ISSN 0507-4088 (Print)
ISSN 2411-2097 (Online)

Д.И.ИВАНОВСКИЙ

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

1

Том 70 • 2025

Volume 70 • Issue 1 • 2025

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 К1, 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 соответствии 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 27.02.2025.
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, 2025

**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.

1

Том 70 · 2025

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

Глупов 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 Л.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)

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

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

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

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

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)

Яшкулов К.Б. (к.м.н., Элиста, Россия)

МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

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

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

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 February 27, 2025.
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, 2025

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

1

Volume 70 · 2025

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)
Lukashev A.N. – RAS Corr. Member, 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)

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)

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

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

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

Oxford J. (DSc; London, UK)

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

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

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

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

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

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

Webby R. (PhD; Memphis, USA)

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

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

Догадов Д.И., Кюрегян К.К., Миносян А.А., Гончаренко А.М., Шмат Е.В., Михайлов М.И.
Острые респираторные вирусные инфекции у обезьян **7**

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Николаева Л.И., Стучинская М.Д., Телепенина К.П., Шевченко Н.Г., Куприянов В.В., Краснослободцев К.Г., Мукашева Е.А., Трушакова С.В., Хлопова И.Н., Кружкова И.С., Кистенева Л.Б., Колобухина Л.В., Бурцева Е.И.
Анализ ассоциации клинического течения гриппа с однонуклеотидным полиморфизмом генов, влияющих на продукцию интерферона-λ3* **25**

Чернорыж Я.Ю., Кондратьева В.М., Малкова А.П., Савочкина Т.Е., Елисеева О.В., Латышев О.Е., Якунин Д.Ю., Зайкова О.Н., Слуднякова Е.С., Гребенникова Т.В.
Доклинические исследования безопасности интраназальной вакцины на основе вирусоподобных частиц для профилактики COVID-19* **35**

Степанюк М.А., Легостаев С.С., Карелина К.В., Тимофеева Н.Ф., Емцова К.Ф., Охлопкова О.В., Таранов О.С., Протопопов А.В., Терновой В.А., Локтев В.Б., Святченко В.А., Агафонов А.П.
Выявление и характеризация вируса Dezidougou (род *Negevirus*) в комарах (*Ochlerotatus caspius*), собранных на территории Республики Саха (Якутия)* **47**

Бутырский А.Ю., Морозова Е.Н., Саркисян К.А.
Оценка возможности определения количественного содержания гемагглютинина в готовой лекарственной форме инактивированных вакцин для профилактики гриппа, содержащих адъювант* **57**

Пашков Е.А., Шиквин Д.А., Пашков Г.А., Нагиева Ф.Г., Богданова Е.А., Быков А.С., Пашков Е.П., Свитич О.А., Зверев В.В.
Оценка профилактического эффекта нокдауна клеточных генов *NXF1*, *PRPS1* и *NAA10* при гриппозной инфекции на модели *in vitro** **66**

Пальянова Н.В., Адаменко Л.С., Курская О.Г., Сароян Т.А., Соломатина М.В., Соболев И.А., Шестопалов А.М.
Суммарные антитела и нейтрализующая способность сывороток реконвалесцентов по отношению к трем разным штаммам SARS-CoV-2* **78**

Семижон П.А., Счесленок Е.П., Дубков Н.А., Сухоцкая Е.А., Столбунова К.А., Попов Иг.В., Попов Ил.В., Алексеев А.Ю., Кабве Э., Давидюк Ю.Н.
Идентификация ортохантавирусов, впервые выявленных на территории Республики Беларусь **87**

*Статьи опубликованы на английском языке на сайте журнала: https://virusjour.crie.ru

CONTENTS

REVIEWS

Dogadov D.I., Kyuregyan K.K., Minosyan A.A., Goncharenko A.M., Shmat E.V., Mikhailov M.I.
Acute respiratory viral infections in monkeys 7

ORIGINAL RESEARCHES

Nikolaeva L.I., Stuchinskaya M.D., Telepenina K.P., Shevchenko N.G., Kuprianov V.V., Krasnoslobodtsev K.G., Mukasheva E.A., Trushakova S.V., Khlopova I.N., Kruzhkova I.S., Kisteneva L.B., Kolobukhina L.V., Burtseva E.I.
Analysis of the association of influenza clinical course with single nucleotide polymorphism i n genes affecting the interferon-λ3 production* **25**

Chernoryzh Ya.Yu., Kondratieva V.M., Malkova A.P., Savochkina T.E., Eliseeva O.V., Latyshev O.E., Yakunin D.Yu., Zaykova O.N., Sludnyakova E.S., Grebennikova T.V.
Pre-clinical safety studies of intranasal virus-like particles based vaccine for prevention of COVID-19* **35**

Stepanyuk M.A., Legostaev S.S., Karelina K.V., Timofeeva N.F., Emtsova K.F., Ohlopkova O.V., Taranov O.S., Protopopov A.V., Ternovoi V.A., Loktev V.B., Svyatchenko V.A., Agafonov A.P.
Detection and characterization of the Dezidougou virus (genus Negevirus) in mosquitoes (Ochlerotatus caspius) collected in the Republic of Sakha (Yakutia)* **47**

Butirskiy A.Yu., Morozova E.N., Sarkisyan K.A.
The evaluation of the possibility of the estimation the amount of hemagglutininin in the final lots of inactivated adjuvanted influenza vaccines* **57**

Pashkov E.A., Shikvin D.A., Pashkov G.A., Nagieva F.G., Bogdanova E.A., Bykov A.S., Pashkov E.P., Svitich O.A., Zverev V.V.
Assessment of the preventive effect of knockdown of cellular genes *NXF1*, *PRPS1* and *NAA10* in influenza infection in an *in vitro* model* **66**

Palyanova N.V., Adamenko L.S., Kurskaya O.G., Saroyan T.A., Solomatina M.V., Sobolev I.A., Shestopalov A.M.
Total antibodies and neutralizing ability of convalescent sera against three different strains of SARS-CoV-2* **78**

Semizhon P.A., Scheslenok E.P., Dubkov N.A., Sukhotskaya E.A., Stolbunova K.A., Popov Ig.V., Popov Il.V., Alekseev A.Yu., Kabwe E., Davidyuk Yu.N.
Identification of orthohantaviruses detected for the first time in the Republic of Belarus **87**

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

ОБЗОРЫ

НАУЧНЫЙ ОБЗОР
DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-293
© ДОГАДОВ Д.И., КЮРЕГЯН К.К., МИНОСЯН А.А., ГОНЧАРЕНКО А.М., ШМАТ Е.В., МИХАЙЛОВ М.И., 2025

Острые респираторные вирусные инфекции у обезьян

Догадов Д.И.[1]✉, Кюрегян К.К.[2–4], Миносян А.А.[1], Гончаренко А.М.[1], Шмат Е.В.[5], Михайлов М.И.[2,3]

[1]Курчатовский комплекс медицинской приматологии ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт», 354376, г. Сочи, Россия;
[2]ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Россия;
[3]ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва, Россия;
[4]ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993, г. Москва, Россия;
[5]Сочинский институт (филиал) ФГАОУ ВО РУДН им. Патриса Лумумбы, 354348, г. Сочи, Россия

Резюме
Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) являются одной из наиболее серьезных проблем, влияющих на разведение обезьян, особенно среди импортированных и содержащихся в неволе приматов. Респираторные заболевания также являются значимой причиной заболеваемости и смертности в диких популяциях, большинство этих инфекций также могут поражать и людей. Многие виды обезьян, включая антропоидов, восприимчивы к ОРВИ. Вспышки спонтанных респираторных инфекций описаны во многих зоопарках и приматологических центрах мира. Вместе с тем изучение спонтанной и экспериментальной инфекции у лабораторных приматов представляет собой бесценный источник информации о биологии и патогенезе ОРВИ и по-прежнему является незаменимым инструментом для тестирования вакцин и лекарственных препаратов. **Целью** данного обзора литературы являлось обобщение и анализ опубликованных данных о циркуляции ОРВИ (вирусы парагриппа, аденовирусы, респираторно-синцитиальный вирус, вирусы гриппа, риновирусы, коронавирусы, метапневмовирусы, бокавирусы) среди диких и содержащихся в неволе приматов, а также результатов экспериментов по моделированию этих инфекций на обезьянах.

Ключевые слова: *ОРВИ; обезьяны; обзор*

Для цитирования: Догадов Д.И., Кюрегян К.К., Миносян А.А., Гончаренко А.М., Шмат Е.В., Михайлов М.И. Острые респираторные вирусные инфекции у обезьян. *Вопросы вирусологии*. 2025; 70(1): 7–24. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-293 EDN: https://elibrary.ru/rzmdum

Финансирование. Работа выполнена в рамках госзадания НИЦ «Курчатовский институт».
Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

REVIEW
DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-293

Acute respiratory viral infections in monkeys

Dmitry I. Dogadov[1]✉, Karen K. Kyuregyan[2–4], Albert A. Minosyan[1], Aleksandra M. Goncharenko[1], Elena V. Shmat [5], Mikhail I. Mikhailov[2,3]

[1]Kurchatov Complex of Medical Primatology of NRC «Kurchatov Institute», 354376, Sochi, Russia;
[2]Central Research Institute of Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 111123, Moscow, Russia;
[3]I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia;
[4]Russian Medical Academy of Continuous Professional Education of the Ministry of Health of Russia, 125993, Moscow, Russia;
[5]Sochi Institute (branch) of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, 354348, Sochi, Russia

Abstract
Acute respiratory viral infections (ARVI) are one of the most significant infections affecting the breeding of monkeys, especially among imported and captive primates. Respiratory diseases are also an important cause of morbidity and mortality in wild populations, and most of these infections can affect humans. Many anthropoid species,

including apes, are susceptible to ARVI. Outbreaks of spontaneous respiratory infections have been described in many zoos and primatological centers around the world. Moreover, the study of spontaneous and experimental infection in laboratory primates provides an invaluable source of information on the biology and pathogenesis of ARVI and remains an indispensable tool for testing vaccines and drugs. **The aim** of this literature review was to summarize and analyze published data on the circulation of ARVI causative agents (parainfluenza viruses, adenoviruses, respiratory syncytial virus, influenza viruses, rhinoviruses, coronaviruses, metapneumoviruses, bocaviruses) among wild and captive primates, as well as the results of experimental modeling these infections in monkeys.

Keywords: *ARVI; monkeys; review*

For citation: Dogadov D.I., Kyuregyan K.K., Minosyan A.A., Goncharenko A.M., Shmat E.V., Mikhailov M.I. Acute respiratory viral infections in monkeys. *Problems of Virology* (*Voprosy Virusologii*). 2025; 70(1): 7–24. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-293 EDN: https://elibrary.ru/rzmdum

Funding. This research was funded by the Russian Federation fundamental research program of NRC «Kurchatov Institute».
Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Введение

Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) на сегодняшний день представляют серьезную проблему для человечества. С момента открытия вируса гриппа типа А в 1933 г. было идентифицировано около 20 респираторных вирусов. Большинство острых респираторных инфекций вызывают риновирусы (RV), респираторно-синцитиальный вирус (RSV), вирусы гриппа (FLU) типов А и В (FLU-A, FLU-B), вирусы парагриппа и аденовирусы. В XXI в. были обнаружены новые возникающие респираторные вирусы, в том числе бетакоронавирусы SARS и SARS-CoV-2, метапневмовирус (MPV) и бокавирус (BOV) [1]. Все они являются потенциальным источником новых пандемий, о чем свидетельствует недавняя пандемия COVID-19 [2]. Для России острые респираторные инфекции также являются проблемой. Так, на территории РФ на долю острых респираторных инфекций приходится около 90% всех зарегистрированных инфекционных заболеваний, что причиняет нашей стране многомиллиардные убытки [3].

ОРВИ являются одним из наиболее важных факторов, влияющих на разведение обезьян, особенно среди импортированных и содержащихся в неволе приматов; эти инфекции также являются значимой причиной заболеваемости и смертности животных в дикой природе [2].

Во многих отношениях на сегодняшний день обезьяны представляют собой наиболее подходящую модель для доклинических исследований респираторных инфекционных заболеваний, поскольку патогенез этих инфекций у приматов схож с таковым у людей и, следовательно, методы лечения, оказавшиеся эффективными у обезьян, могут быть быстро и без особых коррекций введены в клиническую практику для человека [2, 4].

Целью настоящей работы являлось обобщение и анализ опубликованных данных о циркуляции ОРВИ среди обезьян, вспышках, возникших в зоопарках и приматологических центрах мира, а также результатов экспериментов по моделированию этих инфекций на обезьянах.

Вирусы парагриппа

Вирусы парагриппа человека являются основной причиной заболеваний нижних дыхательных путей у детей и пожилых. Они являются второй после RSV причиной госпитализации больных с патологией нижних дыхательных путей [5]. Эти вирусы были впервые обнаружены в конце 1950-х гг., и за последние десятилетия были накоплены значительные знания об их молекулярной структуре и функциях, что привело к большим изменениям как в номенклатуре, так и в таксономии этих вирусов [6]. Вирусы парагриппа имеют РНК-геном негативной полярности и относятся к большому семейству Paramixoviridae порядка *Mononegavirales,* которое включает вирусы парагриппа человека типов 1 (PIV-1), 2 (PIV-2), 3 (PIV-3), 4А (PIV-4A) и 4Б (PIV-4Б), а также вирус Сендай, обезьяний вирус типа 5 (SV5) и вирус парагриппа крупного рогатого скота типа 3, которые являются животными аналогами PIV-1, PIV-2 и PIV-3 соответственно, поскольку генетически близки этим вирусам. Вирусы PIV-1 и PIV-3 классифицируют как относящиеся к роду *Respirovirus*[1], а PIV-2 и PIV-4 – к роду *Orthorubulavirus*[2].

Природный резервуар вируса Сендай не установлен. В связи с тем что этот вирус эффективно заражает мышей и легко распространяется среди неиммунных грызунов, многие авторы предполагают, что именно грызуны являются его природным резервуаром, однако на сегодняшний день отсутствуют серологические и вирусологические доказательства наличия вируса Сендай в диких популяциях мышей. SV5 первоначально был выделен

[1]ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Genus: Respirovirus; 2024. Доступно на: https://ictv.global/report/chapter/paramyxoviridae/paramyxoviridae/respirovirus: (дата обращения 06.06.2024).

[2]ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Genus: Orthorubulavirus; 2024. Доступно на: https://ictv.global/report/chapter/paramyxoviridae/paramyxoviridae/orthorubulavirus: (дата обращения 06.06.2024).

от обезьян, но его резервуаром, по всей видимости, являются собаки [7].

Обезьяны также восприимчивы к парамиксовирусам, вызывающим респираторные заболевания у этих животных. Об этом свидетельствуют антитела, обнаруженные у разных видов приматов (**табл. 1** и **2**). Как видно из табл. 1 и 2, антитела к PIV-1 обнаруживаются у всех видов высших [8], а также многих видов низших обезьян [8–11], однако в литературе на сегодняшний день отсутствует информация о патологии, вызываемой этим вирусом у обезьян. Тем не менее приматы представляют собой ценную модель для изучения патогенеза PIV-1, а также испытания вакцин против этого вируса. Было показано, что при экспериментальной инфекции обезьяны разных видов (шимпанзе, макаки, ночные обезьяны, саймири, зеленые мартышки) чувствительны как к PIV-1, так и к вирусу Сендай, однако наиболее длительное выделение обоих вирусов как при интраназальном, так и при интратрахеальном заражении было выявлено среди зеленых мартышек (*Chlorocebus aethiops*) [7, 12]. Кроме того, было показано, что заражение вирусом Сендай защищало африканских зеленых мартышек от последующего заражения как вирусом PIV-1 [9], так и RSV [13].

J.D. Hawthorne и соавт. было проведено интраназальное заражение 4 усатых тамаринов (*Saguinus mystax*) вирусом PIV-1. К каждому из 4 животных подсаживали одно контактное животное через 4 ч, затем еще одно животное через 3 сут и далее двух животных через 7 сут. У всех зараженных, а также контактных животных, подсаженных через 4 ч и 3 сут, наблюдались признаки инфекции верхних дыхательных путей с 5-х по 2-е сутки после заражения, также у этих животных в течение 2 нед отмечалась потеря массы тела. Животные, подсаженные через 7 сут, не проявляли клинических и лабораторных признаков инфекции. У всех инфицированных животных, а также у контактного животного, подсаженного на 3-и сутки после заражения, в мазках из зева был обнаружен вирус PIV-1. Антитела выявлялись на 14–21-е сутки у всех животных, кроме контактных, подсаженных на 7-е сутки [14].

Как видно из табл. 1 и 2, антитела к PIV-2 были выявлены у всех видов высших обезьян [8, 15], а также у диких и содержащихся в неволе обезьян рода мартышки (африканские зеленые и краснохвостые мартышки) [16] и рода макак [11, 17] (макаки яванские, тонкские макаки), однако у павианов антител к PIV-2 не было выявлено [18].

Экспериментальные исследования на разных видах обезьян (шимпанзе, зеленые мартышки, саймири, ночные обезьяны, макаки резусы и лапундеры) показали, что при заражении их вирусом PIV-2 наиболее высокие уровни репликации вируса, а также длительность выделения вируса регистрировались среди шимпанзе и африканских зеленых мартышек, у остальных обезьян эти показатели были гораздо меньше. Клинических проявлений инфекции описано не было, тем не менее антитела к PIV-2 были выявлены у всех экспериментальных животных [19].

В отличие от PIV-1, патология обезьян при заражении другим представителем рода *Respirovirus* – PIV-3, а также его циркуляция в различных питомниках и местах естественного обитания описаны многими авторами [5, 8, 11, 20]. Антитела к PIV-3 были обнаружены у всех представителей высших обезьян (табл. 1) [8], а также у обезьян рода макак, павианов и зеленых мартышек (табл. 2) [8, 9, 11].

A.E. Churchill и соавт. была описана вспышка пневмонии со смертельным исходом, когда среди 13 отловленных партий патасов (*Erythrocebus patas*) в Нигерии погибло 75% животных. При исследовании легких 33 погибших животных у 13 был обнаружен вирус PIV-3 [21].

M. Sasaki и соавт. с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) обнаружили маркеры PIV-3 у павианов и зеленых мартышек, обитающих в двух разных районах Замбии. Так, среди зеленых мартышек (*Chlorocebus pygerythrus*) антитела к PIV-3 были обнаружены у 6,7% животных, а у желтых павианов (*Papio cynocephalus*) и павианов чакма (*Papio ursinus*) – у 4 и 22% соответственно. Кроме того, РНК PIV-3 была обнаружена в образцах селезенки 3 (6%) из 50 образцов павианов чакма и в 1 (2%) из 50 образцов желтого павиана. Среди 89 исследованных образцов зеленых мартышек РНК PIV-3 обнаружена не была. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей, выделенных от павианов, показал их принадлежность к PIV-3 человека [5].

Л.И. Корзая и соавт. было описано два смертельных случая у 2-летних павианов анубисов, содержавшихся в вольере, которые погибли от тотальной двусторонней пневмонии с разницей в 2 сут, у обоих животных в паренхиме легких с помощью ПЦР была обнаружена РНК PIV-3, анализ нуклеотидных последовательностей которой также показал ее принадлежность к PIV-3 человека [9].

Экспериментальные исследования продемонстрировали, что многие приматы, включая шимпанзе, макак, саймири, ночных обезьян, патасов, являются восприимчивыми к инфекции, вызванной PIV-3 [5]. Первая работа по воспроизведению экспериментальной PIV-3-инфекции была проведена на патасах, которые были заражены материалом от погибших обезьян описанной ранее вспышки. Заражение не привело к возникновению пневмонии, но инфекция сопровождалась повышением температуры тела и размножением вируса в носоглотке. Сыворотка крови, взятой через 14 сут после заражения, содержала антитела к PIV-3 в высокой концентрации [21].

J.D. Hawthorne и соавт. было проведено экспериментальное интраназальное заражение 5 усатых тамаринов (*Saguinus mystax*) PIV-3. Через 3 сут после заражения в клетку одной из обезьян было помещено контактное животное. У 3 из 5 зараженных животных, а также у контактного животного развились незначительные признаки инфекции верхних дыхательных путей, а также была зафиксирована значительная потеря массы тела в течение первых 2 нед после зараже-

ния. Также у 3 зараженных животных в мазках из зева в течение 7–10 сут обнаруживался вирус PIV-3, а антитела к этому вирусу были выявлены у всех зараженных обезьян, включая контактное животное [22].

