthijnsens J., Rahman M., Van Ranst M. Rota C: a web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 238. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-238>
13. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Predominance of new G9P[8] rotaviruses closely related to Turkish strains in Nizhny Novgorod (Russia). *Arch. Virol.* 2017; 162(8): 2387–92. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3364-7>
14. Kiseleva V., Faizuloev E., Meskina E., Marova A., Oksanich A., Samartseva T., et al. Molecular-genetic characterization of human rotavirus A strains circulating in Moscow, Russia (2009–2014). *Virol. Sin.* 2018; 33(4): 304–13. <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0043-0>
15. Doro R., Laszlo B., Martella V., Leshem E., Gentsch J., Parashar U., et al. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: is there evidence of strain selection from vaccine pressure? *Infect. Genet. Evol.* 2014; 28: 446–61. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.08.017>
16. Santos N., Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev. Med. Virol.* 2005; 15(1): 29–56. <https://doi.org/10.1002/rmv.448>
17. Matthijnsens J., Ciarlet M., Heiman E., Arijs I., Delbeke T., McDonald S.M., et al. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J. Virol.* 2008; 82(7): 3204–19. <https://doi.org/10.1128/JVI.02257-07>
18. Heiman E.M., McDonald S.M., Barro M., Taraporewala Z.F., Bar-Magen T., Ndpattan J.T. Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *J. Virol.* 2008; 82(22): 11106–16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01402-08>
19. Upreti T., Wang D., Li F. Recent advances in rotavirus reverse genetics and its utilization in basic research and vaccine development. *Arch. Virol.* 2021; 166(9): 2369–86. <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05142-7>
20. Nakagomi O., Ohshima A., Aboudy Y., Shif I., Mochizuki M., Nakagomi T., et al. Molecular identification by RNA-RNA hybridization of a human rotavirus that is closely related to rotaviruses of feline and canine origin. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(6): 1198–203. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.6.1198-1203.1990>
21. Matthijnsens J., Van Ranst M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr. Opin. Virol.* 2012; 2(4): 426–33. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.04.007>
22. Nakagomi T., Nakagomi O. RNA-RNA hybridization identifies a human rotavirus that is genetically related to feline rotavirus. *J. Virol.* 1989; 63(3): 1431–4. <https://doi.org/10.1128/JVI.63.3.1431-1434.1989>
23. Tsugawa T., Rainwater-Lovett K., Tsutsumi H. Human G3P[9] rotavirus strains possessing an identical genotype constellation to AU-1 isolated at high prevalence in Brazil, 1997–1999. *J. Gen. Virol.* 2015; 96(Pt. 3): 590–600. <https://doi.org/10.1099/vir.0.071373-0>
24. Cook N., Bridger J., Kendall K., Gomara M.I., El-Attar L., Gray J. The zoonotic potential of rotavirus. *J. Infect.* 2004; 48(4): 289–302. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2004.01.018>
25. Jain S., Vashist J., Changotra H. Rotaviruses: is their surveillance needed? *Vaccine.* 2014; 32(27): 3367–78. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.037>
- Novikova N.A., Sashina T.A., Epifanova N.V., Kashnikov A.U., Morozova O.V. Long-term monitoring of G1P[8] rotaviruses circulating without vaccine pressure in Nizhny Novgorod, Russia, 1984–2019. *Arch. Virol.* 2020; 165(4): 865–75. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04553-2>
26. Gouvea V., Glass R.I., Woods P., Taniguchi K., Clark H.F., Forrester B., et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(2): 276–82. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.2.276-282.1990>
27. Gentsch J.R., Glass R.I., Woods P., Gouvea V., Gorziglia M., Flores J., et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30(6): 1365–73. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.6.1365-1373.1992>
28. Maunula L., von Bonsdorff C.H. Short sequences define genetic lineages: phylogenetic analysis of group A rotaviruses based on partial sequences of genome segments 4 and 9. *J. Gen. Virol.* 1998; 79(Pt. 2): 321–32. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-2-321>
29. Iturriza-Gómara M., Isherwood B., Desselberger U., Gray J. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J. Virol.* 2001; 75(8): 3696–705. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.8.3696-3705.2001>
30. Iturriza-Gómara M., Kang G., Gray J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J. Clin. Virol.* 2004; 31(4): 259–65. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.04.009>
31. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Genotype constellations of the rotavirus A strains circulating in Nizhny Novgorod, Russia, 2017–2018. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 85: 104578. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104578>
32. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 1980; 16(2): 111–20. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
33. Kumar S., Stecher G., Li M., Nkayac Z., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
34. Rahman M., Matthijnsens J., Yang X., Delbeke T., Arijs I., Taniguchi K., et al. Evolutionary history and global spread of the emerging g12 human rotaviruses. *J. Virol.* 2007; 81(5): 2382–90. <https://doi.org/10.1128/JVI.01622-06>
35. Mukherjee A., Dutta D., Ghosh S., Bagchi P., Chattopadhyay S., Nagashima S., et al. Full genomic analysis of a human group A rotavirus G9P[6] strain from Eastern India provides evidence for porcine-to-human interspecies transmission. *Arch. Virol.* 2009; 154(5): 733–46. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0363-3>
36. Ndze V.N., Esona M.D., Achidi E.A., Gonsu K.H., Doro R., Marton S., et al. Full genome characterization of human Rotavirus A strains isolated in Cameroon, 2010–2011: diverse combinations of the G and P genes and lack of reassortment of the backbone genes. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 28: 537–60. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.009>
37. Wang Y.H., Pang B.B., Ghosh S., Zhou X., Shintani T., Urushibara N., et al. Molecular epidemiology and genetic evolution of the whole genome of G3P[8] human rotavirus in Wuhan, China, from 2000 through 2013. *PLoS One.* 2014; 9(3): e88850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088850>
38. Agbemabiese C.A., Nakagomi T., Doan Y.H., Nakagomi O. Whole genomic constellation of the first human G8 rotavirus strain detected in Japan. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 35: 184–93. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.033>
39. Sashina T.A., Velikzhanina E.I., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Detection and full-genotype characterization of rare and reassortant Rotavirus A strains in Nizhny Novgorod, European part of Russia. *Arch. Virol.* 2023; 168(8): 215. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05838-y>
40. Morozova O.V., Sashina T.A., Epifanova N.V., Velikzhanina E.I., Novikova N.A. Phylodynamic characteristics of reassortant DS-1-like G3P[8]-strains of rotavirus type A isolated in Nizhny Novgorod (Russia). *Braz. J. Microbiol.* 2023; 54(4): 2867–77. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-01155-3>
41. Novikova N.A., Sashina T.A., Solntsev L.A., Epifanova N.V., Kashnikov A.Yu., Pogodina L.V., et al. Manifestations of epidemic

- process of rotavirus infection in Nizhny Novgorod in pre-vaccination period. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2017; 94(5): 46–52. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-5-46-52> <https://elibrary.ru/ysqaeq> (in Russian)
42. Morozova O.V., Sashina T.A., Novikova N.A. Detection and molecular characterization of reassortant DS-1-like G1P[8] strains of rotavirus A. *Voprosy virusologii*. 2017; 62(2): 91–6. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-91-96> <https://elibrary.ru/yjkhhh>
 43. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Kashnikov A.U., Leonov A.V., Novikova N.A. Molecular monitoring of the rotavirus (Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A) strains circulating in Nizhny Novgorod (2012–2020): detection of the strains with the new genetic features. *Voprosy virusologii*. 2021; 66(2): 140–51. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-46> <https://elibrary.ru/azvpec> (in Russian)
 44. Martella V., Ciarlet M., Camarda A., Pratelli A., Tempesta M., Greco G. et al. Molecular characterization of the VP4, VP6, VP7, and NSP4 genes of lapine rotaviruses identified in Italy: emergence of a novel VP4 genotype. *Virology*. 2003; 314(1): 358–70. [https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(03\)00418-5](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(03)00418-5)
 45. Grant L., Esona M., Gentsch J., Watt J., Reid R., Weatherholtz R., et al. Detection of G3P[3] and G3P[9] rotavirus strains in American Indian children with evidence of gene reassortment between human and animal rotaviruses. *J. Med. Virol.* 2011; 83(7): 1288–99. <https://doi.org/10.1002/jmv.22076>
 46. Nakagomi O., Kaga E. Distinctness of NSP1 gene of human rotavirus AU-1 from NSP1 gene of other human genogroups. *Res. Virol.* 1995; 146(6): 423–8. [https://doi.org/10.1016/0923-2516\(96\)80902-2](https://doi.org/10.1016/0923-2516(96)80902-2)
 47. Theamboonlers A., Veravivrom M., Yambangyang O., Trairatvorakul P., Chongsrisawat V., Poovorawan Y. The incidence of rotavirus isolates of G genotype in Thailand in 2002–2004. *Acta Virol.* 2005; 49(2): 111–5.
 48. Martella V.A., Potgieter C., Lorusso E., De Grazia S., Giammanco G.M., Matthijnsens J., et al. A feline rotavirus G3P[9] carries traces of multiple reassortment events and resembles rare human G3P[9] rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 2011; 92(Pt. 5): 1214–21. <https://doi.org/10.1099/vir.0.027425-0>
 49. Matthijnsens J., Ciarlet M., McDonald S.M., Attoui H., Banyai K., Brister J.R. et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the rotavirus classification working group (RCWG). *Arch. Virol.* 2011; 156(8): 1397–413. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1006-z>
 50. Theamboonlers A., Maiklang X., Thongmee T., Chieochansin T., Vuthitanachot V., Poovorawan Y. Complete genome analysis of a rare human G3P[9] rotavirus posing as an AU-1 like strain. *Springerplus*. 2013; 2: 569. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-569>
 51. Wang Y.H., Pang B.B., Zhou X., Ghosh S., Tang W.F., Peng J.S., et al. Complex evolutionary patterns of two rare human G3P[9] rotavirus strains possessing a feline/canine-like H6 genotype on an AU-1-like genotype constellation. *Infect. Genet. Evol.* 2013; 16: 103–12. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.01.016>
 52. Sanchez-Fauquier A., Montero V., Moreno S., Sole M., Colomina J., Iturriza-Gomara M., et al. Human rotavirus G9 and G3 as major cause of diarrhea in hospitalized children, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(10): 1536–41. <https://doi.org/10.3201/eid1210.060384>
 53. Khamrin P., Maneekarn N., Peerakome S., Tonusin S., Phan T.G., Okitsu S., et al. Molecular characterization of rare G3P[9] rotavirus strains isolated from children hospitalized with acute gastroenteritis. *J. Med. Virol.* 2007; 79(6): 843–51. <https://doi.org/10.1002/jmv.20840>
 54. Inoue Y., Kitahori Y. Rare group A rotavirus G3P[9] isolated in Nara Prefecture, Japan. *Jpn J. Infect. Dis.* 2006; 59(2): 139–40.
 55. Iizuka M., Chiba M., Masamune O., Kaga E., Nakagomi T., Nakagomi O. A highly conserved genomic RNA constellation of Japanese isolates of human rotaviruses carrying G serotype 3 and P serotype 9. *Res. Virol.* 1994; 145(1): 21–4. [https://doi.org/10.1016/S0923-2516\(07\)80003-3](https://doi.org/10.1016/S0923-2516(07)80003-3)
 56. Griffin D.D., Nakagomi T., Hoshino Y., Nakagomi O., Kirkwood C.D., Parashar U.D., et al. Characterization of nontypeable rotavirus strains from the United States: identification of a new rotavirus reassortant (P2A[6], G12) and rare P3[9] strains related to bovine rotaviruses. *Virology*. 2002; 294(2): 256–69. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1333>
 57. Gollop R., Nakagomi O., Silberstein I., Shulman L.M., Greenberg H.B., Mendelson E., et al. Three forms of AU-1 like human rotaviruses differentiated by their overall genomic constellation and by the sequence of their VP8*. *Arch. Virol.* 1998; 143(2): 263–77. <https://doi.org/10.1007/s007050050285>
 58. Kaga E., Iizuka M., Nakagomi T., Nakagomi O. The distribution of G (VP7) and P (VP4) serotypes among human rotaviruses recovered from Japanese children with diarrhea. *Microbiol. Immunol.* 1994; 38(4): 317–20. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1994.tb01784.x>
 59. Sashina T.A., Morozova O.V., Novikova N.A. G/[P]-types of rotavirus A in Nizhny Novgorod: 2012–2014. *Infektsiya i immunitet*. 2014; 4(1): 91. <https://elibrary.ru/vzqyan> (in Russian)
 60. Novikova N.A., Ponomareva N.V., Novikov D.V., Prilipov A.G., Epifanova N.V., Golitsyna L.N. Nucleotide sequence analysis of the nsp4 gene from group A rotavirus-es isolated in Nizhny Novgorod. *Voprosy virusologii*. 2008; 53(6): 35–9. <https://elibrary.ru/kaxfub> (in Russian)
 61. Nakagomi O., Nakagomi T., Oyamada H., Suto T. Relative frequency of human rotavirus subgroups 1 and 2 in Japanese children with acute gastroenteritis. *J. Med. Virol.* 1985; 17(1): 29–34. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890170105>
 62. Nakagomi O., Nakagomi T. Molecular evidence for naturally occurring single VP7 gene substitution reassortant between human rotaviruses belonging to two different genogroups. *Arch. Virol.* 1991; 119(1-2): 67–81. <https://doi.org/10.1007/BF01314324>
 63. Nakagomi O., Nakagomi T. Molecular epidemiology of human rotaviruses: genogrouping by RNA–RNA hybridization. *Arch. Virol.* 1996; 12: 93–8. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6553-9_11
 64. De Grazia S., Giammanco G.M., Potgieter C.A., Matthijnsens J., Banyai K., Platia M.A., et al. Unusual assortment of segments in 2 rare human rotavirus genomes. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16(5): 859–62. <https://doi.org/10.3201/eid1605.091826>
 65. Banyai K., Laszlo B., Duque J., Steele A.D., Nelson E. Anthony S., et al. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine*. 2012; 30(1): 122–30. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.111>
 66. Tsugawa T., Hoshino Y. Whole genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. *Virology*. 2008; 380(2): 344–53. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.07.041>
 67. Cao M., Yuan F., Zhang W., Wang X., Ma J., Ma X., et al. Genomic analysis of two rare human G3P[9] rotavirus strains in Ningxia, China. *Infect. Genet. Evol.* 2023; 116: 105518. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2023.105518>
 68. Mijatovic-Rustempasic S., Roy S., Sturgeon M., Rungsriruriyachai K., Esona M.D., Degroot D., et al. Full-genome sequence of a rare human G3P[9] rotavirus strain. *Genome Announc.* 2014; 2(2): e00143–14. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00143-14>
 69. Jeong S., Lim I., Kim W. Whole-genome analysis of a rare human Korean G3P[9] rotavirus strain suggests a complex evolutionary origin potentially in evolving reassortment events between feline and bovine rotaviruses. *PLoS One*. 2014; 9(5): e97127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097127>