Что касается PIV-4, то мы не нашли в литературе данных о естественном инфицировании обезьян этим вирусом. Тем не менее M. Komada и соавт. было описано экспериментальное интраназальное заражение 6 макак японских (*Macaca fuscata*) вирусом PIV-4, из них 4 были заражены PIV-4A, а 2 – PIV-4Б [23]. Несмотря на то что у всех зараженных животных не наблюдалось клинических признаков инфекции, в эпителии носа был обнаружен антиген вируса, также у всех животных через 2 нед имелись антитела классов IgG и IgM. Через 10 нед было проведено повторное заражение животных, после которого наблюдался небольшой подъем концентрации антител класса IgM у обезьян, повторно инфицированных PIV-4Б, тогда как у животных, повторно зараженных PIV-4A, антитела класса IgM не выявлялись. Вирусоспецифические антитела классов IgA и IgE не были обнаружены в сыворотке крови после заражения и повторного заражения PIV-4, однако присутствовали в слюне и носовых экссудатах.

Аденовирусы

Семейство Adenoviridae порядка *Rowavirales* включает в себя группу икосаидрических безоболочечных вирусов, геном которых представлен двухцепочечной ДНК. Это семейство состоит из 5 родов: *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus, Atadenovirus, Siadenovirus* и *Ichtadenovirus,* охватывающих широкий спектр вирусов млекопитающих, амфибий, рептилий и рыб [24, 25].

Аденовирусы обезьян, как и человека, относятся к роду *Mastadenovirus*[3]. В настоящее время этот род включает более 50 видов; среди них 7 видов аденовирусов человека (HAdV-A–G) и 9 видов аденовирусов обезьян (SAdV-A–I) [26]. Как и у человека, они часто обусловливают латентную инфекцию, но при снижении иммунитета могут вызывать заболевания в виде конъюнктивита, пневмонии, энтерита, гепатита, а также панкреатита [27, 28].

Было показано, что антитела к аденовирусам выявляются как среди обезьян Старого [8, 9, 29], так и Нового Света [8, 30], живущих в неволе, а также поступивших из мест естественного обитания (табл. 1 и 2). Была описана вспышка со смертельным исходом, когда 4 из 9 павианов анубисов (*Papio anubis*), содержащихся в Техасском институте биомедицинских исследований, умерли от аденовирусной пневмонии [31]. Авторам не удалось типировать культуральные изоляты от погибших животных, однако была возможность секвенировать *de novo* изоляты от павианов, имеющих симптомы ОРВИ, а также от животного с бессимптомной инфекцией во время вспышки. Анализ нуклеотидных последовательностей показал принадлежность выделенных изолятов к SAdV-B и SAdV-C. Следует отметить, что антитела к SAdV-C были обнаружены как у павианов, так и у сотрудников центра, что указывает на потенциальную возможность межвидовой передачи аденовируса между людьми и обезьянами. Еще одним доказательством межвидовой передачи аденовируса служит исследование Z. Xiang и соавт., которое показало, что среди людей, проживающих в США и Таиланде, антитела к аденовирусам шимпанзе встречались редко, тогда как их распространенность оказалась выше в сыворотках крови людей из стран Африки к югу от Сахары, где широко распространены охота на обезьян, а употребление в пищу мяса диких животных является обычным явлением [29].

Аденовирус также может вызывать пневмонии и у обезьян Нового Света, подтверждением чего служит вспышка аденовирусной пневмонии среди медных прыгунов (*Callicebus cupreus*), содержащихся в Калифорнийском национальном университете, из которых 83% животных погибли. Полногеномное секвенирование подтвердило, что этиологическим агентом вспышки являлся аденовирус, геном которого отличался от предыдущих выделенных аденовирусов и был назван TAdv. У рабочего, контактирующего с заболевшими животными, наблюдались признаки респираторной инфекции, а также были выявлены антитела к TAdv, кроме того, антитела к TAdv были обнаружены и у одного из членов семьи рабочего. Эти данные свидетельствуют о возможной зоонозной передаче этого вируса, т.к. антитела к этому вирусу были также обнаружены у 2 из 81 отобранного методом случайной выборки донора крови, живущего в данном регионе [32].

Для дальнейшего изучения патогенности выделенный от медных прыгунов аденовирус был экспериментально воспроизведен на 3 игрунках обыкновенных (*Callithrix jacchus*), без предварительного скрининга их на антитела. На 5–10-е сутки после заражения у животных начали проявляться клинические признаки инфекции, которая характеризовалась субфебрильной температурой, снижением активности и обмена веществ, а также анорексией. У животных в течение 15 сут наблюдалось выделение вируса, а также были выявлены вируснейтрализующие антитела в сыворотке крови. У 2 животных, подвергнутых эвтаназии через 15 сут после выздоровления, выраженные гистологические поражения отсутствовали, возможно из-за значительного интервала между появлением клинических признаков и вскрытием. Оставшееся экспериментальное животное было повторно заражено аденовирусом для оценки вероятности более тяжелой повторной инфекции и вместе с контрольным животным наблюдалось в течение 21 сут до эвтаназии, однако клинических признаков инфекции у повторно зараженного животного не наблюдалось.

Таким образом, патогенез экспериментальной аденовирусной инфекции у игрунок обыкновенных напо-

[3]ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Genus: Mastadenovirus; 2024. Доступно на: https://ictv.global/report/chapter/adenoviridae/adenoviridae/mastadenovirus: (дата обращения 06.06.2024).

минал легкую самоизлечивающуюся респираторную инфекцию, обычно наблюдаемую у иммунокомпетентных людей, а не быстро прогрессирующую смертельную пневмонию, наблюдавшуюся у 19 из 23 медных прыгунов во время предыдущей вспышки 2009 г. Эти результаты также показывают возможность межвидовой передачи аденовируса и обеспечивают основу для разработки модели аденовирусной инфекции обезьян, полезной для оценки зоонозного потенциала аденовирусов [33].

Бокавирус

BOV – это вирус, содержащий однонитевую ДНК и принадлежащий к роду *Bocaparvovirus* семейства Parvoviridae порядка *Piccovirales*[4]. Этот вирус был выделен около 20 лет назад и обнаруживается во всем мире у детей в возрасте от 6 мес до 2 лет при острых респираторных заболеваниях, а также у пациентов с гастроэнтероколитами. На сегодняшний день выделяют 4 генотипа BOV (BOV-1–4). BoV-1 обнаруживается в дыхательных путях, тогда как BOV2–4 – в кишечнике [34].

BOV широко распространены среди обезьян. Так, в работе K. Sharp и соавт. были исследованы сыворотки крови от диких шимпанзе, горилл, а также ряда низших обезьян Старого Света из Камеруна. Антитела к BOV-1/2 были обнаружены у 72,6% шимпанзе, 36,4% горилл, а также в единичных образцах от мартышки Мона (*Cercopithecus mona*), дрила (*Mandrillus leucophaeus*) и мартышки Прейса (*Cercopithecus preussi*). Кроме того, в фекальных образцах 2 шимпанзе и 2 горилл была обнаружена ДНК BOV, генетический анализ которой показал сходство с BOV-1 и -3 в разных участках геномной последовательности [35]. Также C. Kumakamba и соавт. в образцах крови и печени от 4 краснохвостых обезьян (*Cercopithecus ascanius*), мартышки Бразза (*Cercopithecus neglectus*) и мартышки Вольфа (*Cercopithecus wolfi*) из Конго была обнаружена ДНК BOV, генетический анализ которой показал сходство с BOV-2 и -3. Эти исследования говорят о возможной межвидовой передаче BOV между людьми и приматами [36].

Приматы, по-видимому, являются хорошей экспериментальной моделью для изучения BOV, учитывая их широкую распространенность среди этих животных. Однако в доступной литературе данные о подобных исследованиях на сегодняшний день отсутствуют.

Респираторно-синцитиальный вирус

RSV человека является наиболее распространенной причиной инфекций нижних дыхательных путей у детей во всем мире. Впервые этот вирус был обнаружен в 1955 г. при изучении ринита у шимпанзе, а в последствии были описаны антигенно сходные изоляты, выделенные от человека [37]. RSV относится к роду *Orthopneumovirus* семейства Pneumoviridae порядка *Mononegavirale*[5], геном вируса представлен одноцепочечной РНК негативной полярности.

На сегодняшний день случаи, когда RSV вызывал бы значительные поражения дыхательных путей со смертельным исходом среди обезьян, описаны только у шимпанзе (*Pan troglodytes*), когда в Эдинбурге при вспышке ОРВИ в колонии из 11 шимпанзе, у которых был отмечен кашель, слизисто-гнойные выделения из носа и одышка, погибла 14-месячная самка. При вскрытии погибшего животного были выявлены обширные бронхопневматические изменения, а также с помощью реакции иммунофлуоресценции был обнаружен антиген RSV [38]. Тем не менее антитела к этому вирусу с разной частотой обнаруживали среди всех видов высших обезьян (табл. 1) [8], а также зеленых мартышек (табл. 2) [16], однако смертельных исходов инфекции зафиксировано не было.

О восприимчивости обезьян к RSV свидетельствуют результаты экспериментального заражения. Такие исследования были проведены как на человекообразных обезьянах (шимпанзе) [39], у которых отмечались наиболее выраженные клинические признаки, схожие с наблюдаемыми у человека, так и на низших обезьянах Старого (обезьяны рода макак [15, 40–43], зеленые мартышки [44], павианы анубисы [45]) и Нового Света (капуцины [46], ночные обезьяны [47], беличьи саймири [39]), у которых выявлялись вирус, антитела, а также наблюдались патологические изменения в легких. В отличие от шимпанзе, успешное экспериментальное заражение низших обезьян RSV происходило только при введении высоких доз вируса. Так, у макак (*Macaca* spp.) при заражении наблюдались только лабораторные маркеры инфекции без клинических проявлений, тогда как у африканских зеленых мартышек (*Chlorocebus aethiops*), ночных обезьян (*Aotus trivirgatus*) и капуцинов (*Cebus apella* и *Cebus albifrons*) отмечались клинические признаки инфекции, такие как выделения из носа, конъюнктивит, чихание, свистящее дыхание, а также признаки интерстициальной пневмонии. Что касается павианов (*Papio anubis*), то у детенышей, зараженных высокой дозой вируса, экспериментальная инфекция сопровождалась клиническими признаками инфекции и гистологическими изменениями в легких [45].

Животные модели RSV-инфекции, в частности обезьяны, играют важную роль в доклинических испытаниях кандидатных вакцин против RSV [48]. Для оценки остаточной вирулентности и протективных свойств кандидатных вакцин на основе живого аттенуированного вируса были использованы шимпанзе [49, 50], африканские зеленые мартышки [51–56], ночные обезьяны [46] и обезьяны рода макак [43, 57]. Было установлено, что живые аттенуиро-

[4]ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Genus: Mastadenovirus; 2024. Доступно на: https://ictv.global/report/chapter/adenoviridae/adenoviridae/mastadenovirus: (дата обращения 06.06.2024).

[5]ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Genus: Orthopneumovirus; 2024. Доступно на: https://ictv.global/report/chapter/pneumoviridae/pneumoviridae/orthopneumovirus: (дата обращения 06.06.2024).

ванные вакцины защищали шимпанзе и ночных обезьян от последующего заражения RSV дикого типа, в то время как векторные вакцины вызывали только низкие уровни антител и практически не защищали от последующего заражения [58].

Метапневмовирус

MPV человека – это вирус, филогенетически близкий к RSV, вызывающий респираторную инфекцию у детей. Кроме того, он может поражать и взрослых, особенно лиц с хроническими заболеваниями, что приводит к различным клиническим проявлениям вплоть до тяжелой пневмонии [59]. MPV имеет РНК-геном негативной полярности и принадлежит к роду *Metapneumovirus* семейства Pneumoviridae порядка *Mononegavirales*[6]. Несмотря на то что впервые он был обнаружен в 2001 г., ретроспективные исследования показали его циркуляцию среди людей на протяжении уже более 50 лет [60].

Среди низших обезьян циркуляция MPV описана не была, однако H. Buiendijk и соавт. сообщили о циркуляции этого вируса среди шимпанзе, горилл и орангутанов в зоопарках и приматологических центрах мира с разной частотой [61]. Также были зарегистрированы вспышки MPV-инфекции в популяциях диких шимпанзе в 2004 г. в Кот-д`Ивуаре [62], в 2006 г. в Танзании [63], а также среди диких горилл в Руанде в 2009 г. [64]. Все эти вспышки сопровождались смертельными случаями и, скорее всего, были связаны с экотуризмом. Также была описана вспышка MPV-инфекции среди шимпанзе в приматологическом центре Чикаго, когда у 7 животных, по-видимому, заразившихся от работника центра, были описаны признаки респираторного заболевания и одно животное умерло. Гистологический анализ легких погибшего животного показал признаки метапневмовирусной инфекции. Срезы легочной ткани были положительными по результатам теста на РНК MPV и отрицательными в тестах на генетический материал аденовирусов, COV, FLU-A и -B, вирусов PIV-1–4, BOV, RV и RSV. Анализ выделенной из образца нуклеотидной последовательности продемонстрировал ее 99% сходство с MPV [65].

Обезьяны также послужили экспериментальной моделью для метапневмовирусной инфекции. Среди высших обезьян экспериментальное воспроизведение было проведено на 31 шимпанзе, из которых у 61% животных при первичном скрининге были обнаружены антитела к MPV. Серопозитивные животные не были восприимчивы к экспериментальной инфекции, тогда как у серонегативных обезьян наблюдались признаки респираторного заболевания [66].

В связи с тем, что шимпанзе по этическим причинам не могут быть использованы в экспериментах, аналогичные исследования были проведены на низших обезьянах. Было показано, что макаки резусы (*Macaca mulatta*), макаки яванские (*Macaca fascikularis*) и африканские зеленые мартышки (*Chlorocebus aethiops*) также восприимчивы к MPV [67, 68]. Причем в то время как заражение макак резусов и макак яванских сопровождалось умеренной репликацией вируса в дыхательных путях, у африканских зеленых мартышек наблюдались более высокие уровни репликации и более высокие титры антител, в связи с чем эти животные послужили моделью *in vivo* для испытаний потенциальных вакцин и лекарственных препаратов против MPV [68, 69].

Вирусы гриппа

FLU представляют собой группу оболочечных вирусов с сегментированным РНК-геномом негативной полярности, относятся к семейству Orthomyxoviridae порядка *Articulavirales,* в которое входит 7 родов, из которых 3 монотипных рода (*Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus*) содержат вирусы, вызывающие инфекцию человека, – FLU типов A, B и C (FLU-A, FLU-B, FLU-C)[7].

Все виды высших обезьян, а также многие виды низших обезьян Старого и Нового Света чувствительны к вирусу FLU-A [8, 11, 70], кроме того, некоторые виды обезьян также чувствительны к FLU-B [8, 16], о чем свидетельствуют данные о наличии антител к этим вирусам (табл. 1, 2).

Было показано, что у обитающих в природе обезьян (обезьяны рода макак, зеленые мартышки, патасы) антитела к вирусу FLU-A (вирусы H1N1, H3N2, H2N2) выявляются в 6–80% случаев, что свидетельствует о циркуляции вируса в природе среди этих животных [71]. Обезьяны, которые контактируют с людьми, могут естественным образом заражаться сезонными эндемичными вирусами гриппа человека и возникающими вирусами птичьего гриппа с пандемическим риском. Так, среди обезьян рода макак, обитающих в национальных парках, а также свободноживущих обезьян в священных храмах, непосредственно контактирующих с людьми в Индонезии, Бангладеш, Сингапуре и Камбодже, было выявлено от 13 до 29% серопозитивных особей. Среди положительных образцов в основном были обнаружены антитела к штаммам вируса гриппа H1N1 и H3N2, а у двух обезьян из Бангладеш были обнаружены антитела к птичьему FLU H9N2, который также обнаруживается среди людей. Кроме того, среди 48 назальных мазков, взятых у макак яванских (*Macaca fascicularis*) из Камбоджи одно животное (2,1%) оказалось положительным на РНК вируса FLU-A. Попытки дальнейшего типирования вируса оказались безуспешными [72].

В связи с тем, что во всем мире инфицирование вирусами FLU-A связано с серьезными заболеваниями и смертями среди млекопитающих и птиц,

[6]ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Genus: Metapneumovirus; 2025. Доступно на: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202301646 & taxon_name=Metapneumovirus: (дата обращения 14.02.2025).

[7]ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Family: Orthomyxoviridae; 2024. Доступно на: https://ictv.global/report_9th/RNAneg/Orthomyxoviridae: (дата обращения 06.06.2024).

Таблица 1. Частота выявления антител к респираторным вирусам среди высших обезьян
Table 1. The frequency of detection of antibodies to respiratory viruses among apes

№	Вид обезьяны Species of monkeys	Частота выявления, % The frequency of detection, %											Источник Reference
		PIV-1	PIV-2	PIV-3	RSV	MPV	FLU-A	FLU-B	RV	SARS-CoV-2	BOV	AdV	
1	Шимпанзе Chimpanzee (*Pan troglodytes, P. paniscus*)	0–51	0–16	0–75	0–18	42,6–61,0	0–13	4–12	0–9	ND	72,6	44–92	S.S. Kalter, 1997 [8] M. Skiadopoulos, 2004 [66] Z. Xiang, 2006 [29] K. Sharp, 2010 [35] H. Buitendijk, 2014 [61]
2	Гориллы Gorilla (*Gorilla gorilla*)	65	47	86	33	46,8	1	1	ND	1,6	36,4	ND	S.S. Kalter, 1997 [8] K. Sharp, 2010 [35] H. Buitendijk, 2014 [61] D. Cano-Terriza, 2024 [127]
3	Орангутаны Orangutan (*Pongo pygmaeus*)	10	6	21	25	10,1	5	0	ND	ND	ND	ND	S.S. Kalter, 1997 [8] H. Buitendijk, 2014 [61]
4	Гиббоны Gibbon (*Hylobates lar*)	24	5	38	29	ND	10	10	ND	ND	ND	ND	S.S. Kalter, 1997 [8]

Примечание. ND – нет данных. PIV-1 – вирус парагриппа 1-го типа; PIV-2 – вирус парагриппа 2-го типа; PIV-3 – вирус парагриппа 3-го типа; RSV – респираторно-синцитиальный вирус; FLU-A – вирус гриппа A; FLU-B – вирус гриппа B; RV – риновирус; BOV – бокавирус; AdV – аденовирус.

Note. ND – no data. PIV-1 – parainfluenza virus type 1; PIV-2 – parainfluenza virus type 2; PIV-3 – parainfluenza virus type 3; RSV – respiratory syncytial virus; FLU-A – influenza A virus; FLU-B – influenza B virus; RV – rhinovirus; BOV – bocavirus; AdV – adenovirus.

общественное здравоохранение и научные исследования уделяют большое внимание пониманию патогенности разных штаммов вируса гриппа и характеристике новых вакцин против FLU. Поэтому обезьяны разных видов стали популярными экспериментальными моделями для изучения патогенеза сезонных и новых вирусов FLU, а также особенностей иммунного ответа на них. У обезьян быстро развивается сероконверсия после экспериментального заражения вирусом сезонного гриппа, поэтому они используются для тестирования потенциальных вакцин на основе штаммов человеческого и птичьего происхождения. Как и у людей, у обезьян, инфицированных вирусом FLU, развиваются лихорадка, недомогание, выделения из носа и кашель. Репликацию вируса можно обнаружить в носоглотке и дыхательных путях.

Разные виды макак: яванские макаки (*Macaca fascicularis*), макаки резусы (*Macaca mulatta*) и свинохвостые макаки (*Macaca nemestrina*), были инфицированы вирусами FLU-A человека [73–83]. В основном эти экспериментальные заражения сопровождались репликацией вируса в верхних дыхательных путях, при этом инфекция протекала бессимптомно, вызывая легкие клинические симптомы. Острый респираторный дистресс и летальный исход наблюдались у обезьян только после заражения птичьим вирусом H5N1 [74, 83] и вирусом H1N1 1918 г. [84].

При экспериментальном заражении беличьих саймири (*Saimiri sciureus*) десятью различными штаммами птичьего FLU-A (H3N8, H4N8, H1N1, H8N4, H3N2, H10N7, H4N6, H7N8, H2N2, H3N6) для сравнения их репликации и вирулентности с вирусом человеческого FLU-A A/Udorn/307/72 (H3N2) наблюдали широкий спектр уровней репликации и вирулентности. Уровни репликации вируса и клинические проявления экспериментальной инфекции четко коррелировали, что указывает на то, что вызванное вирусом заболевание зависело от его способности к репликации в организме обезьян. Два вируса, A/Mallard/NY/6874/78 (H3N2) и A/Pintail/Alb/121/79 (H7N8), по уровню и продолжительности репликации, а также вирулентности напоминали инфекцию, вызванную штаммом вируса человека. Рентгенологические признаки пневмонии наблюдались у 1 из 4 животных, инфицированных вирусом A/Mallard/NY/6874/78 (H3N2), у 2 из 4 животных, инфицированных вирусом A/Pintail/Alb/121/79 (H7N8), и у 2 из 11 животных, инфицированных вирусом человеческого FLU-A A/Udorn/72 (H3N2). Вызванная другими вирусами птиц инфекция характеризовалась сниженной в 100–10 000 раз репликацией как в верхних, так и в нижних дыхательных путях, а также менее выраженными симптомами по сравнению с FLU человека [85].

Результаты экспериментального заражения макак резусов (*Macaca mulatta*), макак яванских (*Macaca fascicularis*) и обыкновенных игрунок (*Callithrix jacchus*) вирусом гриппа H1N1 показали, что все три вида жи-

Таблица 2. Частота выявления антител к респираторным вирусам среди низших обезьян
Table 2. The frequency of detection of antibodies to respiratory viruses among monkeys

	Вид обезьяны Species of monkeys	Частота выявления, % / The frequency of detection, %									Источник Reference
		PIV-1	PIV-2	PIV-3	RSV	MPV	FLU-A	BOV	COV обезьян COV of monkeys	AdV	
1	Макаки Macaques *(Macaca mulatta, M. fascicularis, M. nemestrina, M. nigra, M. nigrescens, M. hecki, M. Sylvanus, M. tonkeana*)	0–9,1 0*	0–36	0–36,4 8,9*	0 0*	0 0* 13–80**	0 0*	ND	51,3	0–48 8,6*	Th C. O'Brien, 1973 [71] Е.И. Гончарук, 1994 [92] S.S. Kalter, 1997 [8] L. Jones-Engel, 2001 [11] M.A. Schillaci, 2006 [17] E.A. Karlsson, 2012 [72] L. Korzaya, 2022 [9]
2	Павианы Papio (*Papio hamadrias, P. anubis, P. cynocephalus, P. ursinus*)	3,8	0	4–22*	ND	ND	ND	0	51,5	0–83	Е.И. Гончарук, 1994 [92] S.S. Kalter, 1997 [8] M. Sasaki, 2013 [5] K. Sharp, 2010 [35] L. Korzaya, 2022 [9]
3	Зеленые мартышки Green monkeys *(Chlorocebus aethiops, C. pygerythrus*)	2,7 6,8–23**	29,6 23,3**	5,4 13,3 –33,3**	0–11,1 0–19,9**	3,7 6,6–15,3**	3,7 3,3* 42**	0	40	0–7,4 3,3–14,8**	Th.C. O'Brien, 1973 [71] L.N. Mutanda, 1974 [16] Е.И. Гончарук, 1994 [92] K. Sharp, 2010 [35] L. Korzaya, 2022 [9] D. Dogadov, 2023 [10]
4	Мартышки Guenons *(Cercopithecus. mona, C. preussi)*	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100	ND	ND	K. Sharp, 2010 [35]
	Дрил Drill (*Mandrillus leucophaeus*)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100	ND	ND	K. Sharp, 2010 [35]
5	Игрунка Marmosets (*Callithrix jacchus*)	ND	ND	ND	ND	33	ND	ND	ND	31,3–100	S.S. Kalter, 1997 [8] J. Ersching, 2010 [30]
6	Капуцины Capuchins (*Cebus libidinosus*)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5,5	J. Ersching, 2010 [30]
7	Ночные обезьяны Three-striped night monkey (*Aotus trivirgatus*)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	78	S.S. Kalter, 1997 [8]
8	Колобусы Colobus monkey (Colobus)	ND	ND	ND	0	ND	ND	ND	ND	100	S.S. Kalter, 1997 [8]

Примечание. ND – нет данных; * – импортированные животные; ** – животные, поступившие из мест естественного обитания. PIV-1 – вирус парагриппа 1-го типа; PIV-2 – вирус парагриппа 2-го типа; PIV-3 – вирус парагриппа 3-го типа; RSV – респираторно-синцитиальный вирус; FLU-A – вирус гриппа A; FLU-B – вирус гриппа B; RV – риновирус; BOV – бокавирус; COV – коронавирус; AdV – аденовирус.

Note. ND – no data; * – imported; ** – animals from the wild. PIV-1 – parainfluenza virus type 1; PIV-2 – parainfluenza virus type 2; PIV-3 – parainfluenza virus type 3; RSV – respiratory syncytial virus; FLU-A – influenza A virus; FLU-B – influenza B virus; RV – rhinovirus; BOV – bocavirus; COV – coronavirus; AdV – adenovirus.

вотных восприимчивы к FLU. Однако по сравнению с макаками резусами и игрунками, у яванских макак наблюдался значительно более высокий уровень репликации вируса в верхних дыхательных путях и легких как по пиковым значениям, так и по продолжительности продукции вируса, а также более выраженное повышение температуры тела. Напротив, клинические симптомы, включая респираторный дистресс, были более выражены у макак резус, чем у макак яванских и игрунок. Результаты исследования показали, что макаки яванские являются наиболее подходящими в качестве модели для исследования пандемического вируса гриппа H1N1 из-за более однородного и высокого уровня репликации вируса, а также повышения температуры, что может быть связано с более высоким уровнем экспрессии основного рецептора FLU человека в клетках эпителия трахей и бронхов [86].

Результаты этих исследований показывают, что обезьяны Старого и Нового Света восприимчивы к инфекции FLU. Учитывая тесную связь между людьми и приматами, необходим обязательный надзор за популяциями обезьян в тех регионах мира, где циркулируют вирусы птичьего и человеческого FLU. Кроме того, выявление штаммов FLU, патогенных для человека и обезьян, имеет большое значение для понимания их взаимодействия и оценки риска для общественного здравоохранения.

Риновирус

RV относятся к роду *Enterovirus* семейства Picornoviridae порядка *Picornavirales* и, как все пикорнавирусы, имеют РНК-геном положительной полярности[8]. На сегодняшний день все генотипы RV сгруппированы в три вида: A, B и C (RV-A, B, C) [87]. RV-C вызывают около 50% всех инфекций верхних дыхательных путей человека и связаны с гриппоподобными симптомами и острыми обострениями астмы у детей. Кроме того, этот вирус может вызывать заболевание у обезьян. Так, вспышка RV-C была зафиксирована в Уганде в 2013 г. среди диких шимпанзе, во время которой 56 животных заболели, а 5 умерли [88].

Серия экспериментальных заражений обезьян RV была проведена в 1960-х гг. Было показано, что низшие обезьяны Старого Света, такие как зеленые мартышки и патасы, не восприимчивы к заражению RV-A и -B. После заражения у этих животных не наблюдалось сероконверсии, а также не выявлялся вирус. Напротив, заражение высших обезьян (шимпанзе и гиббонов) RV-A и -B оказалось успешным, хотя, в отличие от RV-C, инфекция протекала бессимптомно и подтверждалась только лабораторными маркерами инфекции (выявление антител, выделение вируса из носоглотки) [89, 90].

В отличие от RV человека, экспериментальное заражение зеленых мартышек RV лошадей (род *Aphthovirus*, семейство Picornoviridae, порядок *Picornavirales*) сопровождалось выявлением у обезьян вируса в смывах из носоглотки, а также антител в сыворотке крови [90]. Это исследование говорит о возможности использования инфекции RV лошадей у низших приматов в качестве суррогатной модели *in vivo* риновирусной инфекции человека.

Коронавирус

COV – это оболочечные вирусы с геномом, представленным одноцепочечной РНК положительной полярности, относящиеся к подсемейству *Orthocoronavirinae* семейства Coronaviridae порядка *Nidovirales*[9]. Существует 4 рода COV: *Alphacoronavirus* и *Betacoronavirus,* поражающие млекопитающих, а также *Gammacoronavirus* и *Deltacoronavirus*, инфицирующие в основном птиц. Инфекции, вызванные COV человека и животных, в основном приводят к респираторным и кишечным заболеваниям [91].

Первые описания коронавирусной инфекции у приматов были сделаны в начале 90-х гг. в Сухумском приматологическом центре, где была показана высокая инфицированность обезьян этим вирусом. Так, антитела к COV обнаруживали у разных видов обезьян (павианы гамадрилы, макаки, зеленые мартышки, гелады, лангуры, мандриллы, красные обезьян) примерно с одинаковой частотой – около 50%. Чаще всего COV выявляли методом электронной микроскопии в кишечнике (47%), поджелудочной железе (25,5%) и легких (20,8%). Было показано, что при наличии COV в легких у обезьян довольно часто наблюдается пневмония с лимфоцитарной инфильтрацией межальвеолярных перегородок, наличием многоядерных клеток и макрофагов. От больных макак резусов и павианов гамадрилов были выделены собственные штаммы COV (КВМР 281, КВМР 966, КВМР 20254, КВП 750, КВП 815), антигенно родственные штаммам COV человека (штаммы OC-43 – *Betacoronavirus* и 229E – *Alphacoronavirus*) [92].

Используя штаммы от спонтанной вспышки, удалось воспроизвести экспериментальную COV-инфекцию у макак резусов. У зараженных животных наблюдалась инфекция с длительным выделением вируса с фекалиями, а также сероконверсией. Две обезьяны из эксперимента были эвтаназированы, у одной наблюдались поражения желудочно-кишечного тракта (гастроэнтерит, дуоденит), у другой – пневмония [93].

Серия экспериментальных работ на обезьянах была посвящена вирусу SARS-CoV, вспышка которого наблюдалась в Китае в 2002 г. и более известна под названием «атипичная пневмония». Наиболее тяжело с пневмонией и поражением различных органов инфекция протекала у игрунок обыкновенных (*Callithrix jacchus*), тогда как у макак резусов, макак яванских и зеленых мартышек развивалось легкое респиратор-

[8]ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Genus: Enterovirus; 2024. Доступно на: https://ictv.global/report/chapter/picornaviridae/picornaviridae/enterovirus: (дата обращения 06.06.2024).

[9]ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Family: Coronaviridae; 2024. Доступно на: https://ictv.global/report_9th/RNApos/Nidovirales/Coronaviridae: (дата обращения 06.06.2024).

ное заболевание как после интратрахеального, так и после внутривенного введения [94–97]. Однако следует отметить, что в некоторых случаях у макак яванских после заражения происходило развитие пневмонии и респираторного дистресса [98, 99].

На обезьянах серия экспериментальных работ также была проведена по воспроизведению инфекции COVID-19, вызванной вирусом SARS-CoV-2, которой в 2020 г. Всемирная организация здравоохранения присвоила статус пандемии. Экспериментальные исследования показали, что многие виды обезьян чувствительны к SARS-CoV-2. Основные исследования были проведены на макаках резусах [100–116], макаках яванских [106, 107, 110, 116–118] и зеленых мартышках [101, 116, 119–122], кроме того, единичные исследования были проведены на свинохвостых макаках, павианах гамадрилах, павианах анубисах и обыкновенных игрунках [107, 112, 123–125].

Эти исследования сыграли важную роль в изучении патогенеза SARS-CoV-2, исследовании вакцин и терапевтических препаратов. У обезьян рода макак экспериментальная инфекция сопровождалась признаками респираторного заболевания легкой и средней тяжести с полным выздоровлением. Сравнительное экспериментальное заражение макак резусов и макак яванских показало, что наиболее восприимчивым видом являются макаки резусы. У павианов при экспериментальном заражении SARS-CoV-2 наблюдалось заболевание, аналогичное таковому у макак, однако в исследованиях на игрунках было показано, что эти животные в некоторой степени устойчивы к инфекции [107, 112].

У обезьян, как и у людей, возраст влияет на течение болезни, вызванной SARS-CoV-2. Так, в исследовании T.Z. Song и соавт. у пожилых макак резусов наблюдались более высокие титры антител и более выраженный интерстициальный рисунок на рентгенограммах, чем у молодых животных [113].

Позже были описаны спонтанные случаи инфекции SARS-CoV-2 у обезьян. Так, вирус был выявлен у равнинных горилл (*Gorilla gorilla gorilla*) в неволе после контакта с инфицированным сотрудником зоопарка Сан-Диего, не имевшим симптомов заболевания. Это стало первым подтвержденным случаем заражения SARS-CoV-2 у человекообразных обезьян [126]. Антитела к SARS-CoV-2 были также обнаружены методом ИФА у 2 из 127 (1,6%) западных равнинных горилл, содержащихся в приматологическом центре Испании, титры в положительных образцах составили 1 : 131,4 и 1 : 191,9 [127]. Следует отметить, что помимо бессимптомных случаев, в зоопарках Праги и Роттердама были зафиксированы случаи заражения SARS-CoV-2 у горилл с клиническими проявлениями – у животных отмечали усталость, сухой кашель и потерю аппетита [128, 129]. Кроме антропоидов, случаи заражения SARS-CoV-2 также были зарегистрированы и у низших обезьян – у беличьего саймири (*Saimiri sciureus*) была зафиксирована инфекция со смертельным исходом, однако роль вируса в смерти животного была не ясна [130]. Кроме того, среди низших обезьян РНК SARS-CoV-2 была также обнаружена у 16 паукообразных обезьян (*Ateles fusciceps)* в центре спасения диких животных в Эквадоре. Вирус также был обнаружен у работников, ухаживающих за этими животными, что дает основание предполагать заражение животных от сотрудников центра. Следует отметить, что вирус как у животных, так и у людей был обнаружен не только в респираторном тракте, но и в фекальных образцах [131].

Заключение

Таким образом, за последние годы были получены данные о восприимчивости разных видов обезьян к ОРВИ и роли этих вирусов в эпизоотологии животных.

Был показан межвидовой переход ОРВИ от человека к разным видам обезьян: PIV-3 (павианы анубисы), аденовируса (шимпанзе, павианы анубисы, медные прыгуны), FLU-A (обезьяны рода макак, зеленые мартышки, патасы), RV (шимпанзе), RSV (шимпанзе), SARS-CoV-2 (гориллы, саймири, паукообразные обезьяны), MPV (шимпанзе, горилла) и BOV (шимпанзе, горилла, мартышки). Это говорит о том, что данные виды приматов являются потенциальными зоонозными резервуарами для этих инфекций.

Некоторые ОРВИ у обезьян протекали с клинически выраженными симптомами: так, у шимпанзе при инфекциях, вызванных RSV, MPV и RV, были зафиксированы смертельные случаи, а у горилл инфекция SARS-CoV-2 протекала с признаками вялости, сухого кашля и потерей аппетита. У некоторых видов низших обезьян PIV-3 и аденовирусы также вызывают инфекции, сопровождающиеся выраженными клиническими симптомами и высокой смертностью, особенно у детенышей.

Обезьяны являются важной лабораторной моделью для изучения ОРВИ. Экспериментальные исследования показали, что среди высших обезьян наиболее подходящей экспериментальной моделью ОРВИ является шимпанзе, среди низших обезьян – обезьяны рода макак, африканские зеленые мартышки и обыкновенные игрунки.

Лабораторные приматы по-прежнему остаются единственной моделью для испытания классических вакцин, вакцин нового поколения, а также оценки новых способов введения вакцин против ОРВИ – интраназального и с помощью пластыря с полимерными иглами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Peltola V., Ruuskanen O. Editorial commentary: Respiratory viral infections in developing countries: common, severe, and unrecognized. *Clin. Infect. Dis*. 2008; 46(1): 58–60. https://doi.org/10.1086/524020
2. Lemaitre J., Naninck T., Delache B., Creppy J., Huber P., Holzapfel M., et al. Non-human primate models of human respiratory infections. *Mol. Immunol*. 2021; 135: 147–64. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.04.010
3. Понежева Ж.Б., Николаева С.В., Турапова А.Н., Горелов А.В. Актуальные вопросы респираторных инфекций. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2023; 13(2): 51–5. https://doi.org/10.18565/epidem.2023.13.2.51-5 https://elibrary.ru/iermkv
4. Lowenstine L.J., Osborn K.J. Respiratory system diseases of nonhuman primates. In: *Nonhuman Primates in Biomedical*