Информация об авторах:

Великжанина Елена Игоревна – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия. E-mail: www.e_velikzhanina@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4069-1427>

Сашина Татьяна Александровна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия. E-mail: tatyana.sashina@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-3203-7863>

Морозова Ольга Владимировна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия. E-mail: Olga.morozova.bsc@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-8058-8187>

Кашников Александр Юрьевич – научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия. E-mail: a.kashn@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1033-7347>

Епифанова Наталия Владимировна – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия. E-mail: epifanovanv@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7679-8029>

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

Участие авторов: Великжанина Е.И. – разработка концепции и проведение экспериментальных исследований, обработка результатов, анализ и обобщение данных литературы, написание и редактирование текста; Сашина Т.А. – разработка концепции и контроль проведения исследований, редактирование текста; Морозова О.В. – критический пересмотр текста рукописи; Кашников А.Ю. – проведение экспериментальных исследований; Епифанова Н.В. – проведение экспериментальных исследований, критический пересмотр текста рукописи; Новикова Н.А. – организация и контроль проведения исследований, критический пересмотр текста рукописи, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Поступила 15.07.2024
Принята в печать 26.08.2024
Опубликована 31.08.2024

Information about the authors:

Elena I. Velikzhanina✉ – Junior Researcher, laboratory of molecular epidemiology of viral infections I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: www_e_velikzhanina@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4069-1427>

Tatiana A. Sashina – PhD, Senior Researcher, laboratory of molecular epidemiology of viral infections I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: tatyana.sashina@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-3203-7863>

Olga V. Morozova – PhD, Senior Researcher, laboratory of molecular epidemiology of viral infections I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: Olga.morozova.bsc@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-8058-8187>

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

Natalia V. Epifanova – PhD, Leading Researcher, laboratory of molecular epidemiology of viral infections I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: epifanovanv@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7679-8029>

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

Contribution: Velikzhanina E.I. – concept development and conducting experimental studies, results processing, analysis and generalization of literature data, writing and editing text; Sashina T.A. – concept development and control of research, editing of the text; O.V. Morozova – critical revision of the manuscript text; Kashnikov A.Yu. – conducting experimental research; Epifanova N.V. – conducting experimental research, critical revision of the manuscript text; Novikova N.A. – organization and control of research, critical revision of the text of the manuscript, approval of the final version of the article for publication.

Received 15 July 2024
Accepted 26 August 2024
Published 31 August 2024

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-257>

© ОХЛОПКОВА О.В., ГОНЧАРОВ А.Е., АСЛАНОВ Б.И., ФАДЕЕВ А.В., ДАВИДЮК Ю.Н., МОШКИН А.Д., СТОЛБУНОВА К.А., СТЕПАНЮК М.А., СОБОЛЕВ И.А., ТЮМЕНЦЕВА М.А., ТЮМЕНЦЕВ А.И., ШЕСТОПАЛОВ А.М., АКИМКИН В.Г., 2024

Первое обнаружение вирусов гриппа А субтипов H1N1 и H3N8 в Антарктическом регионе: о. Кинг-Джордж, 2023 год

Охлопкова О.В.^{1,2*}, Гончаров А.Е.^{3,4}, Асланов Б.И.⁴, Фадеев А.В.⁵, Давидюк Ю.Н.⁶, Мошкин А.Д.², Столбунова К.А.², Степанюк М.А.², Соболев И.А.², Тюменцева М.А.¹, Тюменцев А.И.¹, Шестопалов А.М.², Акимкин В.Г.¹¹ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Россия;²Научно-исследовательский институт вирусологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», 630060, г. Новосибирск, Россия;³ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197022, г. Санкт-Петербург, Россия;⁴ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздрава России, 191015, г. Санкт-Петербург, Россия;⁵ФГБУ Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург, Россия;⁶Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 420008, г. Казань, Россия

Резюме

Актуальность. Вирус гриппа типа «А» (далее – вирус гриппа А) относится к семейству *Orthomyxoviridae* и характеризуется сегментированным одноцепочечным РНК-геномом. Такая организация генома вируса обуславливает возможность реассортации, которая может приводить к появлению новых вариантов вируса. Основным естественным резервуаром большинства субтипов вируса гриппа А являются дикие водоплавающие птицы. Сезонные миграции собирают водоплавающих птиц со всех основных миграционных путей в районы гнездования около Северного и Южного полярных кругов. Это делает возможным межконтинентальное распространение субтипов вируса гриппа А. Наблюдение за развитием птичьего гриппа, особенно на территориях, ранее изолированных от человеческой деятельности, каким является Антарктический регион, имеет большое значение.

Цель исследования – проведение молекулярно-генетического мониторинга и изучение филогенетических связей вариантов вируса гриппа А, циркулирующего на территории Антарктики в 2023 г.

Материалы и методы. Исследовали 84 образца биологического материала, полученного от птиц и морских млекопитающих в апреле–мае 2023 г. на прибрежных территориях Антарктики. Для 3 образцов проводили секвенирование на платформе Miseq, Illumina и филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей геномов вируса гриппа А.

Результаты. Подтверждена циркуляция птичьего гриппа в Антарктическом регионе. Выявлена гетерогенность пула циркулировавших вариантов вируса гриппа А (H3N8, H1N1). Секвенированы полноразмерные геномы вируса птичьего гриппа и размещены в открытой базе данных GISAID, что дополняет глобальную картину эволюционной изменчивости вирусов гриппа в мире (EPI_ISL_19032103, 19174530, 19174467).

Заключение. Изучение генетического разнообразия циркулирующих в полярных регионах Земли вирусов гриппа А и выявление присущих им условий возникновения новых генетических вариантов имеет важное теоретическое значение с научной точки зрения и является актуальной задачей для разработки мер по предотвращению биологических угроз.

Ключевые слова: вирус птичьего гриппа; субтип H1N1; субтип H3N8; полногеномное секвенирование; Антарктика

Для цитирования: Охлопкова О.В., Гончаров А.Е., Асланов Б.И., Фадеев А.В., Давидюк Ю.Н., Мошкин А.Д., Столбунова К.А., Степанюк М.А., Соболев И.А., Тюменцева М.А., Тюменцев А.И., Шестопалов А.М., Акимкин В.Г. Первое обнаружение вирусов гриппа А субтипов H1N1 и H3N8 в Антарктическом регионе: о. Кинг-Джордж, 2023 год. *Вопросы вирусологии.* 2024; 69(4): 377–389. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-257> EDN: <https://elibrary.ru/qujzfv>

Благодарность. Коллектив авторов выражает признательность руководству Российской антарктической экспедиции за помощь в проведении полевых исследований. Авторы признательны всем исследователям, участвовавшим на разных этапах реализации этой работы, особенно сотрудникам лаборатории молекулярной вирусологии ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева за методическую поддержку, а также В.Л. Семину (Институт океанологии РАН).

Источник финансирования. Получение биологического материала от полярных крачек (*Sterna paradisaea*) проводилось в рамках исследований по изучению микробиоты арктических видов птиц, поддержанных грантом РФФ № 23-25-00128 «Антибиотикорезистентные бактерии, ассоциированные с орнитогенными экосистемами Арктики: генетические особенности и эпидемиологический потенциал».

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

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-257>

First detection of influenza A virus subtypes H1N1 and H3N8 in the Antarctic region: King George Island, 2023

Ohlopkova O.V.^{1,2*}, Goncharov A.E.^{3,4}, Aslanov B.I.⁴, Fadeev A.V.⁵, Davidyuk Yu.N.⁶, Moshkin A.D.², Stolbunova K.A.², Stepanyuk M.A.², Sobolev I.A.², Tyumentseva M.A.¹, Tyumentsev A.I.¹, Shestopalov A.M.², Akimkin V.G.¹

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

²Virology Research Institute of the Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, 630060, Novosibirsk, Russia;

³Institute of Experimental Medicine, 197022, St. Petersburg, Russia;

⁴Northwestern State Medical University named after I.I. Mechnikov, 191015, St. Petersburg, Russia;

⁵A.A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, 197376, St. Petersburg, Russia;

⁶Federal State Educational Institution of Higher Education «Kazan (Volga Region) Federal University», 420008, Kazan, Russia

Abstract

Relevance. Influenza A virus is characterized by a segmented single-stranded RNA genome. Such organization of the virus genome determines the possibility of reassortment, which can lead to the emergence of new virus variants. The main natural reservoir of most influenza A virus subtypes are wild waterfowl. Seasonal migrations gather waterfowl from all major migration routes to nesting areas near the northern and southern polar circles. This makes intercontinental spread of influenza A viruses possible.