Research. Elsevier; 2012: 413–81. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381366-4.00009-2
5. Sasaki M., Ishii A., Orba Y., Thomas Y., Hang'ombe B.M., Moonga L., et al. Human parainfluenza virus type 3 in wild nonhuman primates, Zambia. *Emerg. Infect. Dis*. 2013; 19(9): 1500–3. https://doi.org/10.3201/eid1909.121404
6. Henrickson K.J. Parainfluenza viruses. *Clin. Microbiol. Rev*. 2003; 16(2): 242–64. https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.242-264.2003
7. Skiadopoulos M.H., Surman S.R., Riggs J.M., Elkins W.R., Claire M.S., Nishio M., et al. Sendai virus, a murine parainfluenza virus type 1, replicates to a level similar to human PIV1 in the upper and lower respiratory tract of African green monkeys and chimpanzees. *Virology*. 2002; 297(1): 153–60. https://doi.org/10.1006/viro.2002.1416
8. Kalter S.S., Heberling R.L., Cooke A.W., Barry J.D., Tian P.Y., Northam W.J. Viral infections of nonhuman primates. *Lab. Anim. Sci*. 1997; 47(5): 461–7.
9. Корзая Л.И., Догадов Д.И., Гончаренко А.М., Карлсен А.А., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Распространение маркёров респираторных вирусов человека среди обезьян Адлерского приматологического центра. *Вопросы вирусологии.* 2022; 66(6): 425–33. https://doi.org/10.36233/0507-4088-77 https://elibrary.ru/cbntjh
10. Догадов Д.И., Кюрегян К.К., Гончаренко А.М., Миносян А.А., Кочконян А.А., Карлсен А.А. и др. Маркеры антропонозных вирусных инфекций у зеленых мартышек, поступивших из мест естественного обитания (Танзания). *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(5): 394–403. https://doi.org/10.36233/0507-4088-188 https://elibrary.ru/awajxs
11. Jones-Engel L., Engel G.A., Schillaci M.A., Babo R., Froehlich J. Detection of antibodies to selected human pathogens among wild and pet macaques (Macaca tonkeana) in Sulawesi, Indonesia. *Am. J. Primatol*. 2001; 54(3): 171–8. https://doi.org/10.1002/ajp.1021
12. Bailly J.E., McAuliffe J.M., Durbin A.P., Elkins W.R., Collins P.L., Murphy B.R. A recombinant human parainfluenza virus type 3 (PIV3) in which the nucleocapsid N protein has been replaced by that of bovine PIV3 is attenuated in primates. *J. Virol*. 2000; 74(7): 3188–95. https://doi.org/10.1128/jvi.74.7.3188-3195.2000
13. Zhan X., Slobod K.S., Jones B.G., Sealy R.E., Takimoto T., Boyd K., et al. Sendai virus recombinant vaccine expressing a secreted, unconstrained respiratory syncytial virus fusion protein protects against RSV in cotton rats. *Int. Immunol*. 2015; 27(5): 229–36. https://doi.org/10.1093/intimm/dxu107
14. Hawthorne J.D., Lorenz D., Albrecht P. Infection of marmosets with parainfluenza virus types 1 and 3. *Infect. Immun*. 1982; 37(3): 1037–41. https://doi.org/10.1128/iai.37.3.1037-1041.1982
15. Rijsbergen L. C., Schmitz K.S., Begeman L., Drew-Bear J., Gommers L., Lamers M.M., et al. Modeling infection and tropism of human parainfluenza virus type 3 in ferrets. *mBio*. 2021; 13(1): e0383121. https://doi.org/10.1128/mbio.03831-21.
16. Mutanda L.N., Mufson M.A. Antibodies to viruses of human origin in monkeys from Uganda. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1974; 145(3): 1069–73. https://doi.org/10.3181/00379727-145-37955
17. Schillaci M.A., Jones-Engel L., Engel G.A., Kyes R.C. Exposure to human respiratory viruses among urban performing monkeys in Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2006; 75(4): 716–9.
18. Догадов Д.И., Корзая Л.И., Кюрегян К.К., Карлсен А.А., Михайлов М.И. Маркёры вирусного гепатита E (Hepeviridae, Orthohepevirus, Orthohepevirus A) у импортированных низших обезьян Старого Света. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(3): 182–8. https://doi.org/10.36233/0507-4088-34 https://elibrary.ru/xvmkmz
19. Durbin A. African green monkeys provide a useful nonhuman primate model for the study of human parainfluenza virus types-1, -2, and -3 infection. *Vaccine*. 2000; 18(22): 2462–9. https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00575-7
20. Корзая Л.И., Кебурия В.В., Гончаренко А.М., Догадов Д.И., Лапин Б.А. Маркёры вирусных инфекций у лабораторных приматов. В кн.: *Материалы второй международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии»*. Сочи; 2011: 79–88. https://elibrary.ru/xwiobb
21. Churchill A.E. The isolation of parainfluenza 3 virus from fatal cases of pneumonia in erythrocebus patas monkeys. *Br. J. Exp. Pathol.* 1963; 44(5): 529–37.
22. Hawthorne J.D., Albrecht P. Sensitive plaque neutralization assay for parainfluenza virus types 1, 2, and 3 and respiratory syncytial virus. *J. Clin. Microbiol*. 1981; 13(4): 730–7. https://doi.org/10.1128/jcm.13.4.730-737.1981
23. Komada H., Tsurudome M., Ueda M., Nishio M, Bando H., Ito Y. Isolation and characterization of monoclonal antibodies to human parainfluenza virus type 4 and their use in revealing antigenic relation between subtypes 4A and 4B. *Virology*. 1989; 171(1): 28–37. https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90507-2
24. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. In: *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Amsterdam: Elsevier; 2012.
25. Lukashok S.A., Horwitz M.S. New perspectives in adenoviruses. *Curr. Clin. Top. Infect. Dis*. 1998; 18: 286–305.
26. Benkő M., Aoki K., Arnberg N., Davison A.J., Echavarría M., Hess M., et al. ICTV virus taxonomy profile: adenoviridae 2022. *J. Gen. Virol*. 2022; 103(3): 001721. https://doi.org/10.1099/jgv.0.001721
27. Roy S., Vandenberghe L.H., Kryazhimskiy S., Grant R., Calcedo R., Yuan X., et al. Isolation and characterization of adenoviruses persistently shed from the gastrointestinal tract of non-human primates. *PLoS Pathogens.* 2009; 5(7): e1000503. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000503
28. Maluquer de Motes C., Hundesa A., Almeida F.C., Bofill-Mas S., Girones R. Isolation of a novel monkey adenovirus reveals a new phylogenetic clade in the evolutionary history of simian adenoviruses. *Virol. J.* 2011; 8: 125. https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-125
29. Xiang Z., Li Y., Cun A., Yang W., Ellenberg S., Switzer W.M., et al. Chimpanzee adenovirus antibodies in humans, sub-Saharan Africa. *Emerg. Infect. Dis*. 2006; 12(10): 1596–9. https://doi.org/10.3201/eid1210.060078
30. Ersching J., Hernandez M.I.M., Cezarotto F.S., Ferreira J.D.S., Martins A.B., William M., et al. Neutralizing antibodies to human and simian adenoviruses in humans and New-World monkeys. *Virology.* 2010; 407(1): 1–6. https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.07.043
31. Chiu C.Y., Yagi S., Lu X., Yu G., Chen E.C., Liu M., et al. A novel adenovirus species associated with an acute respiratory outbreak in a baboon colony and evidence of coincident human infection. *mBio*. 2013; 4(2): e00084-13. https://doi.org/10.1128/mBio.00084-13
32. Chen E.C., Yagi S., Kelly K.R., Mendoza S.P., Maninger N., Rosenthal A., et al. Cross-species transmission of a novel adenovirus associated with a fulminant pneumonia outbreak in a New World monkey colony. *PLoS Pathogens.* 2011; 7(8): e1002155. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002155
33. Yu G., Yagi S., Carrion R., Chen E.C., Liu M., Brasky K.M., et al. Experimental cross-species infection of common marmosets by titi monkey adenovirus. *PLoS One*. 2013; 8(7): e68558. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068558
34. Babkin I.V., Tyumentsev A.I., Tikunov A.Yu., Kurilshikov A.M., Ryabchikova E.I., Zhirakovskaya E.V., et al. Evolutionary timescale of primate bocaviruses. *Infect. Gen. Evol*. 2013; 14: 265–74. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.12.023
35. Sharp C.P., LeBreton M., Kantola K., Nana A., Le Doux Diffo J., Djoko C.F., et al. Widespread infection with homologues of human parvoviruses B19, PARV4, and human bocavirus of chimpanzees and gorillas in the wild. *J. Virol*. 2010; 84(19): 10289–96. https://doi.org/10.1128/JVI.01304-10
36. Kumakamba C., Lukusa I.N., Kingebeni P.M., N'Kawa F., Losoma J.A., Mulembakani P.M., et al. DNA indicative of human bocaviruses detected in non-human primates in the Democratic Republic of the Congo. *J. Gen. Virol*. 2018; 99(5): 676–81. https://doi.org/10.1099/jgv.0.001048
37. Morris, J. A., R. E. Blount, and R. E. Savage. 1956. Recovery of Cytopathogenic Agent from Chimpanzees with Goryza. *Experimental Biology and Medicine* 92: 544–549. https://doi.org/10.3181/00379727-92-22538.
38. Clarke C.J., Watt N.J., Meredith A., McIntyre N., Burns S.M. Respiratory syncytial virus-associated bronchopneumonia in a young chimpanzee. *J. Comp. Pathol*. 1994; 110(2): 207–12. https://doi.org/10.1016/s0021-9975(08)80191-0
39. Belshe R.B., Richardson L.S., London W.T., Sly D.L., Lorfeld J.H., Camargo E., et al. Experimental respiratory syncytial virus infection of four species of primates. *J. Med. Virol*. 1977; 1(3): 157–62. https://doi.org/10.1002/jmv.1890010302
40. Weltzin R., Traina-Dorge V., Soike K., Zhang J.Y., Mack P., Soman G., et al. Intranasal monoclonal IgA antibody to respiratory syncytial virus protects rhesus monkeys against upper and lower respiratory tract infection. *J. Infect. Dis*. 1996; 174(2): 256–61. https://doi.org/10.1093/infdis/174.2.256
41. Simoes E.A., Hayward A.R., Ponnuraj E.M., Straumanis J.P., Stenmark K.R., Wilson H.L., et al. Respiratory syncytial virus infects the Bonnet monkey, Macaca radiata. *Pediatr. Dev. Pathol*. 1999; 2(4): 316–26. https://doi.org/10.1007/s100249900129
42. McArthur-Vaughan K., Gershwin L.J. A rhesus monkey model of respiratory syncytial virus infection. *J. Med. Primatol*. 2002; 31(2):

61–73. https://doi.org/10.1034/j.1600-0684.2002.01006.x
43. Ponnuraj E.M., Hayward A.R., Raj A., Wilson H., Simoes E.A.F. Increased replication of respiratory syncytial virus (RSV) in pulmonary infiltrates is associated with enhanced histopathological disease in bonnet monkeys (Macaca radiata) pre-immunized with a formalin-inactivated RSV vaccine. *J. Gen. Virol*. 2001; 82(Pt. 11): 2663–74. https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-11-2663
44. Kakuk T.J., Soike K., Brideau R.J., Zaya R.M., Cole S.L., Zhang J.Y., et al. A human respiratory syncytial virus (RSV) primate model of enhanced pulmonary pathology induced with a formalin-inactivated RSV vaccine but not a recombinant FG subunit vaccine. *J. Infect. Dis*. 1993; 167(3): 553–61. https://doi.org/10.1093/infdis/167.3.553
45. Papin J.F., Wolf R.F., Kosanke S.D., Jenkins J.D., Moore S.N., Anderson M.P., et al. Infant baboons infected with respiratory syncytial virus develop clinical and pathological changes that parallel those of human infants. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol*. 2013; 304(8): L530–9. https://doi.org/10.1152/ajplung.00173.2012
46. Richardson L.S., Belshe R.B., Sly D.L., London W.T., Prevar D.A., Camargo E., et al. Experimental respiratory syncytial virus pneumonia in cebus monkeys. *J. Med. Virol*. 1978; 2(1): 45–59. https://doi.org/10.1002/jmv.1890020108
47. Koff W.C., Caplan F.R., Case S., Halstead S.B. Cell-mediated immune response to respiratory syncytial virus infection in owl monkeys. *Clin. Exp. Immunol*. 1983; 53(2): 272–80.
48. Taylor G. Animal models of respiratory syncytial virus infection. *Vaccine*. 2017; 35(3): 469–80. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.11.054
49. Crowe J.E., Collins P.L., London W.T., Chanock R.M., Murphy B.R. A comparison in chimpanzees of the immunogenicity and efficacy of live attenuated respiratory syncytial virus (RSV) temperature-sensitive mutant vaccines and vaccinia virus recombinants that express the surface glycoproteins of RSV. *Vaccine*. 1993; 11(14): 1395–404. https://doi.org/10.1016/0264-410X(93)90168-W
50. Crowe Jr J.E, Bui P., Davis A., Chanock R., Murphy B. A further attenuated derivative of a cold-passaged temperature-sensitive mutant of human respiratory syncytial virus retains immunogenicity and protective efficacy against wild-type challenge in seronegative chimpanzees. *Vaccine.* 1994; 12(9): 783–90. https://doi.org/10.1016/0264-410X(94)90286-0
51. Jin H., Cheng X., Traina-Dorge V.L., Park H.J., Zhou H., Soike K., et al. Evaluation of recombinant respiratory syncytial virus gene deletion mutants in African green monkeys for their potential as live attenuated vaccine candidates. *Vaccine*. 2003; 21(25-26): 3647–52. https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00426-2
52. Le Nouën C., Brock L.G., Luongo C., McCarty T., Yang L., Mehedi M., et al. Attenuation of human respiratory syncytial virus by genome-scale codon-pair deoptimization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111(36): 13169–74. https://doi.org/10.1073/pnas.1411290111
53. Jones B.G., Sealy R.E., Rudraraju R., Traina-Dorge V.L., Finneyfrock B., Cook A., et al. Sendai virus-based RSV vaccine protects African green monkeys from RSV infection. *Vaccine*. 2012; 30(5): 959–68. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.046
54. Tang R.S., MacPhail M., Schickli J.H., Kaur J., Robinson C.L., Lawlor H.A., et al. Parainfluenza virus type 3 expressing the native or soluble fusion (F) Protein of Respiratory Syncytial Virus (RSV) confers protection from RSV infection in African green monkeys. *J. Virol*. 2004; 78(20): 11198–207. https://doi.org/10.1128/JVI.78.20.11198-11207.2004
55. Eyles J.E., Johnson J.E., Megati S., Roopchand V., Cockle P.J., Weeratna R., et al. Nonreplicating vaccines can protect African green monkeys from the Memphis 37 strain of respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis*. 2013; 208(2): 319–29. https://doi.org/10.1093/infdis/jit169
56. Bates J.T., Pickens J.A., Schuster J.E., Johnson M., Tollefson S.J., Williams J.V., et al. Immunogenicity and efficacy of alphavirus-derived replicon vaccines for respiratory syncytial virus and human metapneumovirus in nonhuman primates. *Vaccine*. 2017; 34(7): 950–6. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.12.045
57. De Swart R.L., Kuiken T., Timmerman H.H., van Amerongen G., Van Den Hoogen B.G., Vos H.W., et al. Immunization of macaques with formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) induces interleukin-13-associated hypersensitivity to subsequent RSV infection. *J. Virol*. 2002; 76(22): 11561–9. https://doi.org/10.1128/jvi.76.22.11561-11569.2002
58. Richardson L.S., Belshe R.B., London W.T., Sly D.L., Prevar D.A., Camargo E., et al. Evaluation of five temperature-sensitive mutants of respiratory syncytial virus in primates: I. Viral shedding, immunologic response, and associated illness. *J. Med. Virol*. 1978; 3(2): 91–100. https://doi.org/10.1002/jmv.1890030202
59. Philippot Q., Rammaert B., Dauriat G., Daubin C., Schlemmer F., Costantini A., et al. 2024. Human metapneumovirus infection is associated with a substantial morbidity and mortality burden in adult inpatients. *Heliyon*. 2024; 10(13): e33231. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e33231
60. De Graaf M., Osterhaus A.D.M.E., Fouchier R.A.M., Holmes E.C. Evolutionary dynamics of human and avian metapneumoviruses. *J. Gen. Virol*. 2008; 89(12): 2933–42. https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/006957-0
61. Buitendijk H., Fagrouch Z., Niphuis H., Bogers W., Warren K., Verschoor E. Retrospective serology study of respiratory virus infections in captive great Apes. *Viruses*. 2014; 6(3): 1442–53. https://doi.org/10.3390/v6031442
62. Köndgen S., Kühl H., N'Goran P.K., Walsh P.D., Schenk S., Ernst N., et al. Pandemic Human viruses cause decline of endangered great Apes. *Curr. Biol*. 2008; 18(4): 260–4. https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.01.012
63. Kaur T., Singh J., Tong S., Humphrey C., Clevenger D., Tan W., et al. Descriptive epidemiology of fatal respiratory outbreaks and detection of a human-related metapneumovirus in wild chimpanzees (Pan troglodytes) at Mahale Mountains National Park, Western Tanzania. *Am. J. Primatol.* 2008; 70(8): 755–65. https://doi.org/10.1002/ajp.20565
64. Palacios G., Lowenstine L.J., Cranfield M.R., Gilardi K.V.K., Spelman L., Lukasik-Braum M. Human metapneumovirus infection in wild mountain gorillas, Rwanda. *Emerg. Infect. Dis*. 2011; 17(4): 711–3. https://doi.org/10.3201/eid1704.100883
65. Slater O.M., Terio K.A., Zhang Y., Erdman D.D., Schneider E., Kuypers J.M., et al. Human metapneumovirus infection in chimpanzees, United States. *Emerg. Infect. Dis*. 2014; 20(12): 2115–8. https://doi.org/10.3201/eid2012.140408
66. Skiadopoulos M.H., Biacchesi S., Buchholz U.J., Riggs J.M., Surman S.R., Amaro-Carambot E., et al. The two major human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically, and the fusion (f) protein is a major contributor to this antigenic relatedness. *J. Virol*. 2004; 78(13): 6927–37. https://doi.org/10.1128/JVI.78.13.6927-6937.2004
67. Kuiken T., Van Den Hoogen B.G., Van Riel D.A.J., Laman J.D., Van Amerongen G., Sprong L., et al. Experimental human metapneumovirus infection of cynomolgus macaques (Macaca fascicularis) results in virus replication in ciliated epithelial cells and pneumocytes with associated lesions throughout the respiratory tract. *Am. J. Pathol.* 2004; 164(6): 1893–900. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63750-9
68. MacPhail M., Schickli J.H., Tang R.S., Kaur J., Robinson C., Fouchier R.A.M. Identification of small-animal and primate models for evaluation of vaccine candidates for human metapneumovirus (hMPV) and implications for hMPV vaccine design. *J. Gen. Virol*. 2004; 85(6): 1655–63. https://doi.org/10.1099/vir.0.79805-0
69. Schildgen O., Simon A., Williams J. Animal models for human Metapneumovirus (HMPV) infections. *Vet. Res*. 2007; 38(1): 117–26. https://doi.org/10.1051/vetres:2006051
70. Thompson I.M., Goodman P.J., Tangen C.M., Lucia M.S., Miller G.J., Ford L.G., et al. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *N. Engl. J. Med*. 2003; 349(3): 215–24. https://doi.org/10.1056/NEJMoa030660
71. O'Brien T.C., Tauraso N.M. Antibodies to type A influenza viruses in sera from nonhuman primates. *Arch. Gesamte. Virusforsch*. 1973; 40(3): 359–65. https://doi.org/10.1007/BF01242556
72. Karlsson E.A., Engel G.A., Feeroz M.M., San S., Rompis A., Lee B.P., et al. Influenza virus infection in nonhuman primates. *Emerg. Infect. Dis*. 2012; 18(10): 1672–5. https://doi.org/10.3201/eid1810.120214
73. Bodewes R., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D. Animal models for the preclinical evaluation of candidate influenza vaccines. *Expert. Rev. Vaccines*. 2010; 9(1): 59–72. https://doi.org/10.1586/erv.09.148
74. Baskin C.R., Bielefeldt-Ohmann H., Tumpey T.M., Sabourin P.J., Long J.P., García-Sastre A., et al. Early and sustained innate immune response defines pathology and death in nonhuman primates infected by highly pathogenic influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009; 106(9): 3455–60. https://doi.org/10.1073/pnas.0813234106
75. Baskin C.R., García-Sastre A., Tumpey T.M., Bielefeldt-Ohmann H., Carter V.S., Nistal-Villán E., et al. Integration of clinical data, pathology, and cDNA microarrays in influenza virus-infected