Objective – to conduct molecular genetic monitoring and study the phylogenetic relationships of influenza A virus variants circulating in Antarctica in 2023.

Materials and methods. We studied 84 samples of biological material obtained from birds and marine mammals in April–May 2023 in coastal areas of Antarctica. For 3 samples, sequencing was performed on the Miseq, Illumina platform and phylogenetic analysis of the obtained nucleotide sequences of the influenza A virus genomes was performed.

Results. The circulation of avian influenza virus in the Antarctic region was confirmed. Heterogeneity of the pool of circulating variants of the influenza A virus (H3N8, H1N1) was revealed. Full-length genomes of the avian influenza virus were sequenced and posted in the GISAID database (EPI_ISL_19032103, 19174530, 19174467).

Conclusion. The study of the genetic diversity of influenza A viruses circulating in the polar regions of the Earth and the identification of the conditions for the emergence of new genetic variants is a relevant task for the development of measures to prevent biological threats.

Keywords: avian influenza virus; subtype H1N1; subtype H3N8; whole genome sequencing; Antarctica

For citation: Ohlopkova O.V., Goncharov A.E., Aslanov B.I., Fadeev A.V., Davidyuk Y.N., Moshkin A.D., Stolbunova K.A., Stepanyuk M.A., Sobolev I.A., Tyumentseva M.A., Tyumentsev A.I., Shestopalov A.M., Akimkin V.G. First detection of influenza A virus subtypes H1N1 and H3N8 in the Antarctic region: King George Island, 2023. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(4): 377–389. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-257> EDN: <https://elibrary.ru/qujzfv>

Funding. Obtaining biological material from Arctic terns (*Sterna paradisaea*) was carried out as part of research on the microbiota of Arctic bird species, supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-25-00128 «Antibiotic-resistant bacteria associated with Arctic ornithogenic ecosystems: genetic characteristics and epidemic potential».

Acknowledgement. The authors express their gratitude to the leadership of the Russian Antarctic Expedition for assistance in conducting field studies. The authors are grateful to all researchers who participated in different stages of this work, especially to the staff of the Laboratory of Molecular Virology of the A. A. Smorodintsev Research Institute of Influenza for methodological support, as well as to V.L. Semin, Institute of Oceanology of the Russian Academy of Sciences.

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

Введение

Вирус гриппа типа «А» (далее – вирус гриппа А) относится к семейству *Orthomyxoviridae* и характеризуется сегментированным одноцепочечным РНК-геномом. Такая организация генома вируса обуславливает возможность reassortации, которая может приводить к появлению новых вариантов вируса [1]. Основным естественным резервуаром ортомиксовирусов, в том числе большинства субтипов вирусов гриппа, являются колониальные морские птицы [2–5]. Способ-

ность птиц этой группы совершать длительные миграции, наряду с их массовостью в пределах колоний, способствует трансконтинентальному распространению субтипов вируса гриппа А и расширяет возможности передачи последних разным видам животных, что в свою очередь, может способствовать появлению новых вариантов и видов вирусов вследствие рекомбинации и reassortации их геномов [1, 6–8].

Приполярные области планеты в силу сочетания особых физико-географических и экологических

условий являются точками притяжения миллионов перелетных морских птиц и млекопитающих, представляя собой активную зону межвидовых контактов [9–13]. Циркуляция вируса гриппа А в природных биоценозах Антарктики и Арктики известна с середины 70-х гг. прошлого века. Вирус изолировали здесь от птиц и китообразных. В Антарктическом регионе вирусы птичьего гриппа были впервые выявлены в 1976 г. – 14 штаммов субтипа вируса гриппа А H1N3 были выделены из тканей легкого и печени китов семейства полосатиковых (*Balaenopteridae*) [14]. В арктической части Канады в 1984–1997 гг. у 1,2% белух серологическими методами были обнаружены антитела к вирусам гриппа А [15]. Позднее, в начале 2000-х гг. в Антарктике была выявлена циркуляция вируса птичьего гриппа среди птиц [16].

Одной из полярных территорий, располагающих существенным биологическим разнообразием, являются Южные Шетландские острова, расположенные к северу от Антарктического полуострова. Самым крупным из островов этого архипелага является остров Кинг-Джордж (Ватерлоо).

На острове расположен ряд полярных исследовательских станций, принадлежащих Аргентине («Карлини»), Бразилии («Команданте Феррас»), Китаю («Чанчэн – Великая Стена»), Польше («Генрик Артковский»), России («Беллинсгаузен»), Уругваю («Генерал Артигас»), Перу («Мачу-Пикчу»), Чили («Президент Эдуардо Фрей») и Южной Корее («Король Седжон»). Кроме того, остров располагает туристическим потенциалом: на нем регулярно проводят короткие экскурсии для десятков туристов, прибывающих морским или авиационным транспортом. На территории острова обитает 12 видов птиц, в том числе поморники Лоннберга (*Catharacta antarctica lonnbergi*), южнополярные поморники (*Catharacta maccormicki*), белая ржанка (*Chionis alba*), капский буревестник (*Daption capense*), доминиканская чайка (*Larus dominicanus*), южный гигантский буревестник (*Macronectes giganteus*), качурка Вильсон (*Oceanites oceanicus*), чернобрюхая качурка (*Fregetta tropica*), пингвин Адели (*Pygoscelis adeliae*), антарктический пингвин (*P. antarctica*), пингвин папуа (*P. papua*) и антарктическая крачка (*Sterna vittata*) [17, 18]. Из видов млекопитающих наиболее многочисленными являются тюлени Уэдделла (*Leptonychotes weddellii*) и южные морские слоны (*Mirounga leonina*). Район также посещаем антарктическими морскими котиками (*Arctocephalus gazella*) и морскими леопардами (*Hydrurga leptonyx*) [19].

Таким образом, эта территория обладает сочетанием уникальных факторов, включающих обилие мест гнездования дальнеперелетных птиц, большие популяции потенциально восприимчивых диких животных – эндемиков, ротирующиеся группы туристов и персонала полярных станций.

В 2011 г. впервые была выявлена циркуляция вируса гриппа А на Антарктическом континенте. Вирус имел субтип H4N7 и был получен из биоматериала от гигантского буревестника. Также в этом году было идентифицировано два образца субтипа H6N8 от антаркти-

ческого поморника и антарктического пингвина [16]. В 2013 г. лаборатория респираторных вирусов Института Освальдо Круза (Бразилия) осуществила сбор 95 образцов птичьих фекалий, которые были отобраны в колониях пингвинов на Южных Шетландских островах, недалеко от Антарктики, и протестированы методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) для обнаружения вируса птичьего гриппа. В результате были получены 4 полноразмерных генома вируса гриппа А субтипа H11N2. Биоматериалом послужили фекалии пингвинов Адели [16]. В 2015 г. Сотрудничающим центром Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) по исследованиям в области гриппа в Мельбурне (Австралия) были получены образцы от антарктических пингвинов, в которых удалось детектировать субтип H5N5. В 2017 г. также было получено несколько образцов субтипа H11N2 [20]. В то же время в базе данных GISAID отсутствует информация о субтипах вируса гриппа А, циркулировавших в Антарктическом регионе в период с 2018 по 2022 г. Первые сообщения в СМИ о том, что высокопатогенный птичий грипп субтипа H5N1 достиг антарктического региона, поступили в октябре 2023 г.¹ Его выявили на субантарктических островах. Вирус идентифицировали на территории Южной Джорджии и на Южных Сандвичевых островах, примерно в 1600 км от материковой части Антарктиды. Также он достиг Фолклендских островов. Первыми от птичьего гриппа стали массово погибать чайки, поморники и крачки, затем болезнь распространилась на альбатросов, пингвинов и антарктических глупышей. Грипп А субтипа H5N1 был выявлен также у млекопитающих – им болели морские слоны и морские котики. Всего в базе данных GISAID за 2023 г. представлено 18 изолятов субтипа H5N1 из суммарно 21 секвенированного образца гриппа птиц из Антарктики. Субтипы гриппа А, которые были идентифицированы в 2023 г. помимо H5N1, – это H3N8 (2 образца) и H1N1 (1 образец) [21].

Таким образом, в связи с высокой изменчивостью вирусов гриппа, ВОЗ постоянно подчеркивает необходимость ведения глобального эпиднадзора для выявления генетических изменений в геноме вирусов гриппа А, особенно в отношении широко циркулирующих субтипов, каким является H3N8. Ввиду перечисленных фактов, мониторинг возбудителей птичьего гриппа на территориях Антарктики является необходимым и актуальным.

Цель работы заключалась в выявлении генетических вариантов вируса гриппа А, циркулирующих на прибрежных территориях Антарктики, и определении характеристик их генома.

Материалы и методы

Биологический материал для исследования (фекалии, выделения птиц и морских млекопитающих, всего 84 образца) был собран в ходе маршрутных работ,

¹The Guardian. Catastrophic: bird flu reaches Antarctic for the first time. Available at: <https://theguardian.com/environment/2023/oct/24/catastrophic-penguins-and-seals-at-risk-as-bird-flu-reaches-antarctic-aoe>

проведенных в пределах полуострова Файлдс острова Кинг-Джордж в апреле–мае 2023 г. Видовой состав обследованных представителей антарктической фауны: чернобрюхая качурка (9 положительных образцов при детекции РНК гриппа А), антарктический буревестник (1 положительный образец), толстоклювый прион (3 положительных образца), полярная крачка (2 положительных образца), антарктический баклан (1 положительный образец), снежный буревестник (7 положительных образцов), пингвин папуа (3 положительных образца), доминиканская чайка (2 положительных образца), морской слон (6 положительных образцов), белая ржанка (1 положительный образец), южный гигантский буревестник (1 положительный образец), южнополярный поморник (7 положительных образцов), пингвин Адели (3 положительных образца).

Экстракцию общей РНК проводили с использованием набора для выделения РНК из клеток животных/бактерий, мазка/соскоба эпителиальных клеток, вирусов на колонках от компании ООО «Биолабмикс» (Россия). Индикацию РНК гриппа птиц осуществляли с помощью ОТ-ПЦР с детекцией результатов методом гелелектрофореза с использованием набора «БиоМастер ОТ-ПЦР-Премиум (2×)» (ООО «Биолабмикс», Россия).

Секвенирование полноразмерного генома вируса гриппа птиц выполняли с помощью наборов реагентов компании ООО «БиоЛинк» (Россия): набор для ферментативной фрагментации нуклеиновых кислот; набор реагентов для подготовки NGS-библиотек для платформы Illumina. Очистку комплементарной ДНК производили на магнитных частицах для очистки ДНК VAHTS DNA Clean Beads, (Vazyme, Китай). Геномные библиотеки секвенировали на платформе MiSeq, Illumina с использованием MiSeq Reagent Kit v3 600-cycle. Для выравнивания полученных прочтений на референсную последовательность использовали алгоритм BWA. Для получения консенсусных последовательностей использовали инструменты Samtools и Ivar.