pigtailed macaques (Macaca nemestrina). *J. Virol*. 2004; 78(19): 10420–32. https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10420-10432.2004
76. Carroll T.D., Matzinger S.R., Barro M., Fritts L., McChesney M.B., Miller C.J., et al. Alphavirus replicon-based adjuvants enhance the immunogenicity and effectiveness of Fluzone® in rhesus macaques. *Vaccine*. 2010; 29(5): 931–40. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.11.024
77. Chen Y., Deng W., Jia C., Dai X., Zhu H., Kong Q., et al. Pathological lesions and viral localization of influenza A (H5N1) virus in experimentally infected Chinese rhesus macaques: implications for pathogenesis and viral transmission. *Arch. Virol*. 2009; 154(2): 227–33. https://doi.org/10.1007/s00705-008-0277-5
78. Shinya K., Gao Y., Cilloniz C., Suzuki Y., Fujie M., Deng G., et al. Integrated clinical, pathologic, virologic, and transcriptomic analysis of H5N1 influenza virus-induced viral pneumonia in the rhesus macaque. *J. Virol*. 2012; 86(11): 6055–66. https://doi.org/10.1128/JVI.00365-12
79. Itoh Y., Ozaki H., Tsuchiya H., Okamoto K., Torii R., Sakoda Y., et al. A vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 avian influenza virus strain confers protective immunity against highly pathogenic avian influenza virus infection in cynomolgus macaques. *Vaccine*. 2008; 26(4): 562–72. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.11.031
80. Jegaskanda S., Weinfurter J.T., Friedrich T.C., Kent S.J. Antibody-dependent cellular cytotoxicity is associated with control of pandemic H1N1 influenza virus infection of macaques. *J. Virol*. 2013; 87(10): 5512–22. https://doi.org/10.1128/JVI.03030-12
81. Matzinger S.R., Carroll T.D., Fritts L., McChesney M.B., Miller C.J. Exogenous IFN-alpha administration reduces influenza a virus replication in the lower respiratory tract of rhesus macaques. *PLoS One*. 2011; 6(12): e29255. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029255
82. Rimmelzwaan G.F., Baars M., Van Amerongen G., Van Beek R., Osterhaus A.D.M.E. A single dose of an ISCOM influenza vaccine induces long-lasting protective immunity against homologous challenge infection but fails to protect cynomolgus macaques against distant drift variants of influenza A (H3N2) viruses. *Vaccine*. 2001; 20(1-2): 158–63. https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00262-6
83. Rimmelzwaan G.F., Kuiken T., Van Amerongen G., Bestebroer T.M., Fouchier R.A.M., Osterhaus A.D.M.E. Pathogenesis of influenza A (H5N1) virus infection in a primate model. *J. Virology*. 2001; 75(14): 6687–91. https://doi.org/10.1128/JVI.75.14.6687-6691.2001
84. Cillóniz C., Shinya K., Peng X., Korth M.J., Proll S.C., Aicher L.D., et al. Lethal influenza virus infection in macaques is associated with early dysregulation of inflammatory related genes. *PLoS Pathog*. 2009; 5(10): e1000604. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000604
85. Murphy B.R., Hinshaw V.S., Sly D.L., London W.T., Hosier N.T., Wood F.T., et al. Virulence of avian influenza a viruses for squirrel monkeys. *Infect. Immun*. 1982; 37(3): 1119–26. https://doi.org/10.1128/iai.37.3.1119-1126.1982
86. Mooij P., Koopman G., Mortier D., van Heteren M., Oostermeijer H., Fagrouch Z., et al. Pandemic swine-origin H1N1 influenza virus replicates to higher levels and induces more fever and acute inflammatory cytokines in cynomolgus versus rhesus monkeys and can replicate in common marmosets. *PloS One*. 2015; 10(5): e0126132. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126132
87. Jacobs S.E., Lamson D.M., George K.St., Walsh T.J. Human rhinoviruses. *Clin. Microbiol. Rev*. 2013; 26(1): 135–62. https://doi.org/10.1128/CMR.00077-12
88. Negrey J.D., Reddy R.B., Scully E.J., Phillips-Garcia S., Owens L.A., Kevin E., et al. Simultaneous outbreaks of respiratory disease in wild chimpanzees caused by distinct viruses of human origin. *Emerg. Microb. Infect*. 2019; 8(1): 139–49. https://doi.org/10.1080/22221751.2018.1563456
89. Pinto C.A., Haff R.F. Experimental infection of gibbons with rhinovirus. *Nature*. 1969; 224(526): 1310–1.
90. Martin G.V., Heath R.B. Rhinovirus infection of vervet monkeys. *Br. J. Exp. Pathol*. 1969; 50(5): 516–9.
91. V'kovski P., Kratzel A., Steiner S., Stalder H., Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol*. 2021; 19(3): 155–70. https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6
92. Гончарук Е.И., Шевцова З.В., Румель Н.Б., Крылова Р.И. Спонтанная коронавирусная инфекция у обезьян. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1994; (Прил. 1): 109–14.
93. Гончарук Е.И., Шевцова З.В., Крылова Р.И., Румель Н.Б., Стеценко В.И. Экспериментальная коронавирусная инфекция обезьян. *Микробиологический журнал (Киев)*. 1994; 56(3): 65–71.
94. Greenough T.C., Carville A., Coderre J., Somasundaran M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., et al. Pneumonitis and multi-organ system disease in common marmosets (Callithrix jacchus) infected with the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *Am. J. Pathol*. 2005; 167(2): 455–63. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62989-6
95. McAuliffe J., Vogel L., Roberts A., Fahle G., Fischer S., Shieh W.J., et al. Replication of SARS coronavirus administered into the respiratory tract of African Green, rhesus and cynomolgus monkeys. *Virology*. 2004; 330(1): 8–15. https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.09.030
96. Qin C., Wang J., Wei Q., She M., Marasco W.A., Jiang H., et al. An animal model of SARS produced by infection of *Macaca mulatta* with SARS coronavirus. *J. Pathol*. 2005; 206(3): 251–9. https://doi.org/10.1002/path.1769
97. Rowe T., Gao G., Hogan R.J., Crystal R.G., Voss T.G., Grant R.L., et al. Macaque model for severe acute respiratory syndrome. *J. Virol*. 2004; 78(20): 11401–4. https://doi.org/10.1128/JVI.78.20.11401-11404.2004
98. Kobinger G.P., Figueredo J.M., Rowe T., Zhi Y., Gao G., Sanmiguel J.C., et al. Adenovirus-based vaccine prevents pneumonia in ferrets challenged with the SARS coronavirus and stimulates robust immune responses in macaques. *Vaccine*. 2007; 25(28): 5220–31. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.04.065
99. Kuiken T., Am Fouchier R., Schutten M., Rimmelzwaan G.F., Van Amerongen G., Van Riel D., et al. Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*. 2023; 362(9380): 263–70. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13967-0
100. Aid M., Busman-Sahay K., Vidal S.J., Maliga Z., Bondoc S., Starke C., et al. Vascular disease and thrombosis in SARS-CoV-2-infected rhesus macaques. *Cell*. 2020; 183(5): 1354–66.e13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.005
101. Blair R.V., Vaccari M., Doyle-Meyers L.A., Roy C.J., Russell-Lodrigue K., Fahlberg M., et al. Acute respiratory distress in aged, SARS-CoV-2–infected African green monkeys but not rhesus macaques. *Am. J. Pathol*. 2021; 191(2): 274–82. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.10.016
102. Chandrashekar A., Liu J., Martinot A.J., McMahan K., Mercado N.B., Peter L., et al. SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. *Science*. 2020; 369(6505): 812–7. https://doi.org/10.1126/science.abc4776
103. Deng W., Bao L., Liu J., Xiao C., Liu J., Xue J., et al. Primary exposure to SARS-CoV-2 protects against reinfection in rhesus macaques. *Science*. 2020; 369(6505): 818–23. https://doi.org/10.1126/science.abc5343
104. Deng W., Bao L., Gao H., Xiang Z., Qu Y., Song Z., et al. Ocular conjunctival inoculation of SARS-CoV-2 can cause mild COVID-19 in rhesus macaques. *Nat. Commun*. 2020; 11(1): 4400. https://doi.org/10.1038/s41467-020-18149-6
105. Fahlberg M.D., Blair R.V., Doyle-Meyers L.A., Midkiff C.C., Zenere G., Russell-Lodrigue K.E., et al. Cellular events of acute, resolving or progressive COVID-19 in SARS-CoV-2 infected non-human primates. *Nat. Commun*. 2020; 11(1): 6078. https://doi.org/10.1038/s41467-020-19967-4
106. Koo B.S., Oh H., Kim G., Hwang E.H., Jung H., Lee Y., et al. Transient lymphopenia and interstitial pneumonia with endotheliitis in SARS-CoV-2-infected macaques. *J. Infect. Dis*. 2020; 222(10): 1596–600. https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa486
107. Lu S., Zhao Y., Yu W., Yang Y., Gao J., Wang J., et al. Comparison of nonhuman primates identified the suitable model for COVID-19. *Signal. Transduct. Target. Ther*. 2020; 5(1): 157. https://doi.org/10.1038/s41392-020-00269-6
108. Munster V.J., Feldmann F., Williamson B.N., Van Doremalen N., Pérez-Pérez L., Schulz J., et al. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. *Nature*. 2020; 585(7824): 268–72. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2324-7
109. Rosa B.A., Ahmed M., Singh D.K., Choreño-Parra J.A., Cole J., Jiménez-Álvarez L.A., et al. IFN signaling and neutrophil degranulation transcriptional signatures are induced during SARS-CoV-2 infection. *Commun. Biol*. 2021; 4(1): 290. https://doi.org/10.1038/s42003-021-01829-4
110. Salguero F.J., White A.D., Slack G.S., Fotheringham S.A., Bewley K.R., Gooch K.E., et al. Comparison of rhesus and cynomolgus macaques as an infection model for COVID-19. *Nat. Commun*. 2021; 12(1): 1260. https://doi.org/10.1038/s41467-021-21389-9
111. Shan C., Yao Y.F., Yang XL., Zhou YW., Gao G., Peng Y., et al. Infection with novel coronavirus (SARS-CoV-2) causes pneumonia in Rhesus macaques. *Cell Res*. 2020; 30(8): 670–7. https://doi.org/10.1038/s41422-020-0364-z

112. Singh D.K., Singh B., Ganatra S.R., Gazi M., Cole J., Thippeshappa R., et al. Responses to acute infection with SARS-CoV-2 in the lungs of rhesus macaques, baboons and marmosets. *Nat. Microbiol*. 2020; 6(1): 73–86. https://doi.org/10.1038/s41564-020-00841-4
113. Song T.Z., Zheng H.Y., Han J.B., Jin L., Yang X., Liu F.L., et al. Delayed severe cytokine storm and immune cell infiltration in SARS-CoV-2-infected aged Chinese rhesus macaques. *Zool. Res.* 2020; 41(5): 503–16. https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2020.202
114. Yu P., Qi F., Xu Y., Li F., Liu P., Liu J., et al. Age-related rhesus macaque models of COVID-19. *Animal Model Exp. Med.* 2020; 3(1): 93–7. https://doi.org/10.1002/ame2.12108
115. Zheng H., Li H., Guo L., Liang Y., Li J., Wang X., et al. Virulence and pathogenesis of SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques: A nonhuman primate model of COVID-19 progression. *PLoS Pathog*. 2020; 16(11): e1008949. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008949
116. Johnston S.C., Ricks K.M., Jay A., Raymond J.L., Rossi F., Zeng X., et al. Development of a coronavirus disease 2019 nonhuman primate model using airborne exposure. *PLoS One*. 2021; 16(2): e0246366. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246366
117. Ishigaki H., Nakayama M., Kitagawa Y., Nguyen C.T., Hayashi K., Shiohara M., et al. Neutralizing antibody-dependent and -independent immune responses against SARS-CoV-2 in cynomolgus macaques. *Virology*. 2021; 554: 97–105. https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.12.013
118. Rockx B., Kuiken T., Herfst S., Bestebroer T., Lamers M.M., Munnink B.B.O., et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science*. 2020; 368(6494): 1012–5. https://doi.org/10.1126/science.abb7314
119. Cross R.W., Agans K.N., Prasad A.N., Borisevich V., Woolsey C., Deer D.J., et al. Intranasal exposure of African green monkeys to SARS-CoV-2 results in acute phase pneumonia with shedding and lung injury still present in the early convalescence phase. *Virol. J.* 2020; 17(1): 125. https://doi.org/10.1186/s12985-020-01396-w
120. Hartman A.L., Nambulli S., McMillen C.M., White A.G., Tilston-Lunel N.L., Albe J.R., et al. SARS-CoV-2 infection of African green monkeys results in mild respiratory disease discernible by PET/CT imaging and shedding of infectious virus from both respiratory and gastrointestinal tracts. *PLoS Pathog.* 2020; 16(9): e1008903. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008903
121. Speranza E., Williamson B.N., Feldmann F., Sturdevant G.L., Pérez-Pérez L., Meade-White K., et al. Single-cell RNA sequencing reveals SARS-CoV-2 infection dynamics in lungs of African green monkeys. *Sci. Transl. Med.* 2021; 13(578): eabe8146. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abe8146.
122. Woolsey C., Borisevich V., Prasad A.N., Agans K.N., Deer D.J., Dobias N.S., et al. Establishment of an African green monkey model for COVID-19 and protection against re-infection. *Nat. Immunol*. 2021; 22(1): 86–98. https://doi.org/10.1038/s41590-020-00835-8.
123. Erasmus J.H., Khandhar A.P., O'Connor M.A., Walls A.C., Hemann E.A., Murapa P., et al. An Alphavirus -derived replicon RNA vaccine induces SARS-CoV-2 neutralizing antibody and T cell responses in mice and nonhuman primates. *Sci. Transl. Med*. 2020; 12: eabc9396. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc9396
124. Tian J.H., Patel N., Haupt R., Zhou H., Weston S., Hammond H., et al. SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 immunogenicity in baboons and protection in mice. *Nat. Commun*. 2021; 12(1): 372. https://doi.org/10.1038/s41467-020-20653-8
125. Walls A.C., Fiala B., Schäfer A., Wrenn S., Pham M.N., Murphy M., et al. Elicitation of potent neutralizing antibody responses by designed protein nanoparticle vaccines for SARS-CoV-2. *Cell*. 2020; 183(5): 1367–82.e17. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.043
126. Liu Z.J., Qian X.K., Hong M.H., Zhang J.L., Li D.Y., Wang T.H., et al. Global view on virus infection in non-human primates and implications for public health and wildlife conservation. *Zool. Res*. 2021; 42(5): 626–32. https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2021.080
127. Cano-Terriza D., Beato-Benítez A., Fernández-Bastit L., Segalés J., Vergara-Alert J., Martínez-Nevado E., et al. SARS-CoV-2 in captive nonhuman primates, Spain, 2020–2023. *Emerg. Infect. Dis*. 2024; 30(6): 1253–7. https://doi.org/10.3201/eid3006.231247.
128. Dusseldorp F., Bruins-van-Sonsbeek L.G.R., Buskermolen M., Niphuis H., Dirven M., Whelan J., et al. SARS-CoV-2 in lions, gorillas and zookeepers in the Rotterdam Zoo, the Netherlands, a One Health investigation, November 2021. *Euro Surveill.* 2023; 28(28): 2200741. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.28.2200741
129. Nagy A., Stará M., Vodička R., Černíková L., Jiřincová H., Křivda V., et al. Reverse-zoonotic transmission of SARS-CoV-2 lineage alpha (B.1.1.7) to great apes and exotic felids in a zoo in the Czech Republic. *Arch. Virol*. 2022; 167(8): 1681–5. https://doi.org/10.1007/s00705-022-05469-9
130. Yaglom H.D., Roth A., Alvarez C., Corbus E., Ghai R.R., Ferguson S., et al. Detection of SARS-CoV-2 in a squirrel monkey (Saimiri sciureus): a one health investigation and response. *J. Zoo Wildl. Med.* 2024; 55(2): 471–8. https://doi.org/10.1638/2023-0052
131. Carvajal M., Saenz C., Fuentes N., Guevara R., Muñoz E., Prado-Vivar B., et al. SARS-CoV-2 infection in brown-headed spider monkeys (Ateles fusciceps) at a wildlife rescue center on the coast of Ecuador-South America. *Microbiol. Spectr*. 2024; 12(4): e0274123. https://doi.org/10.1128/spectrum.02741-23

REFERENCES

1. Peltola V., Ruuskanen O. Editorial commentary: Respiratory viral infections in developing countries: common, severe, and unrecognized. *Clin. Infect. Dis*. 2008; 46(1): 58–60. https://doi.org/10.1086/524020
2. Lemaitre J., Naninck T., Delache B., Creppy J., Huber P., Holzapfel M., et al. Non-human primate models of human respiratory infections. *Mol. Immunol*. 2021; 135: 147–64. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.04.010
3. Ponezheva Zh.B., Nikolaeva S.V., Turapova A.N., Gorelov A.V. Topical problems of respiratory infections. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy*. 2023; 13(2): 51–5. https://doi.org/10.18565/epidem.2023.13.2.51-5 https://elibrary.ru/iermkv (in Russian)
4. Lowenstine L.J., Osborn K.J. Respiratory system diseases of nonhuman primates. In: *Nonhuman Primates in Biomedical Research.* Elsevier; 2012: 413–81. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381366-4.00009-2
5. Sasaki M., Ishii A., Orba Y., Thomas Y., Hang'ombe B.M., Moonga L., et al. Human parainfluenza virus type 3 in wild nonhuman primates, Zambia. *Emerg. Infect. Dis*. 2013; 19(9): 1500–3. https://doi.org/10.3201/eid1909.121404
6. Henrickson K.J. Parainfluenza viruses. *Clin. Microbiol. Rev*. 2003; 16(2): 242–64. https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.242-264.2003
7. Skiadopoulos M.H., Surman S.R., Riggs J.M., Elkins W.R., Claire M.S., Nishio M., et al. Sendai virus, a murine parainfluenza virus type 1, replicates to a level similar to human PIV1 in the upper and lower respiratory tract of African green monkeys and chimpanzees. *Virology*. 2002; 297(1): 153–60. https://doi.org/10.1006/viro.2002.1416
8. Kalter S.S., Heberling R.L., Cooke A.W., Barry J.D., Tian P.Y., Northam W.J. Viral infections of nonhuman primates. *Lab. Anim. Sci*. 1997; 47(5): 461–7.
9. Korzaya L.I., Dogadov D.I., Goncharenko A.M., Karlsen A.A., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I. Prevalence of laboratory markers of human respiratory viruses in monkeys of Adler primate center. *Voprosy virusologii*. 2022; 66(6): 425–33. https://doi.org/10.36233/0507-4088-77 https://elibrary.ru/cbntjh (in Russian)
10. Dogadov D.I., Kyuregyan K.K., Alexandra G.M., Minosyan A.A., Kochkonyan A.A., Karlsen A.A., et al. Markers of antroponotic viral infections in vervet monkeys arrived from their natural habitat (Tanzania). *Voprosy virusologii*. 2023; 68(5): 394–403. https://doi.org/10.36233/0507-4088-188 https://elibrary.ru/awajxs (in Russian)
11. Jones-Engel L., Engel G.A., Schillaci M.A., Babo R., Froehlich J. Detection of antibodies to selected human pathogens among wild and pet macaques (Macaca tonkeana) in Sulawesi, Indonesia. *Am. J. Primatol*. 2001; 54(3): 171–8. https://doi.org/10.1002/ajp.1021
12. Bailly J.E., McAuliffe J.M., Durbin A.P., Elkins W.R., Collins P.L., Murphy B.R. A recombinant human parainfluenza virus type 3 (PIV3) in which the nucleocapsid N protein has been replaced by that of bovine PIV3 is attenuated in primates. *J. Virol*. 2000; 74(7): 3188–95. https://doi.org/10.1128/jvi.74.7.3188-3195.2000
13. Zhan X., Slobod K.S., Jones B.G., Sealy R.E., Takimoto T., Boyd K., et al. Sendai virus recombinant vaccine expressing a secreted, unconstrained respiratory syncytial virus fusion protein protects against RSV in cotton rats. *Int. Immunol*. 2015; 27(5): 229–36. https://doi.org/10.1093/intimm/dxu107
14. Hawthorne J.D., Lorenz D., Albrecht P. Infection of marmosets with parainfluenza virus types 1 and 3. *Infect. Immun*. 1982; 37(3): 1037–41. https://doi.org/10.1128/iai.37.3.1037-1041.1982
15. Rijsbergen L. C., Schmitz K.S., Begeman L., Drew-Bear J., Gommers L., Lamers M.M., et al. Modeling infection and tropism of human parainfluenza virus type 3 in ferrets. *mBio*. 2021; 13(1): e0383121. https://doi.org/10.1128/mbio.03831-21.