Для составления выборки последовательностей был проведен предварительный филогенетический анализ. Для построения первичных филогенетических деревьев с помощью алгоритма IQTree2 в режиме автоматического подбора параметров были использованы 657 изолятов субтипа H1N1 и 1908 изолятов субтипа H3N8 из базы данных GISAID EpiFLU. Далее выборки были сокращены до 50 последовательностей с помощью инструмента PARNAS. Сравнительный филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей проводили методом максимального правдоподобия (maximum likelihood) с использованием алгоритма RAxML [22] и модели нуклеотидных замен GTRGAMMA. Статистическую поддержку ветвей дерева определяли методом быстрого бутстрепа (rapid bootstrap) с 1000 репликаций. Филогенетическое дерево укореняли на среднюю точку (midpoint rooting). Реконструкцию предковых последовательностей проводили с использованием алгоритма RAxML [23]. Визуализацию и аннотацию филогенетических деревьев осуществляли с помощью инструментов Figtree и InkScape. Анализ замен в аминокислотных последо-

вательностях проводили с использованием программного обеспечения MEGA и SnapGene.

Результаты

Были проанализированы 84 пробы биологического материала методом ОТ-ПЦР для обнаружения РНК вируса гриппа А. Из них для полногеномного секвенирования были отобраны 46 перспективных образцов. По результатам сравнительного анализа полученных нуклеотидных последовательностей и филогенетического анализа исследованные образцы были идентифицированы как субтипы вируса гриппа А H1N1 (1 образец) и H3N8 (2 образца).

Как известно, геном вируса гриппа А кодирует 12 белков. Из них наибольший интерес для проведения сравнительного и филогенетического анализа представляют гены поверхностных антигенов гемагглютинина и нейраминидазы, а также неструктурного белка NS1, ответственного за ингибирование интерферона и характеризующегося значительным разнообразием среди штаммов гриппа птиц [24].

H1N1 – это субтип вируса гриппа А, который является одним из наиболее распространенных в мире и который был причиной пандемий 1918, 1977 и 2009 гг. [25].

Филогенетическое окружение генома H1N1 по гену, кодирующему гемагглютинин, выявленного в результате секвенирования (рис. 1), состоит из двух географических групп: азиатской и европейской, причем в европейской можно выделить две подгруппы – это европейская часть России (Московская область), страны Европы (Бельгия, Нидерланды) и азиатская часть России (Новосибирская область), страны Азии (Корея, Китай, Бангладеш, Монголия). В результате филогенетического анализа гена гемагглютинина исследованной последовательности H1N1 была выявлена близкородственная связь с генами гемагглютинина вирусов, обнаруженных у уток на территориях Бельгии и азиатской части России, уровень подобия составил 97–98%. При этом наиболее близкородственными оказались штаммы, циркулировавшие в основном в период 2018–2023 гг. у диких водоплавающих птиц (рис. 1). В целом нуклеотидная последовательность гена гемагглютинина исследуемого образца является характерной для птичьих изолятов Восточного полушария.

На филогенетическом дереве гена нейраминидазы (рис. 2) выявленный штамм H1N1 имеет положение на дереве, близкое к изолятам, циркулировавшим на территориях таких стран, как Бельгия, Нидерланды, европейская часть России (Московская область), в период 2016–2023 гг., а также на территориях Бельгии, Южной Кореи и Новосибирской области с 2019 по 2023 г. Причем наиболее близкими (рис. 2) оказались A/Anas platyrhynchos/Belgium/00358_0006/2023 и A/mallard/Novosibirsk_region/3445k/2020 с различием в 3–4% относительно исследуемого изолята H1N1.

Вирус гриппа А субтипа H3N8 относится к субтипам, наиболее часто встречающимся у птиц. Межвидовая передача субтипа H3N8 была зарегистри-

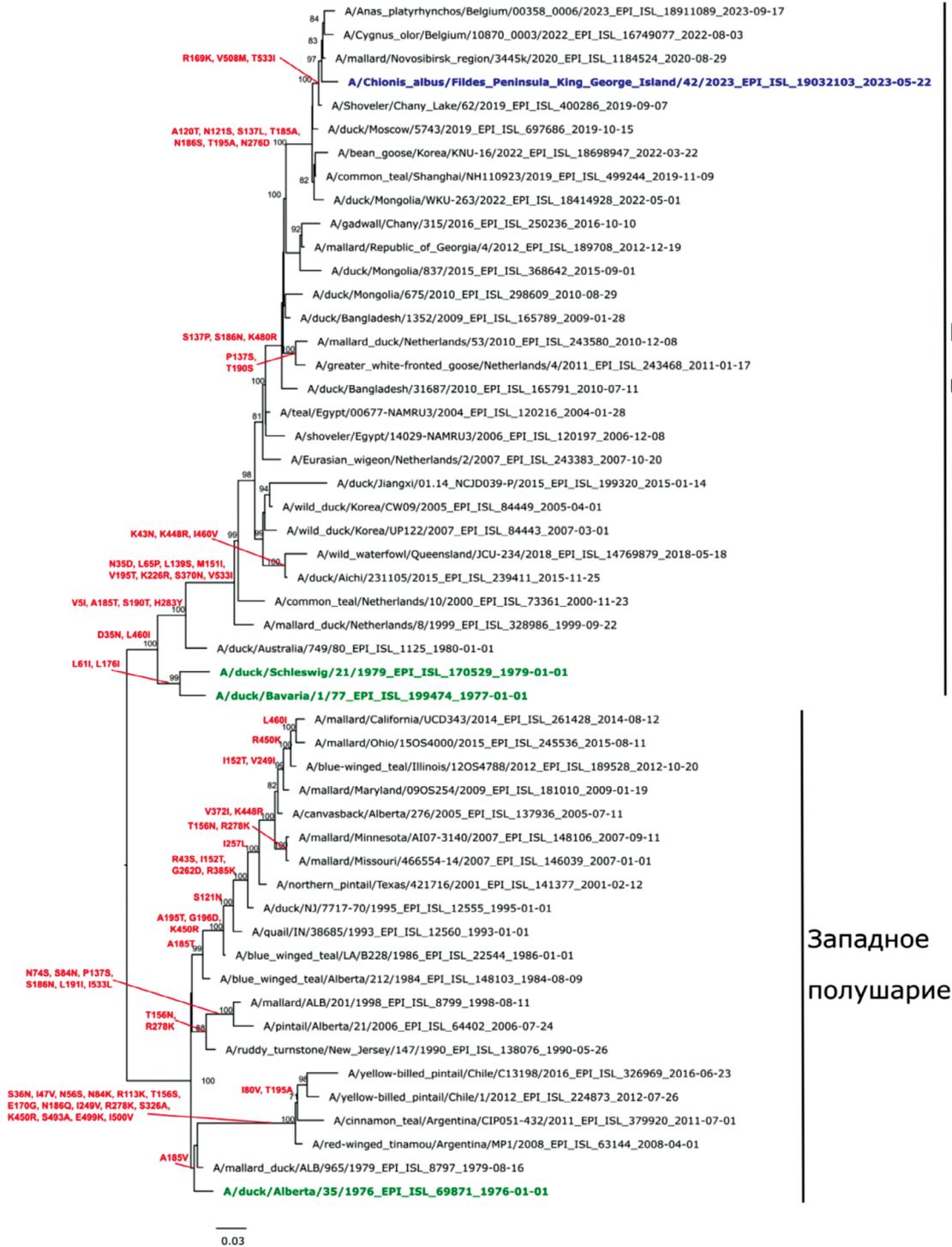


Рис. 1. Филогенетическое дерево по гену гемагглютинаина для изолятов вируса гриппа А субтипа H1N1.

Здесь и на рис. 2–5: филогенетическое дерево построено с помощью алгоритма RAxML методом максимального правдоподобия (ML) с использованием модели нуклеотидных замен GTRGAMMA. Статистическую поддержку ветвей дерева определяли методом быстрого бутстрэпа (rapid bootstrap) с 1000 репликаций. Значения поддержки ниже 70 не показаны. Филогенетическое дерево укоренено на среднюю точку (midpoint rooting). Реконструкцию предковых последовательностей проводили с использованием алгоритма RAxML. Синим цветом на деревьях указаны последовательности образцов, секвенированные в ходе данного исследования. Зеленым цветом выделены старейшие штаммы для генетических групп по гемагглютинуину. Красным цветом над узлами дерева обозначены замены в соответствующих реконструированных аминокислотных последовательностях.

Fig. 1. Phylogenetic tree for the hemagglutinin gene for influenza A virus subtype H1N1 isolates.

Here and in Fig. 2–5: The phylogenetic tree was constructed by the RAxML algorithm using the maximum likelihood (ML) method and the GTRGAMMA nucleotide substitution model. Statistical support for tree branches was determined by the rapid bootstrap method with 1000 replications. Support values below 70 are not shown. The phylogenetic tree is midpoint rooted. Ancestral sequences were reconstructed using the RAxML algorithm. Blue color on the trees indicates the sequences from this study. The oldest strains for genetic groups by hemagglutinin are shown in green. Substitutions in the corresponding reconstructed amino acid sequences are shown in red above the tree nodes.



Рис. 2. Филогенетическое дерево по гену нейраминидазы для изолятов вируса гриппа А субтипа H1N1.

Fig. 2. Phylogenetic tree for the neuraminidase gene for influenza A virus subtype H1N1 isolates.

рована у разных видов млекопитающих, причем у собак и лошадей она носила эндемический характер. На текущий момент зарегистрировано 3 случая инфицирования человека вирусом птичьего гриппа А субтипа H3N8; все случаи были зарегистрированы в Китае в период 2022–2023 гг., заражение, предположительно, произошло в результате прямого или косвенного контакта с инфицированной домашней птицей [26].

Филогенетически выявленные изоляты субтипа H3N8 (EPI_ISL_19174530 и EPI_ISL_19174467) по гену, кодирующему гемагглютинин, имеют обособленное положение относительно друг друга. Возмож-

но, это связано с их независимой эволюцией в районе распространения. В целом филогенетическое окружение для изолята H3N8 (EPI_ISL_19174530) представлено штаммами, циркулировавшими в период 2018–2023 гг. в Азии (рис. 3). Наиболее близкими на дереве по гену гемагглютинина являлись изоляты, полученные из Китая и Бангладеш в период 2019–2023 гг. (рис. 3).

Филогенетическое окружение изолята H3N8 (EPI_ISL_19174467) также состоит из азиатских (Китай, Казахстан, Монголия, Бангладеш) и европейских штаммов (Польша, Бельгия, Германия, Австрия) по гену гемагглютинина. Наиболее близкими изолята-

ми являлись штаммы, которые циркулировали на территории азиатской части России в период 2018–2021 гг. у диких водоплавающих птиц (рис. 3).

Гомология секвенированного изолята *A/Pygoscelis papua/Fildes Peninsula, King George Island/31/2023* (H3N8) по гену нейраминидазы со-

ставляла от 96–97% относительно изолятов от диких водоплавающих птиц азиатской части России *A/common teal/Novosibirsk region/3556k/2020* (H3N8), Монголии *A/duck/Mongolia/WKU-42/2022* (H3N8) и европейских штаммов, таких как: *A/duck/Chernogolovka/5897/2021*(H3N8), *A/Anas platyrhynchos/*

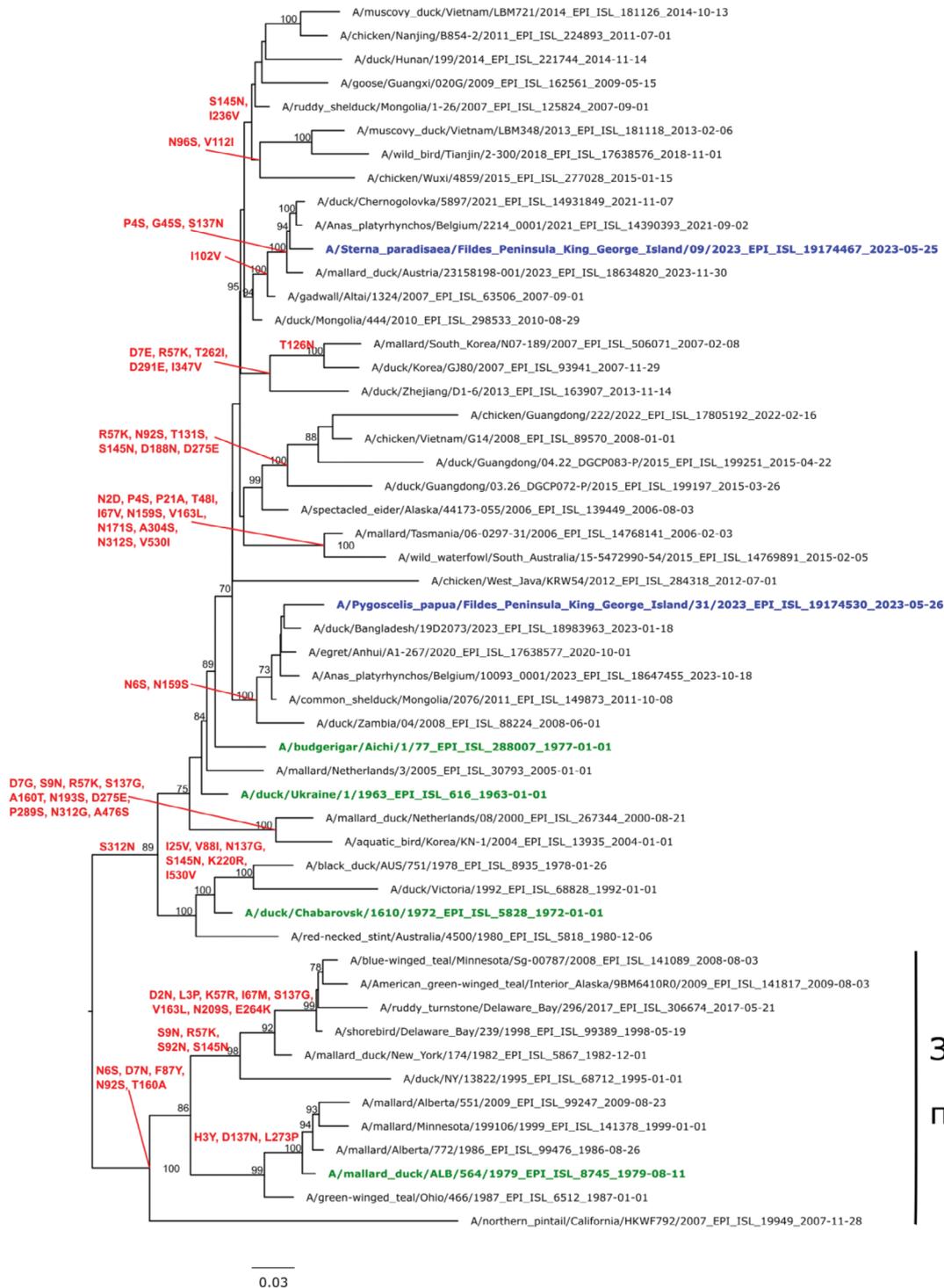


Рис. 3. Филогенетическое дерево по гену гемагглютинаина для изолятов вируса гриппа А субтипа H3N8.

Fig. 3. Phylogenetic tree for the hemagglutinin gene for influenza A virus subtype H3N8 isolates.

Belgium/2987_0001/2021(H3N8), A/mallard/Germany-BB/2023A107658/2023(H3N8). Максимальное различие наблюдалось между исследуемым изолятом и штаммом A/duck/Bangladesh/19D2073/2023 (H3N8) (рис. 4).

В результате исследования обнаружено, что по гену нейраминидазы изолят A/Sterna paradisaea/Fildes Peninsula, King George Island/09/2023 (H3N8) наиболее филогенетически близок к азиатским изолятам A/mallard/Novosibirsk region/3314k/2020 (H3N8) и A/duck/Mongolia/29/2011 (H3N8). Значительное различие (5%) было зарегистрировано между нуклеотидными последовательностями исследуемого изолята и штамма A/wild duck/Germany-NW/2023A107895/2023 (H3N8) (рис. 4). В целом филогения исследуемых изолятов из Антарктики имеет примерно схожую тенденцию относительно представленных генов – это вклад как европейских, так и азиатских штаммов в реассортацию, причем все географические точки объединены территориальной близостью друг к другу, как, например, Нидерланды, Бельгия и Германия. Также результаты анализа показали, что исследуемые изоляты имеют достаточно большую генетическую дистанцию относительно штаммов, циркулирующих в Северной Америке.

Восьмой сегмент РНК вируса гриппа А состоит из 890 нуклеотидов и кодирует 2 неструктурных белка – NS1 и NS2. В 1980 г. С. Scholtissek и V. Von Hoyningen-Huene [27] определили, что вирусы гриппа А можно разделить на 2 группы (группа 1 и более разнородная группа 2) относительно гомологии последовательности оснований их неструктурных генов (NS). Внутри данной группы гомология составляет от 94 до 100% или 75 и 100% соответственно, тогда как между двумя группами она находится в диапазоне всего 40%. В настоящее время принято определять эти группы как аллель А и аллель В, причем ассоциировать аллель В исключительно с вирусом, циркулирующим только среди птиц, а аллель А – с вирусами, имеющими предрасположенность к циркуляции среди млекопитающих. Также ген NS большинства высокопатогенных вирусов птичьего гриппа H5N1, выделенных у человека с 1997 г., связан с аллелью А [28].

Образцы субтипа H3N8, выявленные в настоящем исследовании, относятся к евразийской генетической линии, по гену NS к аллели В. Причем при сравнении нуклеотидных последовательностей исследуемых изолятов со штаммом A/Goose/Guangdong/1/1996 уровень гомологии составил 92–93%, а со штаммом A/Mallard/Sweden/2724/2006 – 67% соответственно. Результаты филогенетического анализа по гену NS изолята A/Pygoscelis papua/Fildes Peninsula, King George Island/31/2023 (H3N8) и изолята A/Sterna paradisaea/Fildes Peninsula, King George Island/09/2023 (H3N8) показали их значительное родство (рис. 5). Филогенетическое окружение представлено в основном образцами, выявленными на территориях Бельгии, Нидерландов и европейской части России. Максимальный процент гомологии наблюдался между представленными изолятами и штаммом A/Anas platyrhynchos/

Belgium/2214_0001/2021 (H3N8). Наибольшее различие по гену NS было относительно штамма A/aquatic bird/Korea/KN-1/2004 (H3N8).

Генетический анализ гена NS исследуемого образца субтипа H1N1 показывает его соответствие евразийской линии, аллели А. При сравнении с образцом A/Mallard/Sweden/2724/2006 процент гомологии по нуклеотидным последовательностям составил 87%. Относительно A/Goose/Guangdong/1/1996 уровень гомологии составил 69%. Филогенетическое окружение представлено образцами из Кореи, Бангладеш, Китая, Монголии и азиатской части РФ. Наиболее близким (98% подобие) по гену NS к исследуемому образцу был A/Bean goose/Korea/KNU-16/2022.

Наибольшую генетическую дистанцию относительно выявленного изолята имели образцы из Аргентины, Австралии и США. Результаты филогенетического анализа по гену NS позволяют предположить, что штаммы вируса гриппа генетически довольно разнообразны и содержат свои уникальные нуклеотидные последовательности, что вероятнее всего связано с функцией этого гена в геноме как антагониста интерферона (рис. 5).

Обсуждение

Таким образом, результаты настоящего исследования продемонстрировали, что выявленные изоляты возникли, вероятнее всего, в результате реассортации между европейскими (Бельгия, Нидерланды, Россия) и азиатскими (Монголия, Китай, Бангладеш) штаммами. Значительный вклад в формирование реассортантов был обусловлен циркулирующими в период 2018–2023 гг., на территории азиатской части России у диких водоплавающих птиц изолятами гриппа А, это может косвенно свидетельствовать о множественных заносах различных субтипов патогена с территории азиатской части России на территорию Антарктики, причем генотипов, циркулирующих на текущий момент времени в Европе и Азии в популяциях диких птиц.

Как известно, для успешной межвидовой трансмиссии необходимо изменение свойств гемагглютинина вирусов гриппа птиц. Показано, что эти изменения связаны с аминокислотными заменами в рецептор-связывающем сайте гемагглютинина [29].

У гемагглютинина H1 вируса гриппа, как свидетельствуют данные литературы, были обнаружены следующие аминокислотные замены, связанные с межвидовой передачей вируса: S138A, E190D и G225D. Для гемагглютинина H3 межвидовая передача была связана с мутациями Q226L и G228S [30].

В этой связи нами был проведен анализ аминокислотных последовательностей на наличие таковых мутаций у идентифицированного изолята H1N1. В результате проведенного анализа были выявлены аминокислотные замены S138Y и E190T, в то же время отсутствовали изменения в положении 225, соответствующему глицину.

Для изолята A/Pygoscelis papua/Fildes Peninsula, King George Island/31/2023 (H3N8) были выявлены аминокислотные замены: пролин в положении 226, Q226P и тирозин в 228 (G228T). Соот-

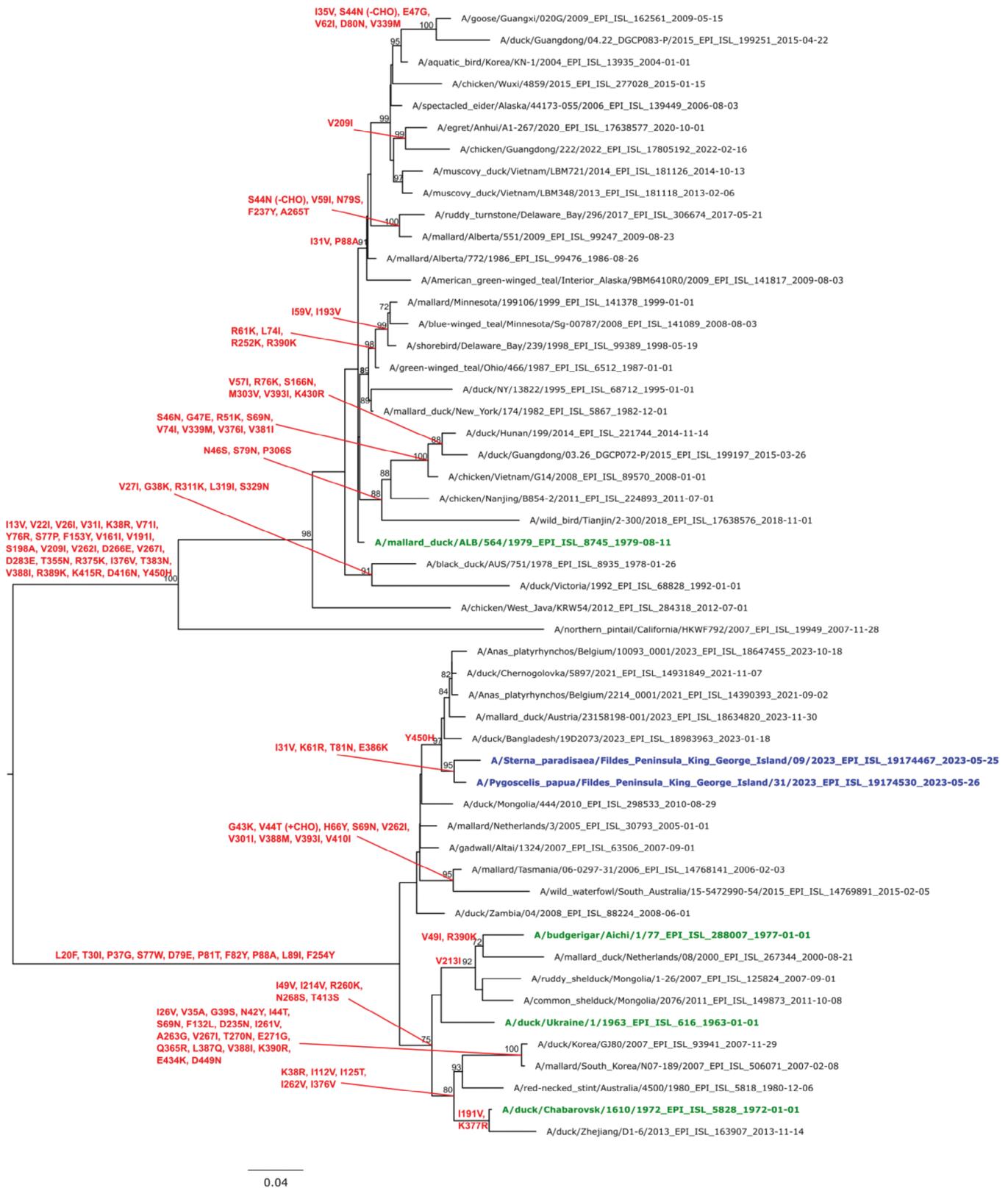


Рис. 4. Филогенетическое дерево по гену нейраминидазы для изолятов вируса гриппа А субтипа H3N8.
 Fig. 4. Phylogenetic tree for the neuraminidase gene for influenza A virus subtype H3N8 isolates.