16. Mutanda L.N., Mufson M.A. Antibodies to viruses of human origin in monkeys from Uganda. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 1974; 145(3): 1069–73. https://doi.org/10.3181/00379727-145-37955
17. Schillaci M.A., Jones-Engel L., Engel G.A., Kyes R.C. Exposure to human respiratory viruses among urban performing monkeys in Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2006; 75(4): 716–9.
18. Dogadov D.I., Korzaya L.I., Kyuregyan K.K., Karlsen A.A., Mikhailov M.I. Markers of viral hepatitis E (Hepeviridae, Orthohepevirus, Orthohepevirus A) in the imported Old World monkeys. *Voprosy virusologii*. 2021; 66(3): 182–8. https://doi.org/10.36233/0507-4088-34 https://elibrary.ru/xvmkmz (in Russian)
19. Durbin A. African green monkeys provide a useful nonhuman primate model for the study of human parainfluenza virus types-1, -2, and -3 infection. *Vaccine*. 2000; 18(22): 2462–9. https://doi.org/10.1016/S0264-410X(99)00575-7
20. Korzaya L.I., Keburiya V.V., Goncharenko A.M., Dogadov D.I., Lapin B.A. Markers of laboratory primates' viral infections. In: *Materials of the 2nd International Scientific Conference «Fundamental and Applied Aspects of Medical Primatology» [Materialy vtoroi mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii «Fundamental'nye i prikladnye aspekty meditsinskoi primatologii»]*. Sochi; 2011: 79–88. https://elibrary.ru/xwiobb (in Russian)
21. Churchill A.E. The isolation of parainfluenza 3 virus from fatal cases of pneumonia in erythrocebus patas monkeys. *Br. J. Exp. Pathol.* 1963; 44(5): 529–37.
22. Hawthorne J.D., Albrecht P. Sensitive plaque neutralization assay for parainfluenza virus types 1, 2, and 3 and respiratory syncytial virus. *J. Clin. Microbiol*. 1981; 13(4): 730–7. https://doi.org/10.1128/jcm.13.4.730-737.1981
23. Komada H., Tsurudome M., Ueda M., Nishio M, Bando H., Ito Y. Isolation and characterization of monoclonal antibodies to human parainfluenza virus type 4 and their use in revealing antigenic relation between subtypes 4A and 4B. *Virology*. 1989; 171(1): 28–37. https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90507-2
24. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. In: *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Amsterdam: Elsevier; 2012.
25. Lukashok S.A., Horwitz M.S. New perspectives in adenoviruses. *Curr. Clin. Top. Infect. Dis*. 1998; 18: 286–305.
26. Benkő M., Aoki K., Arnberg N., Davison A.J., Echavarría M., Hess M., et al. ICTV virus taxonomy profile: adenoviridae 2022. *J. Gen. Virol*. 2022; 103(3): 001721. https://doi.org/10.1099/jgv.0.001721
27. Roy S., Vandenberghe L.H., Kryazhimskiy S., Grant R., Calcedo R., Yuan X., et al. Isolation and characterization of adenoviruses persistently shed from the gastrointestinal tract of non-human primates. *PLoS Pathogens.* 2009; 5(7): e1000503. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000503
28. Maluquer de Motes C., Hundesa A., Almeida F.C., Bofill-Mas S., Girones R. Isolation of a novel monkey adenovirus reveals a new phylogenetic clade in the evolutionary history of simian adenoviruses. *Virol. J.* 2011; 8: 125. https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-125
29. Xiang Z., Li Y., Cun A., Yang W., Ellenberg S., Switzer W.M., et al. Chimpanzee adenovirus antibodies in humans, sub-Saharan Africa. *Emerg. Infect. Dis*. 2006; 12(10): 1596–9. https://doi.org/10.3201/eid1210.060078
30. Ersching J., Hernandez M.I.M., Cezarotto F.S., Ferreira J.D.S., Martins A.B., William M., et al. Neutralizing antibodies to human and simian adenoviruses in humans and New-World monkeys. *Virology.* 2010; 407(1): 1–6. https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.07.043
31. Chiu C.Y., Yagi S., Lu X., Yu G., Chen E.C., Liu M., et al. A novel adenovirus species associated with an acute respiratory outbreak in a baboon colony and evidence of coincident human infection. *mBio*. 2013; 4(2): e00084-13. https://doi.org/10.1128/mBio.00084-13
32. Chen E.C., Yagi S., Kelly K.R., Mendoza S.P., Maninger N., Rosenthal A., et al. Cross-species transmission of a novel adenovirus associated with a fulminant pneumonia outbreak in a New World monkey colony. *PLoS Pathogens.* 2011; 7(8): e1002155. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002155
33. Yu G., Yagi S., Carrion R., Chen E.C., Liu M., Brasky K.M., et al. Experimental cross-species infection of common marmosets by titi monkey adenovirus. *PLoS One*. 2013; 8(7): e68558. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068558
34. Babkin I.V., Tyumentsev A.I., Tikunov A.Yu., Kurilshikov A.M., Ryabchikova E.I., Zhirakovskaya E.V., et al. Evolutionary time-scale of primate bocaviruses. *Infect. Gen. Evol*. 2013; 14: 265–74. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.12.023
35. Sharp C.P., LeBreton M., Kantola K., Nana A., Le Doux Diffo J., Djoko C.F., et al. Widespread infection with homologues of human parvoviruses B19, PARV4, and human bocavirus of chimpanzees and gorillas in the wild. *J. Virol*. 2010; 84(19): 10289–96. https://doi.org/10.1128/JVI.01304-10
36. Kumakamba C., Lukusa I.N., Kingebeni P.M., N'Kawa F., Losoma J.A., Mulembakani P.M., et al. DNA indicative of human bocaviruses detected in non-human primates in the Democratic Republic of the Congo. *J. Gen. Virol*. 2018; 99(5): 676–81. https://doi.org/10.1099/jgv.0.001048
37. Morris, J. A., R. E. Blount, and R. E. Savage. 1956. Recovery of Cytopathogenic Agent from Chimpanzees with Goryza. *Experimental Biology and Medicine* 92: 544–549. https://doi.org/10.3181/00379727-92-22538.
38. Clarke C.J., Watt N.J., Meredith A., McIntyre N., Burns S.M. Respiratory syncytial virus-associated bronchopneumonia in a young chimpanzee. *J. Comp. Pathol*. 1994; 110(2): 207–12. https://doi.org/10.1016/s0021-9975(08)80191-0
39. Belshe R.B., Richardson L.S., London W.T., Sly D.L., Lorfeld J.H., Camargo E., et al. Experimental respiratory syncytial virus infection of four species of primates. *J. Med. Virol*. 1977; 1(3): 157–62. https://doi.org/10.1002/jmv.1890010302
40. Weltzin R., Traina-Dorge V., Soike K., Zhang J.Y., Mack P., Soman G., et al. Intranasal monoclonal IgA antibody to respiratory syncytial virus protects rhesus monkeys against upper and lower respiratory tract infection. *J. Infect. Dis*. 1996; 174(2): 256–61. https://doi.org/10.1093/infdis/174.2.256
41. Simoes E.A., Hayward A.R., Ponnuraj E.M., Straumanis J.P., Stenmark K.R., Wilson H.L., et al. Respiratory syncytial virus infects the Bonnet monkey, Macaca radiata. *Pediatr. Dev. Pathol*. 1999; 2(4): 316–26. https://doi.org/10.1007/s100249900129
42. McArthur-Vaughan K., Gershwin L.J. A rhesus monkey model of respiratory syncytial virus infection. *J. Med. Primatol*. 2002; 31(2): 61–73. https://doi.org/10.1034/j.1600-0684.2002.01006.x
43. Ponnuraj E.M., Hayward A.R., Raj A., Wilson H., Simoes E.A.F. Increased replication of respiratory syncytial virus (RSV) in pulmonary infiltrates is associated with enhanced histopathological disease in bonnet monkeys (Macaca radiata) pre-immunized with a formalin-inactivated RSV vaccine. *J. Gen. Virol*. 2001; 82(Pt. 11): 2663–74. https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-11-2663
44. Kakuk T.J., Soike K., Brideau R.J., Zaya R.M., Cole S.L., Zhang J.Y., et al. A human respiratory syncytial virus (RSV) primate model of enhanced pulmonary pathology induced with a formalin-inactivated RSV vaccine but not a recombinant FG subunit vaccine. *J. Infect. Dis*. 1993; 167(3): 553–61. https://doi.org/10.1093/infdis/167.3.553
45. Papin J.F., Wolf R.F., Kosanke S.D., Jenkins J.D., Moore S.N., Anderson M.P., et al. Infant baboons infected with respiratory syncytial virus develop clinical and pathological changes that parallel those of human infants. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol*. 2013; 304(8): L530–9. https://doi.org/10.1152/ajplung.00173.2012
46. Richardson L.S., Belshe R.B., Sly D.L., London W.T., Prevar D.A., Camargo E., et al. Experimental respiratory syncytial virus pneumonia in cebus monkeys. *J. Med. Virol*. 1978; 2(1): 45–59. https://doi.org/10.1002/jmv.1890020108
47. Koff W.C., Caplan F.R., Case S., Halstead S.B. Cell-mediated immune response to respiratory syncytial virus infection in owl monkeys. *Clin. Exp. Immunol*. 1983; 53(2): 272–80.
48. Taylor G. Animal models of respiratory syncytial virus infection. *Vaccine*. 2017; 35(3): 469–80. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.11.054
49. Crowe J.E., Collins P.L., London W.T., Chanock R.M., Murphy B.R. A comparison in chimpanzees of the immunogenicity and efficacy of live attenuated respiratory syncytial virus (RSV) temperature-sensitive mutant vaccines and vaccinia virus recombinants that express the surface glycoproteins of RSV. *Vaccine*. 1993; 11(14): 1395–404. https://doi.org/10.1016/0264-410X(93)90168-W
50. Crowe Jr J.E, Bui P., Davis A., Chanock R., Murphy B. A further attenuated derivative of a cold-passaged temperature-sensitive mutant of human respiratory syncytial virus retains immunogenicity and protective efficacy against wild-type challenge in seronegative chimpanzees. *Vaccine.* 1994; 12(9): 783–90. https://doi.org/10.1016/0264-410X(94)90286-0
51. Jin H., Cheng X., Traina-Dorge V.L., Park H.J., Zhou H., Soike K., et al. Evaluation of recombinant respiratory syncytial virus gene deletion mutants in African green monkeys for their potential as live attenuated vaccine candidates. *Vaccine*. 2003; 21(25-26): 3647–52. https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00426-2
52. Le Nouën C., Brock L.G., Luongo C., McCarty T., Yang L., Me-

hedi M., et al. Attenuation of human respiratory syncytial virus by genome-scale codon-pair deoptimization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014; 111(36): 13169–74. https://doi.org/10.1073/pnas.1411290111
53. Jones B.G., Sealy R.E., Rudraraju R., Traina-Dorge V.L., Finneyfrock B., Cook A., et al. Sendai virus-based RSV vaccine protects African green monkeys from RSV infection. *Vaccine*. 2012; 30(5): 959–68. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.046
54. Tang R.S., MacPhail M., Schickli J.H., Kaur J., Robinson C.L., Lawlor H.A., et al. Parainfluenza virus type 3 expressing the native or soluble fusion (F) Protein of Respiratory Syncytial Virus (RSV) confers protection from RSV infection in African green monkeys. *J. Virol*. 2004; 78(20): 11198–207. https://doi.org/10.1128/JVI.78.20.11198-11207.2004
55. Eyles J.E., Johnson J.E., Megati S., Roopchand V., Cockle P.J., Weeratna R., et al. Nonreplicating vaccines can protect African green monkeys from the Memphis 37 strain of respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis*. 2013; 208(2): 319–29. https://doi.org/10.1093/infdis/jit169
56. Bates J.T., Pickens J.A., Schuster J.E., Johnson M., Tollefson S.J., Williams J.V., et al. Immunogenicity and efficacy of alphavirus-derived replicon vaccines for respiratory syncytial virus and human metapneumovirus in nonhuman primates. *Vaccine*. 2017; 34(7): 950–6. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.12.045
57. De Swart R.L., Kuiken T., Timmerman H.H., van Amerongen G., Van Den Hoogen B.G., Vos H.W., et al. Immunization of macaques with formalin-inactivated respiratory syncytial virus (RSV) induces interleukin-13-associated hypersensitivity to subsequent RSV infection. *J. Virol*. 2002; 76(22): 11561–9. https://doi.org/10.1128/jvi.76.22.11561-11569.2002
58. Richardson L.S., Belshe R.B., London W.T., Sly D.L., Prevar D.A., Camargo E., et al. Evaluation of five temperature-sensitive mutants of respiratory syncytial virus in primates: I. Viral shedding, immunologic response, and associated illness. *J. Med. Virol*. 1978; 3(2): 91–100. https://doi.org/10.1002/jmv.1890030202
59. Philippot Q., Rammaert B., Dauriat G., Daubin C., Schlemmer F., Costantini A., et al. 2024. Human metapneumovirus infection is associated with a substantial morbidity and mortality burden in adult inpatients. *Heliyon*. 2024; 10(13): e33231. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e33231
60. De Graaf M., Osterhaus A.D.M.E., Fouchier R.A.M., Holmes E.C. Evolutionary dynamics of human and avian metapneumoviruses. *J. Gen. Virol*. 2008; 89(12): 2933–42. https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/006957-0
61. Buitendijk H., Fagrouch Z., Niphuis H., Bogers W., Warren K., Verschoor E. Retrospective serology study of respiratory virus infections in captive great Apes. *Viruses*. 2014; 6(3): 1442–53. https://doi.org/10.3390/v6031442
62. Köndgen S., Kühl H., N'Goran P.K., Walsh P.D., Schenk S., Ernst N., et al. Pandemic Human viruses cause decline of endangered great Apes. *Curr. Biol*. 2008; 18(4): 260–4. https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.01.012
63. Kaur T., Singh J., Tong S., Humphrey C., Clevenger D., Tan W., et al. Descriptive epidemiology of fatal respiratory outbreaks and detection of a human-related metapneumovirus in wild chimpanzees (Pan troglodytes) at Mahale Mountains National Park, Western Tanzania. *Am. J. Primatol.* 2008; 70(8): 755–65. https://doi.org/10.1002/ajp.20565
64. Palacios G., Lowenstine L.J., Cranfield M.R., Gilardi K.V.K., Spelman L., Lukasik-Braum M. Human metapneumovirus infection in wild mountain gorillas, Rwanda. *Emerg. Infect. Dis*. 2011; 17(4): 711–3. https://doi.org/10.3201/eid1704.100883
65. Slater O.M., Terio K.A., Zhang Y., Erdman D.D., Schneider E., Kuypers J.M., et al. Human metapneumovirus infection in chimpanzees, United States. *Emerg. Infect. Dis*. 2014; 20(12): 2115–8. https://doi.org/10.3201/eid2012.140408
66. Skiadopoulos M.H., Biacchesi S., Buchholz U.J., Riggs J.M., Surman S.R., Amaro-Carambot E., et al. The two major human metapneumovirus genetic lineages are highly related antigenically, and the fusion (f) protein is a major contributor to this antigenic relatedness. *J. Virol.* 2004; 78(13): 6927–37. https://doi.org/10.1128/JVI.78.13.6927-6937.2004
67. Kuiken T., Van Den Hoogen B.G., Van Riel D.A.J., Laman J.D., Van Amerongen G., Sprong L., et al. Experimental human metapneumovirus infection of cynomolgus macaques (Macaca fascicularis) results in virus replication in ciliated epithelial cells and pneumocytes with associated lesions throughout the respiratory tract. *Am. J. Pathol.* 2004; 164(6): 1893–900. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63750-9
68. MacPhail M., Schickli J.H., Tang R.S., Kaur J., Robinson C., Fouchier R.A.M. Identification of small-animal and primate models for evaluation of vaccine candidates for human metapneumovirus (hMPV) and implications for hMPV vaccine design. *J. Gen. Virol*. 2004; 85(6): 1655–63. https://doi.org/10.1099/vir.0.79805-0
69. Schildgen O., Simon A., Williams J. Animal models for human Metapneumovirus (HMPV) infections. *Vet. Res*. 2007; 38(1): 117–26. https://doi.org/10.1051/vetres:2006051
70. Thompson I.M., Goodman P.J., Tangen C.M., Lucia M.S., Miller G.J., Ford L.G., et al. The influence of finasteride on the development of prostate cancer. *N. Engl. J. Med*. 2003; 349(3): 215–24. https://doi.org/10.1056/NEJMoa030660
71. O'Brien T.C., Tauraso N.M. Antibodies to type A influenza viruses in sera from nonhuman primates. *Arch. Gesamte. Virusforsch*. 1973; 40(3): 359–65. https://doi.org/10.1007/BF01242556
72. Karlsson E.A., Engel G.A., Feeroz M.M., San S., Rompis A., Lee B.P., et al. Influenza virus infection in nonhuman primates. *Emerg. Infect. Dis*. 2012; 18(10): 1672–5. https://doi.org/10.3201/eid1810.120214
73. Bodewes R., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D. Animal models for the preclinical evaluation of candidate influenza vaccines. *Expert. Rev. Vaccines*. 2010; 9(1): 59–72. https://doi.org/10.1586/erv.09.148
74. Baskin C.R., Bielefeldt-Ohmann H., Tumpey T.M., Sabourin P.J., Long J.P., García-Sastre A., et al. Early and sustained innate immune response defines pathology and death in nonhuman primates infected by highly pathogenic influenza virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009; 106(9): 3455–60. https://doi.org/10.1073/pnas.0813234106
75. Baskin C.R., García-Sastre A., Tumpey T.M., Bielefeldt-Ohmann H., Carter V.S., Nistal-Villán E., et al. Integration of clinical data, pathology, and cDNA microarrays in influenza virus-infected pigtailed macaques (Macaca nemestrina). *J. Virol*. 2004; 78(19): 10420–32. https://doi.org/10.1128/JVI.78.19.10420-10432.2004
76. Carroll T.D., Matzinger S.R., Barro M., Fritts L., McChesney M.B., Miller C.J., et al. Alphavirus replicon-based adjuvants enhance the immunogenicity and effectiveness of Fluzone® in rhesus macaques. *Vaccine.* 2010; 29(5): 931–40. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.11.024
77. Chen Y., Deng W., Jia C., Dai X., Zhu H., Kong Q., et al. Pathological lesions and viral localization of influenza A (H5N1) virus in experimentally infected Chinese rhesus macaques: implications for pathogenesis and viral transmission. *Arch. Virol*. 2009; 154(2): 227–33. https://doi.org/10.1007/s00705-008-0277-5
78. Shinya K., Gao Y., Cilloniz C., Suzuki Y., Fujie M., Deng G., et al. Integrated clinical, pathologic, virologic, and transcriptomic analysis of H5N1 influenza virus-induced viral pneumonia in the rhesus macaque. *J. Virol*. 2012; 86(11): 6055–66. https://doi.org/10.1128/JVI.00365-12
79. Itoh Y., Ozaki H., Tsuchiya H., Okamoto K., Torii R., Sakoda Y., et al. A vaccine prepared from a non-pathogenic H5N1 avian influenza virus strain confers protective immunity against highly pathogenic avian influenza virus infection in cynomolgus macaques. *Vaccine*. 2008; 26(4): 562–72. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.11.031
80. Jegaskanda S., Weinfurter J.T., Friedrich T.C., Kent S.J. Antibody-dependent cellular cytotoxicity is associated with control of pandemic H1N1 influenza virus infection of macaques. *J. Virol*. 2013; 87(10): 5512–22. https://doi.org/10.1128/JVI.03030-12
81. Matzinger S.R., Carroll T.D., Fritts L., McChesney M.B., Miller C.J. Exogenous IFN-alpha administration reduces influenza a virus replication in the lower respiratory tract of rhesus macaques. *PLoS One*. 2011; 6(12): e29255. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029255
82. Rimmelzwaan G.F., Baars M., Van Amerongen G., Van Beek R., Osterhaus A.D.M.E. A single dose of an ISCOM influenza vaccine induces long-lasting protective immunity against homologous challenge infection but fails to protect cynomolgus macaques against distant drift variants of influenza A (H3N2) viruses. *Vaccine*. 2001; 20(1-2): 158–63. https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00262-6
83. Rimmelzwaan G.F., Kuiken T., Van Amerongen G., Bestebroer T.M., Fouchier R.A.M., Osterhaus A.D.M.E. Pathogenesis of influenza A (H5N1) virus infection in a primate model. *J. Virology*. 2001; 75(14): 6687–91. https://doi.org/10.1128/JVI.75.14.6687-6691.2001
84. Cillóniz C., Shinya K., Peng X., Korth M.J., Proll S.C., Aicher L.D., et al. Lethal influenza virus infection in macaques is associated with early dysregulation of inflammatory related genes. *PLoS Pathog.* 2009; 5(10): e1000604. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000604
85. Murphy B.R., Hinshaw V.S., Sly D.L., London W.T., Hosier N.T., Wood F.T., et al. Virulence of avian influenza a viruses for squirrel