ответственно для изолята A/Sterna paradisaea/Fildes Peninsula, King George Island/09/2023 (H3N8): пролин в положении 226, Q226P и гистидин в 228, G228H.

Таким образом, можно сделать вывод о накоплении в геномах антарктических изолятов несинонимичных мутаций, однако влияние соответствующих им аминокислотных замен на биологические свойства вирусов в настоящее время остается неизученным.

В целом эволюция вирусов гриппа имеет сложный и динамичный характер, ввиду особенностей организации генома и активной циркуляции среди большого числа диких водоплавающих птиц. Геномное многообразие вирусов зоонозного гриппа, которые уже вызывали случаи инфицирования человека, требует укрепления надзора за вирусами гриппа как среди людей, так и в дикой природе.

Экосистемы прибрежной Антарктики являются важнейшей географической локацией с точки зрения организации систематических мониторинговых исследований. Следует отметить что отдельные виды антарктических птиц способны к межконтинентальным миграциям (например, полярные крачки ежегодно мигрируют из Антарктики в российскую Арктику). Данное обстоятельство актуализирует вопрос о роли дальнеперелетных мигрантов в качестве векторов переноса зоонозных инфекций, включая грипп А.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о циркуляции на территории Антарктики вирусов гриппа А субтипов H1N1 и H3N8, с уникальными геномными характеристиками, что, в частности, проявляется спектром мутаций, ассоциированных с их потенциальной межвидовой передачей. Природная среда Антарктики, несмотря на экстремальные климатические условия, способна формировать возможные зоны образования и эволюции вирусов, в частности гриппа А. По нашему мнению, изучение генетического разнообразия циркулирующих в полярных регионах Земли вирусов гриппа А и выявление присущих им условий возникновения новых генетических вариантов и видов вирусов имеет важное теоретическое значение с научной точки зрения и является, безусловно, актуальной задачей для разработки мер по предотвращению биологических угроз.

ЛИТЕРАТУРА

- Bouvier N.M., Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine*. 2008; 26(Suppl. 4): D49–53. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.039>
- Fries A.C., Nolting J.M., Bowman A.S., Lin X., Halpin R.A., Wester E., et al. Spread and persistence of influenza A viruses in waterfowl hosts in the North American Mississippi migratory flyway. *J. Virol.* 2015; 89(10): 5371–81. <https://doi.org/10.1128/JVI.03249-14>
- Lvov D.K., Zhdanov V.M. Circulation of influenza virus genes in the biosphere. In: Zhdanov V.M., ed. *Soviet Medical Reviews. Section E: Virology Reviews. Volume 1*. Harwood Academic Publ. GmbH; 1984: 129–52.
- Lvov D.K. Circulation of Influenza Virus in Natural Biocenosis. In: Kurstak E., Maramorosh K., eds. *Viruses and Environment*. Academic Press; 1978: 351–80.
- Lvov D.K. Influenza A virus – a sum of populations with a common protected gene pool. In: Zhdanov V.M., ed. *Soviet Medical Reviews. Section E: Virology Reviews. Volume 2*. Harwood Academic Publ. GmbH; 1984: 15–37.
- Lvov D.K., Kaverin N.V. Avian influenza in Northern Eurasia. In: Klenk H.D., Matrosovich M.N., eds. *Avian Influenza. Volume 27*. Basel: Karger; 2008: 41–58.
- Львов Д.К., Ильичев В.Д., ред. *Миграция птиц и перенос возбудителей инфекции*. М.: Наука; 1979.
- Walker P.J., Siddell S.G., Lefkowitz E.J., Mushegian A.R., Adriaenssens E.M., Alfenas-Zerbini P., et al. Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* 2022; 167(11): 2429–40. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05516-5>
- Gass J.D. Jr., Dusek R.J., Hall J.S., Hallgrímsson G.T., Halldórsson H.P., Vignisson S.R., et al. Global dissemination of influenza A virus is driven by wild bird migration through arctic and subarctic zones. *Mol. Ecol.* 2023; 32(1): 198–213. <https://doi.org/10.1111/mec.16738>
- Wille M., Holmes E.C. The ecology and evolution of influenza viruses. *Cold. Spring Harb. Perspect. Med.* 2020; 10(7): a038489. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038489>
- Cowling B.J., Ip D.K., Fang V.J., Suntarattiwong P., Olsen S.J., Levy J., et al. Aerosol transmission is an important mode of influenza A virus spread. *Nat. Commun.* 2013; 4: 1935. <https://doi.org/10.1038/ncomms2922>
- Barratclough A., Ferguson S.H., Lydersen C., Thomas P.O., Kovacs K.M. A review of circumpolar arctic marine mammal health – a call to action in a time of rapid environmental change. *Pathogens*. 2023; 12(7): 937. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070937>
- Львов Д.К. Экология вирусов. В кн.: Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013: 66–86.
- Lvov D.K., Zdanov V.M., Sazonov A.A., Braude N.A., Vladimirtseva E.A., Agafonova L.V., et al. Comparison of influenza viruses isolated from man and from whales. *Bull World Health Organ.* 1978; 56(6): 923–30.
- Nielsen O., Clavijo A., Boughen J.A. Serologic evidence of influenza A infection in marine mammals of Arctic Canada. *J. Wildl. Dis.* 2001; 37(4): 820–25. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-37.4.820>
- Celis J.E., Espejo W., Barra R., Gonzalez-Acuña D., Gonzalez F., Jara S. Assessment of trace metals in droppings of Adélie penguins (*Pygoscelis Adeliae*) from different locations of the Antarctic peninsula area. *Adv. Polar Sci.* 2015; 26(1): 1–7. <https://doi.org/10.13679/j.advps.2015.1.00001>
- Hahn S., Peter H.U., Quillfeldt P., Reinhardt K. The birds of the Potter Peninsula, King George Island, South Shetland Islands, Antarctica, 1965–1998. *Marine Ornithology*. 1998; 26: 1–6.
- Wille M., Aban M., Wang J., Moore N., Shan S., Marshall J., et al. Antarctic penguins as reservoirs of diversity for avian avulviruses. *J. Virol.* 2019; 93(11): e00271–19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00271-19>
- Siniff D.B., Garrott R.A., Rotella J.J., Fraser W.R., Ainley D.G. Opinion: Projecting the effects of environmental change on Antarctic seals. *Antarct. Sci.* 2008; 20(5): 425–35. doi:10.1017/S0954102008001351
- Shao W., Li X., Goraya M.U., Wang S., Chen J.L. Evolution of influenza A virus by mutation and re-assortment. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(8): 1650. <https://doi.org/10.3390/ijms18081650>
- Thorsson E., Zohari S., Roos A., Banihashem F., Bröjer C., Neimanis A. Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus in a Harbor porpoise, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.* 2023; 29(4): 852–5. <https://doi.org/10.3201/eid2904.221426>
- Markin A., Wagle S., Grover S., Vincent Baker A.L., Eulenstein O., Anderson T.K. PARNAS: objectively selecting the most representative taxa on a phylogeny. *Syst. Biol.* 2023; 72(5): 1052–63. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syad028>
- Stamatakis A. RAXML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 2014; 30(9): 1312–3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Short K.R., Richard M., Verhagen J.H., van Riel D., Schrauwen E.J., van den Brand J.M., et al. One health, multiple challenges: The inter-species transmission of influenza A virus. *One Health*. 2015; 1: 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2015.03.001>
- Al Hajjar S., McIntosh K. The first influenza pandemic of the 21st century. *Ann. Saudi Med.* 2010; 30(1): 1–10. <https://doi.org/10.4103/0256-4947.59365>
- Yu J., Yao Q., Liu J., Zhou Y., Huo M., Ge Y. Concern regarding H3-subtype avian influenza virus. *Front. Microbiol.* 2023; 14: 1327470. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1327470>
- Scholtissek C., von Hoyningen-Huene V. Genetic relatedness of the gene which codes for the nonstructural (NS) protein of different influenza A strains. *Virology*. 1980; 102(1): 13–20. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(80\)90065-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(80)90065-3)
- Jahangir A., Ruenphet S., Sultana N., Shoham D., Takehara K. Genetic analysis of avian influenza viruses: cocirculation of avian in-

- influenza viruses with allele A and B nonstructural gene in Northern Pintail (*Anas acuta*) ducks wintering in Japan. *Influenza Res. Treat.* 2012; 2012: 847505. <https://doi.org/10.1155/2012/847505>
29. Herfst S., Zhang J., Richard M., McBride R., Lexmond P., Bestebroer T.M., et al. Hemagglutinin traits determine transmission of avian A/H10N7 influenza virus between mammals. *Cell Host Microbe.* 2020; 28(4): 602–13.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.08.011>
 30. Shi Y., Wu Y., Zhang W., Qi J., Gao G.F. Enabling the 'host jump': structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 2014; 12(12): 822–31. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3362>