monkeys. *Infect. Immun*. 1982; 37(3): 1119–26. https://doi.org/10.1128/iai.37.3.1119-1126.1982
86. Mooij P., Koopman G., Mortier D., van Heteren M., Oostermeijer H., Fagrouch Z., et al. Pandemic swine-origin H1N1 influenza virus replicates to higher levels and induces more fever and acute inflammatory cytokines in cynomolgus versus rhesus monkeys and can replicate in common marmosets. *PloS One*. 2015; 10(5): e0126132. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126132
87. Jacobs S.E., Lamson D.M., George K.St., Walsh T.J. Human rhinoviruses. *Clin. Microbiol. Rev*. 2013; 26(1): 135–62. https://doi.org/10.1128/CMR.00077-12
88. Negrey J.D., Reddy R.B., Scully E.J., Phillips-Garcia S., Owens L.A., Kevin E., et al. Simultaneous outbreaks of respiratory disease in wild chimpanzees caused by distinct viruses of human origin. *Emerg. Microb. Infect*. 2019; 8(1): 139–49. https://doi.org/10.1080/22221751.2018.1563456
89. Pinto C.A., Haff R.F. Experimental infection of gibbons with rhinovirus. *Nature*. 1969; 224(526): 1310–1.
90. Martin G.V., Heath R.B. Rhinovirus infection of vervet monkeys. *Br. J. Exp. Pathol*. 1969; 50(5): 516–9.
91. V'kovski P., Kratzel A., Steiner S., Stalder H., Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol*. 2021; 19(3): 155–70. https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6
92. Goncharuk E.I., Shevtsova Z.V., Rumel' N.B., Krylova R.I. Spontaneous coronavirus infection in monkeys. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1994; (Suppl. 1): 109–14. (in Russian)
93. Goncharuk E.I., Shevtsova Z.V., Krylova R.I., Rumel' N.B., Stetsenko V.I. The experimental coronavirus infection of monkeys. *Mikrobiologicheskii zhurnal (Kiev)*. 1994; 56(3): 65–71. (in Russian)
94. Greenough T.C., Carville A., Coderre J., Somasundaran M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., et al. Pneumonitis and multi-organ system disease in common marmosets (Callithrix jacchus) infected with the severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus. *Am. J. Pathol*. 2005; 167(2): 455–63. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)62989-6
95. McAuliffe J., Vogel L., Roberts A., Fahle G., Fischer S., Shieh W.J., et al. Replication of SARS coronavirus administered into the respiratory tract of African Green, rhesus and cynomolgus monkeys. *Virology*. 2004; 330(1): 8–15. https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.09.030
96. Qin C., Wang J., Wei Q., She M., Marasco W.A., Jiang H., et al. An animal model of SARS produced by infection of Macaca mulatta with SARS coronavirus. *J. Pathol*. 2005; 206(3): 251–9. https://doi.org/10.1002/path.1769
97. Rowe T., Gao G., Hogan R.J., Crystal R.G., Voss T.G., Grant R.L., et al. Macaque model for severe acute respiratory syndrome. *J. Virol*. 2004; 78(20): 11401–4. https://doi.org/10.1128/JVI.78.20.11401-11404.2004
98. Kobinger G.P., Figueredo J.M., Rowe T., Zhi Y., Gao G., Sanmiguel J.C., et al. Adenovirus-based vaccine prevents pneumonia in ferrets challenged with the SARS coronavirus and stimulates robust immune responses in macaques. *Vaccine*. 2007; 25(28): 5220–31. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.04.065
99. Kuiken T., Am Fouchier R., Schutten M., Rimmelzwaan G.F., Van Amerongen G., Van Riel D., et al. Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*. 2023; 362(9380): 263–70. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13967-0
100. Aid M., Busman-Sahay K., Vidal S.J., Maliga Z., Bondoc S., Starke C., et al. Vascular disease and thrombosis in SARS-CoV-2-infected rhesus macaques. *Cell*. 2020; 183(5): 1354–66.e13. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.005
101. Blair R.V., Vaccari M., Doyle-Meyers L.A., Roy C.J., Russell-Lodrigue K., Fahlberg M., et al. Acute respiratory distress in aged, SARS-CoV-2–infected African green monkeys but not rhesus macaques. *Am. J. Pathol*. 2021; 191(2): 274–82. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.10.016
102. Chandrashekar A., Liu J., Martinot A.J., McMahan K., Mercado N.B., Peter L., et al. SARS-CoV-2 infection protects against rechallenge in rhesus macaques. *Science*. 2020; 369(6505): 812–7. https://doi.org/10.1126/science.abc4776
103. Deng W., Bao L., Liu J., Xiao C., Liu J., Xue J., et al. Primary exposure to SARS-CoV-2 protects against reinfection in rhesus macaques. *Science*. 2020; 369(6505): 818–23. https://doi.org/10.1126/science.abc5343
104. Deng W., Bao L., Gao H., Xiang Z., Qu Y., Song Z., et al. Ocular conjunctival inoculation of SARS-CoV-2 can cause mild COVID-19 in rhesus macaques. *Nat. Commun*. 2020; 11(1): 4400. https://doi.org/10.1038/s41467-020-18149-6
105. Fahlberg M.D., Blair R.V., Doyle-Meyers L.A., Midkiff C.C., Zenere G., Russell-Lodrigue K.E., et al. Cellular events of acute, resolving or progressive COVID-19 in SARS-CoV-2 infected non-human primates. *Nat. Commun*. 2020; 11(1): 6078. https://doi.org/10.1038/s41467-020-19967-4
106. Koo B.S., Oh H., Kim G., Hwang E.H., Jung H., Lee Y., et al. Transient lymphopenia and interstitial pneumonia with endotheliitis in SARS-CoV-2-infected macaques. *J. Infect. Dis*. 2020; 222(10): 1596–600. https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa486
107. Lu S., Zhao Y., Yu W., Yang Y., Gao J., Wang J., et al. Comparison of nonhuman primates identified the suitable model for COVID-19. *Signal. Transduct. Target. Ther*. 2020; 5(1): 157. https://doi.org/10.1038/s41392-020-00269-6
108. Munster V.J., Feldmann F., Williamson B.N., Van Doremalen N., Pérez-Pérez L., Schulz J., et al. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. *Nature*. 2020; 585(7824): 268–72. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2324-7
109. Rosa B.A., Ahmed M., Singh D.K., Choreño-Parra J.A., Cole J., Jiménez-Álvarez L.A., et al. IFN signaling and neutrophil degranulation transcriptional signatures are induced during SARS-CoV-2 infection. *Commun. Biol*. 2021; 4(1): 290. https://doi.org/10.1038/s42003-021-01829-4
110. Salguero F.J., White A.D., Slack G.S., Fotheringham S.A., Bewley K.R., Gooch K.E., et al. Comparison of rhesus and cynomolgus macaques as an infection model for COVID-19. *Nat. Commun*. 2021; 12(1): 1260. https://doi.org/10.1038/s41467-021-21389-9
111. Shan C., Yao Y.F., Yang XL., Zhou YW., Gao G., Peng Y., et al. Infection with novel coronavirus (SARS-CoV-2) causes pneumonia in Rhesus macaques. *Cell Res*. 2020; 30(8): 670–7. https://doi.org/10.1038/s41422-020-0364-z
112. Singh D.K., Singh B., Ganatra S.R., Gazi M., Cole J., Thippeshappa R., et al. Responses to acute infection with SARS-CoV-2 in the lungs of rhesus macaques, baboons and marmosets. *Nat. Microbiol*. 2020; 6(1): 73–86. https://doi.org/10.1038/s41564-020-00841-4
113. Song T.Z., Zheng H.Y., Han J.B., Jin L., Yang X., Liu F.L., et al. Delayed severe cytokine storm and immune cell infiltration in SARS-CoV-2-infected aged Chinese rhesus macaques. *Zool. Res*. 2020; 41(5): 503–16. https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2020.202
114. Yu P., Qi F., Xu Y., Li F., Liu P., Liu J., et al. Age-related rhesus macaque models of COVID-19. *Animal Model Exp. Med*. 2020; 3(1): 93–7. https://doi.org/10.1002/ame2.12108
115. Zheng H., Li H., Guo L., Liang Y., Li J., Wang X., et al. Virulence and pathogenesis of SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques: A nonhuman primate model of COVID-19 progression. *PLoS Pathog*. 2020; 16(11): e1008949. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008949
116. Johnston S.C., Ricks K.M., Jay A., Raymond J.L., Rossi F., Zeng X., et al. Development of a coronavirus disease 2019 nonhuman primate model using airborne exposure. *PLoS One*. 2021; 16(2): e0246366. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246366
117. Ishigaki H., Nakayama M., Kitagawa Y., Nguyen C.T., Hayashi K., Shiohara M., et al. Neutralizing antibody-dependent and -independent immune responses against SARS-CoV-2 in cynomolgus macaques. *Virology*. 2021; 554: 97–105. https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.12.013
118. Rockx B., Kuiken T., Herfst S., Bestebroer T., Lamers M.M., Munnink B.B.O., et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science*. 2020; 368(6494): 1012–5. https://doi.org/10.1126/science.abb7314
119. Cross R.W., Agans K.N., Prasad A.N., Borisevich V., Woolsey C., Deer D.J., et al. Intranasal exposure of African green monkeys to SARS-CoV-2 results in acute phase pneumonia with shedding and lung injury still present in the early convalescence phase. *Virol. J*. 2020; 17(1): 125. https://doi.org/10.1186/s12985-020-01396-w
120. Hartman A.L., Nambulli S., McMillen C.M., White A.G., Tilston-Lunel N.L., Albe J.R., et al. SARS-CoV-2 infection of African green monkeys results in mild respiratory disease discernible by PET/CT imaging and shedding of infectious virus from both respiratory and gastrointestinal tracts. *PLoS Pathog*. 2020; 16(9): e1008903. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008903
121. Speranza E., Williamson B.N., Feldmann F., Sturdevant G.L., Pérez-Pérez L., Meade-White K., et al. Single-cell RNA sequencing reveals SARS-CoV-2 infection dynamics in lungs of African green monkeys. *Sci. Transl. Med*. 2021; 13(578): eabe8146. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abe8146
122. Woolsey C., Borisevich V., Prasad A.N., Agans K.N., Deer D.J., Dobias N.S., et al. Establishment of an African green monkey model

for COVID-19 and protection against re-infection. *Nat. Immunol*. 2021; 22(1): 86–98. https://doi.org/10.1038/s41590-020-00835-8
123. Erasmus J.H., Khandhar A.P., O'Connor M.A., Walls A.C., Hemann E.A., Murapa P., et al. An Alphavirus -derived replicon RNA vaccine induces SARS-CoV-2 neutralizing antibody and T cell responses in mice and nonhuman primates. *Sci. Transl. Med*. 2020; 12: eabc9396. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc9396
124. Tian J.H., Patel N., Haupt R., Zhou H., Weston S., Hammond H., et al. SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 immunogenicity in baboons and protection in mice. *Nat. Commun*. 2021; 12(1): 372. https://doi.org/10.1038/s41467-020-20653-8
125. Walls A.C., Fiala B., Schäfer A., Wrenn S., Pham M.N., Murphy M., et al. Elicitation of potent neutralizing antibody responses by designed protein nanoparticle vaccines for SARS-CoV-2. *Cell*. 2020; 183(5): 1367–82.e17. https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.043
126. Liu Z.J., Qian X.K., Hong M.H., Zhang J.L., Li D.Y., Wang T.H., et al. Global view on virus infection in non-human primates and implications for public health and wildlife conservation. *Zool. Res*. 2021; 42(5): 626–32. https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2021.080
127. Cano-Terriza D., Beato-Benítez A., Fernández-Bastit L., Segalés J., Vergara-Alert J., Martínez-Nevado E., et al. SARS-CoV-2 in captive nonhuman primates, Spain, 2020–2023. *Emerg. Infect. Dis*. 2024; 30(6): 1253–7. https://doi.org/10.3201/eid3006.231247
128. Dusseldorp F., Bruins-van-Sonsbeek L.G.R., Buskermolen M., Niphuis H., Dirven M., Whelan J., et al. SARS-CoV-2 in lions, gorillas and zookeepers in the Rotterdam Zoo, the Netherlands, a One Health investigation, November 2021. *Euro Surveill.* 2023; 28(28): 2200741. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.28.2200741
129. Nagy A., Stará M., Vodička R., Černíková L., Jiřincová H., Křivda V., et al. Reverse-zoonotic transmission of SARS-CoV-2 lineage alpha (B.1.1.7) to great apes and exotic felids in a zoo in the Czech Republic. *Arch. Virol*. 2022; 167(8): 1681–5. https://doi.org/10.1007/s00705-022-05469-9
130. Yaglom H.D., Roth A., Alvarez C., Corbus E., Ghai R.R., Ferguson S., et al. Detection of SARS-CoV-2 in a squirrel monkey (Saimiri sciureus): a one health investigation and response. *J. Zoo Wildl. Med.* 2024; 55(2): 471–8. https://doi.org/10.1638/2023-0052
131. Carvajal M., Saenz C., Fuentes N., Guevara R., Muñoz E., Prado-Vivar B., et al. SARS-CoV-2 infection in brown-headed spider monkeys (Ateles fusciceps) at a wildlife rescue center on the coast of Ecuador-South America. *Microbiol. Spectr*. 2024; 12(4): e0274123. https://doi.org/10.1128/spectrum.02741-23

Информация об авторах:

Догадов Дмитрий Игоревич✉ – канд. биол. наук, начальник лаборатории инфекционных вирусов Курчатовского комплекса медицинской приматологии НИЦ «Курчатовский институт», Сочи, Россия. E-mail: dima_loko86@mail.ru; https://orcid.org/0000-0003-1596-0509

Кюрегян Карен Каренович – д-р биол. наук, профессор РАН, заведующий лабораторией молекулярной эпидемиологии вирусных гепатитов ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия. E-mail: karen-kyuregyan@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-3599-117X

Миносян Альберт Артурович – лаборант-исследователь лаборатории инфекционных вирусов Курчатовского комплекса медицинской приматологии НИЦ «Курчатовский институт», Сочи, Россия. E-mail: malbert97@bk.ru; https://orcid.org/0009-0007-6459-1451

Гончаренко Александра Михайловна – научный сотрудник лаборатории инфекционных вирусов Курчатовского комплекса медицинской приматологии НИЦ «Курчатовский институт», Сочи, Россия. E-mail: morgan_123@rambler.ru; https://orcid.org/0000-0002-6979-9784

Шмат Елена Викторовна – канд. тех. наук, доцент, заведующая кафедрой ветеринарной медицины и ветеринарно-санитарной экспертизы Сочинского института (филиал) ФГАОУ ВО РУДН им. Патриса Лумумбы, Сочи, Россия. E-mail: shmatlena@mail.ru; https://orcid.org/0009-0007-0610-7131

Михайлов Михаил Иванович – д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных гепатитов ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, заведующий лабораторией вирусных гепатитов, ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия. E-mail: michmich2@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-6636-6801

Участие авторов: Догадов Д.И. – обзор публикаций на тему статьи, написание и научное редактирование текста; Кюрегян К.К. – обзор публикаций на тему статьи, написание и научное редактирование текста; Миносян А.А. – обзор публикаций на тему статьи, научное редактирование текста; Гончаренко А.М. – обзор публикаций на тему статьи, научное редактирование текста; Шмат Е.В. – обзор публикаций на тему статьи, научное редактирование текста; Михайлов М.И. – обзор публикаций на тему статьи, научное редактирование текста.

Поступила 14.01.2025
Принята в печать 24.02.2025
Опубликована 28.02.2025

Information about the authors:

Dmitry I. Dogadov✉ – Ph.D. (Biol.), Head of the Laboratory of Infection Virology of Kurchatov Complex of Medical Primatology, Kurchatov Institute Scientific Research Center, Sochi, Russia. E-mail: dima_loko86@mail.ru; https://orcid.org/0000-0003-1596-0509

Karen K. Kyuregyan – D.Sci. (Biol.), Professor of the RAS, Head of the Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Hepatitis Central Research Institute of Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, Russia, Leading Researcher at the Laboratory of Viral Hepatitis, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia. E-mail: karen-kyuregyan@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-3599-117X

Albert A. Minosyan – research laboratory assistant at the Laboratory of Infection Virology, Kurchatov Complex of Medical Primatology, Kurchatov Institute Scientific Research Center, Sochi, Russia. E-mail: malbert97@bk.ru; https://orcid.org/0009-0007-6459-1451

Aleksandra M. Goncharenko – researcher at the Laboratory of Infection Virology, Kurchatov Complex of Medical Primatology, Kurchatov Institute Scientific Research Center, Sochi, Russia. E-mail: morgan_123@rambler.ru; https://orcid.org/0000-0002-6979-9784

Elena V. Shmat – Ph.D. (Tech.), Associate Professor, Head of the Department of Veterinary Medicine and Veterinary-Sanitary Expertise of the Sochi Institute (branch) of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Sochi, Russia. E-mail: shmatlena@mail.ru; https://orcid.org/0009-0007-0610-7131

Mikhail I. Mikhailov – D.Sci. (Biol.), Professor, Academician of RAS, Chief Researcher at the Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Hepatitis Central Research Institute of Epidemiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Head of the Laboratory of Viral Hepatitis, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia. E-mail: michmich2@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-6636-6801

Contribution: Dogadov D.I. – review of publications on the topic of the article, writing and editing of manuscript; Kyuregyan K.K. – review of publications on the topic of the article, manuscript review and editing; Minosyan A.A. – review of publications on the topic of the article, manuscript editing; Goncharenko A.M. – review of publications on the topic of the article, manuscript editing; Shmat E.V. – review of publications on the topic of the article, text editing; Mikhailov M.I. – review of publications on the topic of the article, manuscript editing.

Received 14 January 2025
Accepted 24 February 2025
Published 28 February 2025

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-271
© НИКОЛАЕВА Л.И., СТУЧИНСКАЯ М.Д., ТЕЛЕПЕНИНА К.П., ШЕВЧЕНКО Н.Г., КУПРИЯНОВ В.В., КРАСНОСЛОБОДЦЕВ К.Г., МУКАШЕВА Е.А., ТРУШАКОВА С.В., ХЛОПОВА И.Н., КРУЖКОВА И.С., КИСТЕНЕВА Л.Б., КОЛОБУХИНА Л.В., БУРЦЕВА Е.И., 2024

Анализ ассоциации клинического течения гриппа с однонуклеотидным полиморфизмом генов, влияющих на продукцию интерферона-λ3

Николаева Л.И.✉, Стучинская М.Д., Телепенина К.П., Шевченко Н.Г., Куприянов В.В., Краснослободцев К.Г., Мукашева Е.А., Трушакова С.В., Хлопова И.Н., Кружкова И.С., Кистенева Л.Б., Колобухина Л.В., Бурцева Е.И.

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

Резюме
Введение. Предрасположенность к разному течению инфекционного процесса во многом связана с полиморфизмом генома человека, особенно генов, кодирующих белки иммунной системы. На ранних этапах гриппозной инфекции существенную роль в ограничении репликации вируса выполняют компоненты врожденного иммунитета – интерфероны I (α/β) и III (λ) типа.
Цель работы – изучить ассоциации однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) генов *IFNL3* (rs8099917 T/G) и *IFNL4* (rs12979860 C/T) с разным течением гриппозной инфекции и выявить генетические маркеры осложненного внебольничной пневмонией гриппа. Отмеченные выше гены влияют на продукцию интерферона-λ3.
Материалы и методы. Исследованы образцы от 456 пациентов с легким (n = 150), среднетяжелым (n = 173) и тяжелым (n = 133) течением гриппа. Вирусную РНК выявляли методами обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ПЦР). ОНП генов *IFNL3* (rs8099917 T/G) и *IFNL4* (rs12979860 C/T) устанавливали с помощью ПЦР. При анализе ассоциаций ОНП генов использовали программу SNPStats.
Результаты. У пациентов с генотипом C/T или T/T по гену *IFNL4* (rs12979860 C/T) чаще выявляли пневмонию, чем при генотипе C/C (ОШ 2,47 (1,31–4,63); p = 0,0044; q = 0,0059). Наличие одного аллеля T увеличивало риск развития пневмонии (ОШ 2,02 (1,05–4,02); p = 0,006; q = 0,008). При генотипе T/T риск повышался более чем в 2 раза: ОШ 2,14 (1,31–3,48). Анализ ОНП гена *IFNL3* (rs8099917 T/G) выявил более слабо выраженную ассоциацию G-аллеля с пневмонией (ОШ 1,86 (1,04–3,31); p = 0,03; q = 0,045).
Заключение. Генетическими маркерами повышенного риска внебольничной пневмонии при гриппе является наличие T-аллеля в гене *IFNL4* (rs12979860 C/T) и в меньшей значимости G-аллеля в гене *IFNL3* (rs8099917 T/G). Носители этих аллелей имеют повышенный риск развития пневмонии при гриппе, особенно в пожилом возрасте.

Ключевые слова: *грипп; пневмония; интерферон-лямбда; однонуклеотидный полиморфизм*

Для цитирования: Николаева Л.И., Стучинская М.Д., Телепенина К.П., Шевченко Н.Г., Куприянов В.В., Краснослободцев К.Г., Мукашева Е.А., Трушакова С.В., Хлопова И.Н., Кружкова И.С., Кистенева Л.Б., Колобухина Л.В., Бурцева Е.И. Анализ ассоциации клинического течения гриппа с однонуклеотидным полиморфизмом генов, влияющих на продукцию интерферона-λ3. 2025; 70(1): 25–34. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-271 EDN: https://elibrary.ru/hnrscv

Финансирование. Исследование проводилось в рамках государственного задания Минздрава России «Создание панели стандартных образцов (клинических, вирусных, бактериальных) для валидации и актуализации тест-систем, используемых в диагностике, прогнозировании течения заболевания и оценке эффективности лечения и профилактики SARS-CoV-2, гриппа и других ОРЗ».
Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.
Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ГБУЗ ИКБ № 1 (протоколы № 11/А от 16.10.2020 и № 8 от 28.12.2022).

ORIGINAL STUDY ARTICLE
DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-271

Analysis of the association of influenza clinical course with single nucleotide polymorphisms in genes affecting the interferon-λ3 production

Lyudmila I. Nikolaeva✉, Maya D. Stuchinskaya, Kristina P. Telepenina, Nadezhda G. Shevchenko, Victor V. Kuprianov, Kirill G. Krasnoslobodtsev, Evgenya A. Mukasheva, Svetlana V. Trushakova, Irina N. Khlopova, Irina S. Kruzhkova, Lidya B. Kisteneva, Lyudmila V. Kolobukhina, Elena I. Burtseva

N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Predisposition to different courses of the infectious process is largely associated with the polymorphisms in human genome, especially in genes encoding proteins of the immune system. In the early stages of influenza infection such components of innate immunity as interferons I (α/β) and III (λ) type play a significant role in limiting virus replication.

The aim of the work was to investigate associations of single nucleotide polymorphism in *IFNL3* (rs8099917 T/G) and *IFNL4* (rs12979860 C/T) genes with different course of influenza, and identify genetic markers of influenza complicated by community-acquired pneumonia. The genes noted above affect the production of interferon-λ3, which is involved in restriction of the viral replication.

Materials and methods. Samples from 456 patients with mild (n = 150), moderate (n = 173), and severe (n = 133) influenza were studied. The viral RNA was detected by reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR). Polymorphisms in *IFNL3* (rs8099917 T/G) and *IFNL4* (rs12979860 C/T) genes was detected by PCR. Statistical analysis was performed using SNPStats software.

Results. Patients with the C/T or T/T genotype of *IFNL4* gene (rs12979860 C/T) were more likely to have pneumonia than those with the C/C genotype (OR 2.47 (1.31–4.63); p = 0.0044; q = 0.0059). The presence of one T allele increased the risk of developing pneumonia (OR 2.02 (1.05–4.02); p = 0.006; q = 0.008). In the presence of the T/T genotype, the risk increased more than twofold: OR 2.14 (1.31–3.48). Analysis of the SNP of *IFNL3* gene (rs8099917 T/G) revealed a weak association of the G allele with pneumonia (OR 1.86 (1.04–3.31); p = 0.03; q = 0.045).

Conclusion. Genetic markers of increased risk of community-acquired pneumonia in influenza include the presence of the T allele in *IFNL4* gene (rs12979860 C/T) and, to a lesser extent, the G allele in *IFNL3* gene (rs8099917 T/G). Patients carrying these alleles have an increased risk of developing pneumonia, especially in old age.