REFERENCES

1. Bouvier N.M., Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine.* 2008; 26(Suppl. 4): D49–53. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.039>
2. Fries A.C., Nolting J.M., Bowman A.S., Lin X., Halpin R.A., West-er E., et al. Spread and persistence of influenza A viruses in water-fowl hosts in the North American Mississippi migratory flyway. *J. Virol.* 2015; 89(10): 5371–81. <https://doi.org/10.1128/JVI.03249-14>
3. Lvov D.K., Zhdanov V.M. Circulation of influenza virus genes in the biosphere. In: Zhdanov V.M., ed. *Soviet Medical Reviews. Section E: Virology Reviews. Volume 1.* Harwood Academic Publ. GmbH; 1984: 129–52.
4. Lvov D.K. Circulation of Influenza Virus in Natural Biocenosis. In: Kurstak E., Maramorosh K., eds. *Viruses and Environment.* Academic Press; 1978: 351–80.
5. Lvov D.K. Influenza A virus – a sum of populations with a common protected gene pool. In: Zhdanov V.M., ed. *Soviet Medical Reviews. Section E: Virology Reviews. Volume 2.* Harwood Academic Publ. GmbH; 1984: 15–37.
6. Lvov D.K., Kaverin N.V. Avian influenza in Northern Eurasia. In: Klenk H.D., Matrosovich M.N., eds. *Avian Influenza. Volume 27.* Basel: Karger; 2008: 41–58.
7. Lvov D.K., Ilyichev V.D., ed. *Bird Migration and Transmission of Infectious Agents [Migratsiya ptits i perenos vozбудitelei infektsii].* Moscow: Nauka; 1979. (in Russian)
8. Walker P.J., Siddell S.G., Lefkowitz E.J., Mushegian A.R., Adriaenssens E.M., Alfenas-Zerbini P., et al. Recent changes to virus taxonomy ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Arch. Virol.* 2022; 167(11): 2429–40. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05516-5>
9. Gass J.D. Jr., Dusek R.J., Hall J.S., Hallgrímsson G.T., Halldórsson H.P., Vignisson S.R., et al. Global dissemination of influenza A virus is driven by wild bird migration through arctic and subarctic zones. *Mol. Ecol.* 2023; 32(1): 198–213. <https://doi.org/10.1111/mec.16738>
10. Wille M., Holmes E.C. The ecology and evolution of influenza viruses. *Cold. Spring Harb. Perspect. Med.* 2020; 10(7): a038489. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038489>
11. Cowling B.J., Ip D.K., Fang V.J., Suntarattiwong P., Olsen S.J., Levy J., et al. Aerosol transmission is an important mode of influenza A virus spread. *Nat. Commun.* 2013; 4: 1935. <https://doi.org/10.1038/ncomms2922>
12. Barratclough A., Ferguson S.H., Lydersen C., Thomas P.O., Kovacs K.M. A review of circumpolar arctic marine mammal health – a call to action in a time of rapid environmental change. *Pathogens.* 2023; 12(7): 937. <https://doi.org/10.3390/pathogens12070937>
13. Lvov D.K. Ecology of viruses. In: Lvov D.K., ed. *A Guide to Virology. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii. Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh].* Moscow: MIA; 2013: 66–86. (in Russian)
14. Lvov D.K., Zdanov V.M., Sazonov A.A., Braude N.A., Vladimirtseva E.A., Agafonova L.V., et al. Comparison of influenza viruses isolated from man and from whales. *Bull World Health Organ.* 1978; 56(6): 923–30.
15. Nielsen O., Clavijo A., Boughen J.A. Serologic evidence of influenza A infection in marine mammals of Arctic Canada. *J. Wildl. Dis.* 2001; 37(4): 820–25. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-37.4.820>
16. Celis J.E., Espejo W., Barra R., Gonzalez-Acuña D., Gonzalez F., Jara S. Assessment of trace metals in droppings of Adélie penguins (*Pygoscelis Adeliae*) from different locations of the Antarctic peninsula area. *Adv. Polar Sci.* 2015; 26(1): 1–7. <https://doi.org/10.13679/j.advps.2015.1.00001>
17. Hahn S., Peter H.U., Quillfeldt P., Reinhardt K. The birds of the Potter Peninsula, King George Island, South Shetland Islands, Antarctica, 1965-1998. *Marine Ornithology.* 1998; 26: 1–6.
18. Wille M., Aban M., Wang J., Moore N., Shan S., Marshall J., et al. Antarctic penguins as reservoirs of diversity for avian avulaviruses. *J. Virol.* 2019; 93(11): e00271-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00271-19>
19. Siniff D.B., Garrott R.A., Rotella J.J., Fraser W.R., Ainley D.G. Opinion: Projecting the effects of environmental change on Antarctic seals. *Antarct. Sci.* 2008; 20(5): 425–35. doi:10.1017/S0954102008001351
20. Shao W., Li X., Goraya M.U., Wang S., Chen J.L. Evolution of influenza A virus by mutation and re-assortment. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(8): 1650. <https://doi.org/10.3390/ijms18081650>
21. Thorsson E., Zohari S., Roos A., Banihashem F., Bröjer C., Neimanis A. Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus in a Harbor porpoise, Sweden. *Emerg. Infect. Dis.* 2023; 29(4): 852–5. <https://doi.org/10.3201/eid2904.221426>
22. Markin A., Wagle S., Grover S., Vincent Baker A.L., Anderson T.K. PARNAS: objectively selecting the most representative taxa on a phylogeny. *Syst. Biol.* 2023; 72(5): 1052–63. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syad028>
23. Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics.* 2014; 30(9): 1312–3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
24. Short K.R., Richard M., Verhagen J.H., van Riel D., Schrauwen E.J., van den Brand J.M., et al. One health, multiple challenges: The inter-species transmission of influenza A virus. *One Health.* 2015; 1: 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2015.03.001>
25. Al Hajjar S., McIntosh K. The first influenza pandemic of the 21st century. *Ann. Saudi Med.* 2010; 30(1): 1–10. <https://doi.org/10.4103/0256-4947.59365>
26. Yu J., Yao Q., Liu J., Zhou Y., Huo M., Ge Y. Concern regarding H3-subtype avian influenza virus. *Front. Microbiol.* 2023; 14: 1327470. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1327470>
27. Scholtissek C., von Hoyningen-Huene V. Genetic relatedness of the gene which codes for the nonstructural (NS) protein of different influenza A strains. *Virology.* 1980; 102(1): 13–20. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(80\)90065-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(80)90065-3)
28. Jahangir A., Ruenphet S., Sultana N., Shoham D., Takehara K. Genetic analysis of avian influenza viruses: cocirculation of avian influenza viruses with allele A and B nonstructural gene in Northern Pintail (*Anas acuta*) ducks wintering in Japan. *Influenza Res. Treat.* 2012; 2012: 847505. <https://doi.org/10.1155/2012/847505>
29. Herfst S., Zhang J., Richard M., McBride R., Lexmond P., Bestebroer T.M., et al. Hemagglutinin traits determine transmission of avian A/H10N7 influenza virus between mammals. *Cell Host Microbe.* 2020; 28(4): 602–13.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.08.011>
30. Shi Y., Wu Y., Zhang W., Qi J., Gao G.F. Enabling the 'host jump': structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 2014; 12(12): 822–31. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3362>

Информация об авторах:

Охлопкова Олеся Викторовна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной фармакологии отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия; старший научный сотрудник лаборатории геномики и эволюции вирусов НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ, Новосибирск, Россия. E-mail: ohlopkova.lesia@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8214-7828>

Гончаров Артемий Евгеньевич – д-р мед. наук, заведующий лабораторией функциональной геномики и протеомики микроорганизмов ФГБНУ ИЭМ, профессор кафедры эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: phage1@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5206-6656>

Асланов Батырбек Исмаилович – д-р мед. наук, профессор, заведующий кафедрой эпидемиологии, паразитологии и дезинфектологии СЗГМУ им. И.И. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: Baturbek.Aslanov@szgmu.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6890-8096>

Фадеев Артем Викторович – старший научный сотрудник лаборатории молекулярной вирусологии НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: artem.fadeev@influenza.spb.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3558-3261>

Давидюк Юрий Николаевич – канд. биол. наук, старший научный сотрудник Института фундаментальной медицины и биологии КФУ, Казань, Россия. E-mail: JNDavidjuk@kpfu.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4409-2942>

Мошкин Алексей Дмитриевич – младший научный сотрудник НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ, Новосибирск, Россия. E-mail: alex.moshkin727@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-1182-8247>

Столбунова Кристина Александровна – младший научный сотрудник НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ, Новосибирск, Россия. E-mail: kristina.sunwo@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3376-945x>

Степанюк Марина Алексеевна – младший научный сотрудник НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ, Новосибирск, Россия. E-mail: stepanunya1996@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0002-2658-7746>

Соболев Иван Андреевич – канд. биол. наук, заведующий лабораторией геномики и эволюции вирусов НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ, Новосибирск, Россия. E-mail: sobolev_i@centercem.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4561-6517>

Тюменцева Марина Алексеевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией геномного редактирования отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: tyumantseva@cmd.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3145-3702>

Тюменцев Александр Игоревич – канд. биол. наук, заведующий лабораторией экспериментальной фармакологии отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: tyumantsev@cmd.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0537-2586>

Шестопалов Александр Михайлович – д-р биол. наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, директор НИИ Вирусологии ФИЦ ФТМ, Новосибирск, Россия. E-mail: amshestopalov@frcftm.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9734-0620>

Акимкин Василий Геннадьевич – д-р мед. наук, академик РАН, профессор, заслуженный врач Российской Федерации, лауреат Премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники, директор ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: akinkin@pcr.ms; <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Участие авторов: Охлопкова О.В. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сборка нуклеотидных последовательностей и публикация в базе данных, филогенетический анализ и интерпретация данных, анализ аминокислотного профиля полученных геномов вирусов, подготовка рукописи; Гончаров А.Е., Асланов Б.И. – концепция и дизайн исследования, сбор биоматериала, определение видовой принадлежности птиц, подготовка рукописи; Фадеев А.В. – подготовка рукописи, рецензирование текста и полученных результатов, филогенетический анализ и построение филогенетических деревьев, методическая поддержка экспериментальной работы; Мошкин А.Д., Столбунова К.А., Степанюк М.А. – проведение экспериментов, оформление рукописи; Давидюк Ю.Н., Соболев И.А. – подготовка рукописи, рецензирование текста и полученных результатов, оформление текста; Тюменцева М.А., Тюменцев А.И., Шестопалов А.М., Акимкин В.Г. – администрирование, координация, финальное редактирование рукописи.

Поступила 17.07.2024

Принята в печать 26.08.2024

Опубликована 31.08.2024

Information about the authors:

Olesia V. Ohlopko – PhD in Biology, Senior Researcher of the Laboratory of Experimental Pharmacology, Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia; Research Institute of Virology, FRC FTM, Novosibirsk, Russia. E-mail: ohlopko.lesia@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8214-7828>

Artemy E. Goncharov – Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Functional Genomics and Proteomics of Microorganisms, Federal State Budgetary Scientific Institution IEM, Professor of the Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfection, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia. E-mail: phage1@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5206-6656>

Batyrbek I. Aslanov – Doctor of Medical Sciences, Professor, and Head of the Department of Epidemiology, Parasitology and Disinfectology, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St. Petersburg, Russia. E-mail: Batyrbek.Aslanov@szgmu.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6890-8096>

Artem V. Fadeev – Senior Researcher, Laboratory of Molecular Virology, A.A. Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russia. E-mail: artem.fadeev@influenza.spb.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3558-3261>

Yuri N. Davidyuk – PhD in Biology, Senior Researcher at the Institute of Fundamental Medicine and Biology, KPFU, Kazan, Russia. E-mail: JNDavidyuk@kpfu.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4409-2942>

Alexey D. Moshkin – researcher at the Research Institute of Virology, FRC FTM, Novosibirsk, Russia. E-mail: alex.moshkin727@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-1182-8247>

Kristina A. Stolbunova – researcher, Research Institute of Virology, FRC FTM, Novosibirsk, Russia. E-mail: kristina.sunwo@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3376-945x>

Marina A. Stepanyuk – researcher, Research Institute of Virology, FRC FTM, Novosibirsk, Russia. E-mail: stepanunya1996@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0002-2658-7746>

Ivan A. Sobolev – PhD in Biology, Head of the Laboratory of Genomics and Evolution of Viruses, Research Institute of Virology, FRC FTM, Novosibirsk, Russia. E-mail: sobolev_i@centercem.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4561-6517>

Marina A. Tyumentseva – PhD in Biology, Head of the Laboratory of Genomic Editing of the Department of Molecular Diagnostics and Epidemiology of the Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia. E-mail: tyumantseva@cmd.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3145-3702>

Alexander I. Tyumentsev – PhD in Biology, Head of the Laboratory of Experimental Pharmacology, Department of Molecular Diagnostics and Epidemiology, FBUN Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia. E-mail: tyumantsev@cmd.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0537-2586>

Alexander M. Shestopalov – Doctor of Biological Sciences, Professor, Honored Worker of Science of the Russian Federation, Director of the Research Institute of Virology FRC FTM, Novosibirsk, Russia. E-mail: amshestopalov@frcftm.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9734-0620>

Vasily G. Akimkin – Doctor of Medical Sciences, Academician of the Russian Academy of Sciences, Professor, Honored Doctor of the Russian Federation, Laureate of the Prize of the Government of the Russian Federation in the field of science and technology, Director of the Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia. E-mail: akinkin@pcr.ms; <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Contribution: Okhlopko O.V. – concept and design of the study, conducting the experiments, assembling the nucleotide sequences and publishing in the database, phylogenetic analysis and interpretation of the data, analysis of the amino acid profile of the obtained virus genomes, preparation of the manuscript; Goncharov A.E., Aslanov B.I. – concept and design of the study, collection of biomaterial, determination of the species affiliation of birds, preparation of the manuscript; Fadeev A.V. – preparation of the manuscript, reviewing the text and the results obtained, phylogenetic analysis and construction of phylogenetic trees, methodological support of the experimental work; Moshkin A.D., Stolbunova K.A., Stepanyuk M.A. – conducting the experiments, writing up the manuscript; Davidyuk Yu.N., Sobolev I.A. – preparation of the manuscript, reviewing the text and the results obtained, writing up the text; Tyumentseva M.A., Tyumentsev A.I., Shestopalov A.M., Akimkin V.G. – administration, coordination, final editing of the manuscript.

Received 17 July 2024

Accepted 26 August 2024

Published 31 August 2024

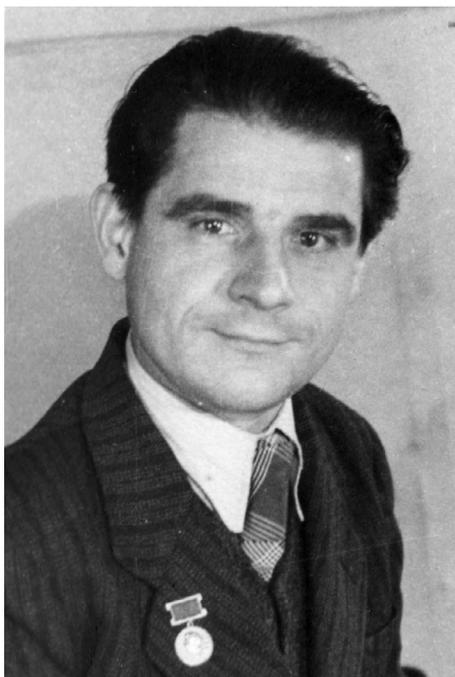
РЕЦЕНЗИИ



Отзыв на коллективную монографию
под редакцией академика РАН В.И. Злобина
«Клещевой энцефалит в XXI веке».

Review of the collective monograph edited
by Academician of the Russian Academy
of Sciences V.I. Zlobin
«Tick-borne encephalitis in the 21st century».

*Светлой памяти выдающегося
и бесстрашного российского ученого,
академика АМН СССР М.П. Чумакова посвящая*



Академик АМН СССР М.П. Чумаков (1909–1993 гг.), 1941 г.,
фото из личного архива П.М. Чумакова

В феврале 2021 года издательством «Наука» выпущена в свет коллективная монография обзорных научных статей под названием «Клещевой энцефалит в XXI веке». Формирование тем сборника, состава авторов и общую редакцию сборника выполнил академик РАН, профессор, д.м.н. В.И. Злобин, который является одним из ведущих специалистов по данной проблеме в России и принадлежит к плеяде основоположников российской научной школы в изучении фундаментальной вирусологии, круга хозяев вируса, природной очаговости, эпидемиологии и мер борьбы с данной опасной инфекцией. Его компетенция предопределила высокий научный уровень, квалифици-

рованный подбор авторов и актуальный спектр тем вышедшего коллективного труда.

Несмотря на достигнутые за последние десятилетия успехи в изучении молекулярных основ репликации представителей рода флавивирусов (семейство *Flaviviridae*), к которому относится вирус клещевого энцефалита, и понимания процесса их распространения в биосфере, данная вирусная инфекция сохраняет высокую медицинскую актуальность для многих стран мира, включая Россию. Ежегодно в России детектируются новые разновидности патогенных вариантов вируса и регистрируется около 2000 случаев заболевания вирусным клещевым энцефалитом среди людей, существует опасность инфицирования домашних, сельскохозяйственных и диких животных и алиментарного пути передачи вируса от животных к человеку. В России за помощью от укусов клещей ежегодно обращается 300–500 тыс. человек. Актуальность темы обусловлена также неизбежным и глобальным обстоятельством потепления климата на нашей планете и связанным с этим явлением изменением экологии многих биологических видов, включая вирус клещевого энцефалита, и значительным смещением миграционных потоков переносчиков вирусов природно-очаговых болезней, что таит угрозу вовлечения новых регионов в эпидемический процесс, формирования новых межвидовых связей, появления новых опасных разновидностей вирусов и вирусных очагов и возникновения обширных вспышек болезней.

Опубликованный научный коллективный труд имеет логичное построение, в котором гармонично объединено рассмотрение систематики семейства флавивирусов (семейство *Flaviviridae*; род *Flavivirus*), молекулярных основ репликации флавивирусов, включая анализ многоступенчатого каскадного протеолиза вирусного полипротеина клеточными и вирусными протеазами, архитектуры антигенных доменов в белках вируса, структуры вирусного генома и его вариативности с описанием нового уникального вида флавивиру-



М.П. Чумаков (1937 г.) – в поисках неизведанного вируса. У истоков отечественной вирусологической науки.
Фото из личного архива П.М. Чумакова

сов с сегментированной структурой генома. Ряд глав посвящен общим вопросам взаимодействия вируса с организмом-переносчиком и конечным хозяином животного, включая человека, изучению ареала вируса клещевого энцефалита и появления новых вирусных видов флавивирусов и спектра их переносчиков, формирования природных очагов инфекции в различных ландшафтно-климатических поясах, обобщению современных знаний об эволюции, патогенности и экологии вирусов, рассмотрению исследований по прикладным направлениям разработки современных вакцин, средств специфической профилактики и лечения, созданию новых химиопрепаратов и ряду других актуальных тем. Вышедшая книга знакомит читателя с современными исследованиями по изучению основ патогенеза и клинического течения болезни у пациентов разных возрастных групп и при микст-формах вирусного клещевого энцефалита с другими видами инфекций, такими как боррелии, эрлихии, анаплазмы, риккетсии, также переносимыми клещами и насекомыми.

Достоинством книги служит исторический очерк, посвященный российским ученым, внесшим огромный вклад в открытие и изучение вируса клещевого энцефалита и разработку средств борьбы с данным весьма грозным заболеванием. История раскрытия причин и идентификации природы данной болезни послужили ведущим импульсом развития и формирования отечественной школы вирусологов. Важным представляется и то, что исторический раздел и основу книги сформировал академик РАН, проф. В.И. Злобин, обладающий обширными вирусологи-

ческими и клиническими знаниями и всесторонней научной эрудицией, являющийся участником и очевидцем многих реальных событий, которые легли в основу исторической части книги. Среди наиболее ярких представителей российской вирусологической школы, причастных к изучению проблемы вирусных клещевых энцефалитов, можно отметить такие имена корифеев отечественной и мировой вирусологии, как М.П. Чумаков, А.А. Смородинцев, Е.Н. Левкович, А.К. Шубладзе, В.Д. Соловьев, В.В. Погодина, А.Н. Павловский, Л.А. Зильбер, С.П. Карпов, В.А. Лашкевич, Д.К. Львов, автор настоящей коллективной монографии В.И. Злобин, и многих других отечественных ученых. Для читателей будет интересным познакомиться как с научным содержанием книги, так и с фактами из личной и научной жизни больших российских ученых. Этот аспект книги имеет особое и важное значение для молодых современников и будущих поколений российских ученых, поскольку раскрывает истинный подвиг исследователей, рискующих своим здоровьем, а подчас и жизнью, для получения новых знаний и их применения в борьбе с опасными инфекционными угрозами во имя благополучия нашей Родины.

Несомненно, вышедшую в свет книгу следует рекомендовать для включения в программу медико-биологических классов общеобразовательной школы, средних и высших учебных заведений биологического и медицинского профиля.

Член-корреспондент РАН, профессор О.П. Журнов

НЕКРОЛОГ



Колобухина Людмила Васильевна (20.07.1951–09.08.2024)



9 августа 2024 г. на 74-м году жизни скончалась член редакционной коллегии журнала «Вопросы вирусологии», руководитель отдела вирусных гепатитов и клинической вирусологии НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, лауреат Государственной премии РФ, главный научный сотрудник, врач высшей квалификационной категории по специальности «инфекционные болезни», доктор медицинских наук, профессор Людмила Васильевна Колобухина.

Л.В. Колобухина окончила Волгоградский государственный медицинский институт в 1974 г. В НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского работала с 1983 г. после окончания клинической ординатуры.

В 1995 г. защитила диссертацию на соискание ученой степени доктора медицинских наук на тему «Заболевания, вызванные вирусами серогруппы Калифорнийского энцефалита (клиника, диагностика, исходы)» по специальности «инфекционные болезни».

С 1991 г. – заведующая лабораторией респираторных вирусных инфекций с апробацией лекарственных средств; с 2008 г. – руководитель отдела вирусных гепатитов и клинической вирусологии НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского.

В 2000 г. Л.В. Колобухиной было присвоено звание лауреата Государственной премии РФ в области науки и техники. В 2004 г. президиум Российской академии медицинских наук наградил Л.В. Колобухину дипломом Премии им. Д.И. Ивановского за лучшую научную работу по вирусологии за цикл работ «Результаты вирусологических исследований по проблеме новых и возвращающихся инфекций на примере арбовирусных инфекций».

Исследования Л.В. Колобухиной внесли большой вклад в проблему изучения эпидемиологии, клиники и диагностики новых арбовирусных заболеваний на территории Российской Федерации. Ею были разработаны классификация и алгоритм диагностики заболеваний, вызванных вирусами Калифорнийского энцефалита. Научные исследования Л.В. Колобухиной включали апробацию новых противовирусных препаратов при гриппе и других ОРВИ. В течение многих лет она проводила госпитальный мониторинг гриппа, с 2018 по 2019 г. неоднократно выезжала в Республику Гвинея в качестве монитора международного клинического исследования по безопасности и иммуногенности вакцины против лихорадки Эбола.

Л.В. Колобухина – автор более 250 научных работ.

За успешную работу Л.В. Колобухина награждена знаком «Отличник здравоохранения», почетными грамотами Правительства Москвы и Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Людмилу Васильевну отличали высокий профессионализм, истинная человечность, внутренняя интеллигентность и жизнелюбие. Она пользовалась большим авторитетом и неизменным уважением среди сотрудников и пациентов.

Научно-практическая деятельность Людмилы Васильевны Колобухиной на протяжении 41 года была связана с Институтом вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, НИЦМ им. Н.Ф. Гамалеи.

Для тех, кто работал долгие годы с Людмилой Васильевной, это невосполнимая и тяжелая утрата.

Светлая память о Людмиле Васильевне навсегда сохранится в наших сердцах!

*Сотрудники отдела вирусных гепатитов
и клинической вирусологии,
коллеги по многолетней работе
в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского
и НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи,
Члены редакционной коллегии журнала
«Вопросы вирусологии»*

Problems
of Virology

Voprosy
Virusologii