Keywords: *influenza; pneumonia; interferon lambda; single nucleotide polymorphisms*

For citation: Nikolaeva L.I., Stuchinskaya M.D., Telepenina K.P., Shevchenko N.G., Kuprianov V.V., Krasnoslobodtsev K.G., Mukasheva E.A., Trushakova S.V., Khlopova I.N., Kruzhkova I.S., Kisteneva L.B., Kolobukhina L.V., Burtseva E.I. Analysis of the association of influenza clinical course with single nucleotide polymorphisms in genes affecting the interferon-λ3 production. *Problems of Virology* (*Voprosy Virusologii*). 2025; 70(1): 25–34. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-271 EDN: https://elibrary.ru/hnrscv

Funding. The study was carried out as a part of the Russian Ministry of Health state task «Creation of a panel of standard samples (clinical, viral, bacterial) for validation and updating of test systems used in diagnosis, prediction of the course of the disease and assessment of the effectiveness of treatment and prevention of SARS-CoV-2, influenza, and other acute respiratory infections».

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

Ethics approval. This study was conducted with the voluntary informed consent of the patients. The protocol of the study was approved by the Ethical Committee of the Infection Diseases Clinical Hospital No. 1 (Protocols No. 11/A of October 16, 2020 and No. 8 of December 28, 2022).

Введение

Вирусы гриппа А и В ежегодно вызывают эпидемические подъемы заболеваемости людей. Вирусы гриппа А ответственны также за эпизоотии среди птиц и некоторых видов млекопитающих. Ежегодно во всем мире регистрируют около 1 млрд случаев гриппа у людей, из которых 3–5 млн имеют тяжелое течение, количество смертельных исходов колеблется, в зависимости от сезона, от 290 до 650 тыс. случаев[1] [1]. В нашей стране ежегодно грипп и другие респираторные вирусные инфекции регистрируются в среднем у 30 млн человек, а ежегодный экономический ущерб составляет около 40 млрд рублей [2].

[1]World Health Organization. WHO launches new global influenza strategy (https://www.who.int/news/item/11-03-2019-who-launches-new-global-influenza-strategy).

Наиболее часто грипп осложняется развитием внебольничной пневмонии, которая выявляется у значительной доли госпитализированных больных и может привести к летальному исходу [3]. После окончания эпидемии гриппа в течение 2–3 мес регистрируется дополнительная (отсроченная) смертность от этой инфекции у пациентов групп риска, имеющих в анамнезе заболевания сердца, легких и ряда других органов. Экспертами рассчитано, что смертность после перенесенного гриппа может увеличиваться у лиц с хронической сердечно-сосудистой патологией в 52 раза, а при хронических легочных заболеваниях – в 120 раз [4].

Последняя пандемия гриппа, объявленная Всемирной организацией здравоохранения в 2009 г., была вызвана штаммом A(H1N1)pdm09, в структуре генома которого присутствовали гены свиного, птичьего и сезонного гриппа человека. Пандемия A(H1N1) pdm09 затронула все возрастные группы населения и имела более тяжелые последствия, чем предыдущие. В настоящее время очевидную опасность представляет птичий вирус гриппа типа А, имеющий варианты гемагглютина H5 и H7 [5]. Зарегистрированы случаи инфицирования людей этими вирусами гриппа после контакта с больными птицами, которые завершились летально в 30–50% случаев. Причинами летальных исходов при инфицировании птичьим вирусом гриппа A(H5N1) считают тропизм вируса к рецепторам тканей разных органов, его более интенсивную репликацию и гипервоспалительный иммунный ответ больных людей [5, 6].

Реакции иммунной системы человека на многие патогены и на гриппозные антигены, в частности, зависят от вариабельности (полиморфизма) генома, что обусловливает определенную предрасположенность к разному течению инфекционного процесса. В ограничении репликации вируса гриппа на ранних этапах инфекции существенную роль выполняют интерфероны (ИФН) I и III типа. Как компоненты врожденного иммунитета, они до формирования адаптивного иммунного ответа запускают продукцию цитокинов, хемокинов, стимулируют привлечение нейтрофилов, моноцитов, NK-клеток к очагу воспаления и индуцируют биосинтез внутриклеточных противовирусных белков.

ИФН III типа были идентифицированы в 2003 г. при анализе новых белков, открытых благодаря проекту «Геном человека», и классифицированы как интерлейкин (IL) 28A, IL-28B и IL-29 [7]. Впоследствии, в 2012 г., эти цитокины были переименованы по рекомендации комитета по номенклатуре при HUGO (Human Genome Organization) в ИФН-λ1 (IL-29), ИФН-λ2 (IL-28A), ИФН-λ3 (IL-28B). Установлено, что ИФН III типа вырабатываются несколько раньше ИФН I типа и обеспечивают защиту эпителия дыхательных путей [8, 9]. Рекомбинантные ИФН III типа могут эффективно ограничивать гриппозную инфекцию у лабораторных мышей [10, 11]. Показана возможность создания лекарственного препарата на основе пегилированной формы ИФН III типа для терапии вирусного респираторного заболевания COVID-19 [12].

Около гена, кодирующего ИФН-λ3, выявлены однонуклеотидные полиморфизмы (ОНП), влияющие на продукцию этого цитокина [13]. Наиболее значимыми для ряда вирусных инфекций являются ОНП, локализованные выше гена *IFNL3* (rs8099917 T/G), в интроне гена *IFNL4* (rs12979860 C/T) и в экзоне гена *IFNL4* (rs368234815 ΔG/TT) [7]. На содержание в сыворотке крови ИФН-λ3 оказывают влияние ОНП генов *IFNL3* (rs8099917 T/G) и *IFNL4* (rs12979860 C/T). С учетом всего вышеизложенного и факта, что вклад ОНП отмеченных выше генов в развитие тяжелого течения гриппа у жителей нашей страны практически не изучен, в настоящем исследовании были выбраны для анализа потенциально возможные ассоциации вариабельных локусов генов *IFNL3* (rs8099917 T/G) и *IFNL4* (rs12979860 C/T) с клиническими вариантами течения гриппозной инфекции.

Основная **цель** исследования – выявить маркеры тяжелого течения гриппа по вариабельным локусам генов *IFNL3* (rs8099917 T/G) и *IFNL4* (rs12979860 C/T).

Материалы и методы

Пациенты и группы. Биологический материал (кровь и носоглоточные смывы) был собран в период с октября 2020 г. по май 2024 г. от взрослых больных. Все пациенты имели вирусологически подтвержденный диагноз «грипп». Исследование проводили при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ГБУЗ ИКБ № 1 (протокол № 11/А от 16.10.2020 и № 8 от 28.12.2022). В 1-ю группу вошли 150 пациентов, имевших легкое течение гриппа. Возрастной диапазон – 20–84 лет, средний возраст – 44,6 года, соотношение мужчин и женщин: 46,7% к 53,3%. Во 2-ю группу включили 173 пациентов, госпитализированных со среднетяжелым гриппом без внебольничной пневмонии. Возрастной диапазон – 18–89 лет, средний возраст – 41,4 года, соотношение мужчин и женщин: 46,8% к 53,2%. В 3-ю группу включили 133 пациентов, госпитализированных с тяжелым течением гриппозной инфекции и внебольничной пневмонией. Возрастной диапазон – 18–94 лет, средний возраст – 53 года, соотношение мужчин и женщин: 57,1% к 42,9%. Анализируемые группы пациентов были сопоставимы по гендерному составу и по возрастному диапазону (для всех групп $p > 0,05$). Общее число пациентов составило 456 человек (226 мужчин и 230 женщин), что позволило получить статистические данные с уровнем значимости 0,05 и доверительным интервалом 4,59 [14].

Идентификацию и типирование генома вируса гриппа в носоглоточных смывах проводили методом, сочетающим обратную транскрипцию и полимеразную цепную реакцию (ПЦР), с помощью тест-систем «АмплиСенс Influenza viruses A/B», «АмплиСенс Influenza viruses A/H1-swine-FL», «АмплиСенс Influenza viruses A-тип FL», согласно рекомендациям производителя (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия).

Для анализа аллельных вариантов полиморфных зон генов *IFNL3* (rs8099917 T/G) и *IFNL4* (rs12979860

C/T) выделяли ДНК из клеток венозной крови, используя набор реагентов «Проба-Рапид-Генетика» («ДНК-технология», Россия). Определение генотипов в полиморфных зонах генов *IFNL3* (rs8099917 T/G) и *IFNL4* (rs12979860 C/T) выполняли методом ПЦР, используя набор реагентов «Иммуногенетика IL28B» («ДНК-технология», Россия).

При статистическом анализе использовали пакет программ Statistica v. 10 (StatSoft, США). Для оценки достоверности различий анализируемых параметров в группах пациентов применяли критерий χ^2 и точный метод Фишера. Для анализа ассоциации аллельных вариантов полиморфных зон генов *IFNL3* (rs8099917 T/G) и *IFNL4* (rs12979860 C/T) в разных группах пациентов использовали программу SNPStats (https://www.snpstats.net/). Группы сравнивали по 5 возможным моделям наследования: кодоминантной, доминантной, рецессивной, сверхдоминантной и лог-аддитивной. Поправку *q*-значение на множественные сравнения (для оценки вероятности отклонения нулевой гипотезы) рассчитывали, используя калькулятор https://www.sdmproject.com/utilities/?show=FDR. Для оценки значимости различий рассчитывали 95% доверительный интервал (95% ДИ, 95% CI), отношение шансов (ОШ, OR) и информационный критерий Акаике (ИКА, AIC). Различия признавали достоверными при величине $p < 0,05$.

Результаты

На 1-м этапе исследования было выполнено сравнение генетических показателей по анализируемым генам в группах пациентов, различающихся по клиническому течению гриппозной инфекции. С этой целью данные генотипирования 1-й группы (легкое течение) были сопоставлены с соответствующими показателями 2-й группы (среднетяжелое течение, **табл. 1**) и с показателями 3-й группы (тяжелое течение, **табл. 2**).

Как следует из данных табл. 1 и 2, значимых различий в частоте встречаемости отдельных генотипов в 3 сравниваемых группах, различающихся по клиническому течению гриппозной инфекции, не выявлено. Однако наблюдалось снижение доли генотипа CC (rs12979860 C/T) в гене *IFNL4* и генотипа TT (rs8099917 T/G) в гене *IFNL3* от 1-й группы к 3-й.

На следующем этапе исследования был выбран другой критерий: «есть пневмония» или «нет пневмонии», и сопоставлены генотипы групп со среднетя-

Таблица 1. Результаты анализа генотипов в полиморфных локусах генов *IFNL3* (rs8099917 T/G) и *IFNL4* (rs12979860 C/T) у пациентов с легким и среднетяжелым течением гриппа

Table 1. Results of genotype analysis in polymorphic loci of *IFNL3* (rs8099917 T/G) and *IFNL4* (rs12979860 C/T) genes in patients with mild and moderate influenza

Модель анализа Analysis model	Генотипы Genotypes	1-я группа (*n* = 150), абс. (%) 1st group (*n* = 150), abs. (%)	2-я группа (*n* = 173), абс. (%) 2nd group (*n* = 173), abs. (%)	ОШ (95% ДИ) OR (95% CI)	Значение *p* *p*-value	ИКА AIC
			Ген / Gene *IFNL4*			
Кодоминантная Codominant	C/C C/T T/T	77 (51,3) 58 (38,7) 15 (10,0)	94 (54,3) 63 (36,4) 16 (9,2)	1,00 1,12 (0,70–1,79) 1,14 (0,53–2,46)	0,86	451,8
Доминантная Dominant	C/C C/T – T/T	77 (51,3) 73 (48,7)	94 (54,3) 79 (45,7)	1,00 1,13 (0,73–1,75)	0,59	449,8
Рецессивная Recessive	C/C – C/T T/T	135 (90,0) 15 (10,0)	157 (90,8) 16 (9,2)	1,00 1,09 (0,52–2,29)	0,83	450,1
Сверхдоминантная Overdominant	C/C – T/T C/T	92 (61,3) 58 (38,7)	110 (63,6) 63 (36,4)	1,00 1,10 (0,70–1,73)	0,68	450
Лог-аддитивная Log-additive	–	–	–	1,09 (0,78–1,52)	0,61	449,9
			Ген / Gene *IFNL3*			
Кодоминантная Codominant	T/T T/G G/G	108 (72,0) 39 (26,0) 3 (2,0)	123 (71,1) 46 (26,6) 4 (2,3)	1,00 0,97 (0,59–1,59) 0,85 (0,19–3,90)	0,97	452,1
Доминантная Dominant	T/T T/G – G/G	108 (72,0) 42 (28,0)	123 (71,1) 50 (28,9)	1,00 0,96 (0,59–1,55)	0,86	450,1
Рецессивная Recessive	T/T – T/G G/G	147 (98,0) 3 (2,0)	169 (97,7) 4 (2,3)	1,00 0,86 (0,19–3,92	0,85	450,1
Сверхдоминантная Overdominant	T/T – G/G T/G	111 (74,0) 39 (26,0)	127 (73,4) 46 (26,6)	1,00 0,97 (0,59–1,59)	0,9	450,1
Лог-аддитивная Log-additive	–	–	–	0,95 (0,62–1,47)	0,83	450,1

Таблица 2. Результаты анализа генотипов в полиморфных локусах генов *IFNL3* (rs8099917 T/G) и *IFNL4* (rs12979860 C/T) у пациентов с легким и тяжелым течением гриппа

Table 2. Results of genotype analysis in polymorphic loci of *IFNL3* (rs8099917 T/G) and *IFNL4* (rs12979860 C/T) genes in patients with mild and severe influenza

Модель анализа Analysis model	Генотипы Genotyp	1-я группа (*n* = 150), абс. (%) 1st group (*n* = 150), abs. (%)	3-я группа (*n* = 133), абс. (%) 3rd group (*n* = 133), abs. (%)	ОШ (95% ДИ) OR (95% CI)	Значение *p* *p*-value	ИКА AIC
			Ген / Gene *IFNL4*			
Кодоминантная Codominant	C/C C/T T/T	77 (51,3) 58 (38,7) 15 (10,0)	61 (45,9) 53 (39,9) 19 (14,3)	1,00 1,15 (0,70–1,90) 1,60 (0,75–3,40)	0,46	395,8
Доминантная Dominant	C/C C/T – T/T	77 (51,3) 73 (48,7)	61 (45,9) 72 (54,1)	1,00 1,25 (0,78–1,99)	0,36	394,5
Рецессивная Recessive	C/C – C/T T/T	135 (90,0) 15 (10,0)	114 (85,7) 19 (14,3)	1,00 1,50 (0,73–3,09)	0,27	394,1
Сверхдоминантная Overdominant	C/C –T/T C/T	92 (61,3) 58 (38,7)	80 (60,1) 53 (39,9)	1,00 1,05 (0,65–1,69)	0,84	395,3
Лог-аддитивная Log-additive	–	–	–	1,23 (0,87–1,73)	0,23	393,9
			Ген / Gene *IFNL3*			
Кодоминантная Codominant	T/T T/G G/G	108 (72,0) 39 (26,0) 3 (2,0)	85 (63,9) 42 (31,6) 6 (4,5)	1,00 1,37 (0,81–2,30) 2,54 (0,62–10,46)	0,24	393,4
Доминантная Dominant	T/T T/G – G/G	108 (72,0) 42 (28,0)	85 (63,9) 48 (36,1)	1,00 1,45 (0,88–2,40)	0,14	393,2
Рецессивная Recessive	T/T – T/G G/G	147 (98,0) 3 (2,0)	127 (95,5) 6 (4,5)	1,00 2,31 (0,57–9,45)	0,23	393,8
Сверхдоминантная Overdominant	T/T – G/G T/G	111 (74,0) 39 (26,0)	91 (68,4) 42 (31,6)	1,00 1,31 (0,78–2,20)	0,3	394,2
Лог-аддитивная Log-additive	–	–	–	1,44 (0,93–2,23)	0,099	393,6

желым и тяжелым течением с учетом этого критерия. Но предварительно было оценено влияние возраста на развитие пневмонии. Для этого были выделены возрастные подгруппы пациентов: 1) 18–40 лет (*n* = 140), 2) 41–60 лет (*n* = 78), 3) 61–94 лет (*n* = 88). На **рисунке** представлено распределение генотипов в анализируемых локусах генов по всем возрастным подгруппам больных. Визуально заметно, что генотип CC/TT чаще выявляется у лиц без пневмонии во всех возрастных подгруппах. Появление T-аллеля изменило соотношение случаев «есть пневмония – нет пневмонии», генотип CT/TT стал чаще определяться у лиц с пневмонией старше 40 лет. При генотипе CT/TG частота случаев с пневмонией и без нее была очень близкой. Частоты обнаружения пневмонии при генотипах TT/TG и TT/GG были близкими в сравниваемых возрастных подгруппах.

Доля пациентов с пневмонией в возрастной подгруппе 18–40 лет составила 29,3% (*n* = 41), в подгруппе 41–60 лет – 51,3% (*n* = 40), а в подгруппе 61–94 лет – 60,2% (*n* = 53). Частота встречаемости пневмонии в подгруппе 18–40 лет была достоверно меньше, чем в подгруппе 41–60 лет ($p = 0{,}0021$) и в подгруппе 61–94 лет ($p < 0{,}0001$). Учитывая такое различие в обнаружении пневмонии, далее проанализировали ОНП генов *IFNL3* (rs8099917 T/G) и *IFNL4* (rs12979860 C/T) в подгруппе пациентов до 40 лет включительно (*n* = 140, пневмония у 41) и в объединенных подгруппах пациентов старше 40 лет (*n* = 166, пневмония у 93). В подгруппе 18–40 лет не обнаружено достоверных различий при анализе ОНП генов *IFNL3* (rs8099917 T/G) и *IFNL4* (rs12979860 C/T) у пациентов с пневмонией относительно участников без пневмонии (данные не приведены). Результаты аналогичного анализа пациентов в возрасте 41 года и старше для объединенных подгрупп представлены в **табл. 3**.

Из данных табл. 3 следует, что у пациентов с генотипом C/T или T/T по полиморфному локусу (rs12979860 C/T) гена *IFNL4* достоверно чаще развивалась пневмония, чем при генотипе C/C (ОШ 2,47 (1,31–4,63); $p = 0{,}0044$; $q = 0{,}0059$). Изменения риска развития пневмонии происходило при появлении одного неблагоприятного аллеля T (ОШ 2,02 (1,05–4,02); $p = 0{,}006$; $q = 0{,}008$). Лог-аддитивная модель выявила

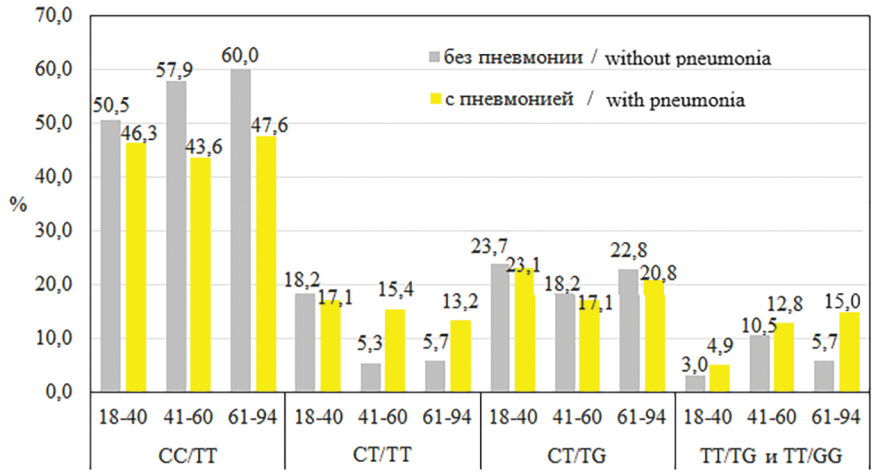

Рисунок. Распределение генотипов по локусам генов *IFNL3* (rs8099917 T/G) и *IFNL4* (rs12979860 C/T) с учетом возрастных подгрупп.

Проценты рассчитаны на всю группу. Генотип TT/TT не включен из-за малочисленности.

Figure. Distribution of genotypes by loci of the *IFNL3* (rs8099917 T/G) and *IFNL4* (rs12979860 C/T) genes, taking into account age subgroups.

The percentages are calculated for the entire group. The TT/TT genotype is not included due to the small number.

Таблица 3. Результаты анализа генотипов в полиморфных локусах генов *IFNL3* (rs8099917 T/G) и *IFNL4* (rs12979860 C/T) у пациентов от 41 года и старше

Table 3. Results of genotype analysis in polymorphic loci of *IFNL3* (rs8099917 T/G) and *IFNL4* (rs12979860 C/T) genes in patients from 41 years old and above

Модель анализа Analysis model	Генотипы Genotyp	Пациенты без пневмонии (n = 73), абс. (%) Patients without pneumonia (n = 73), abs. (%)	Пациенты с пневмонией (n = 93), абс. (%) Patients with pneumonia (n = 93), abs. (%)	ОШ (95% ДИ) OR (95% CI)	Значение p (q) p-value (q)	ИКА AIC
			Ген / Gene *IFNL4*			
Кодоминантная Codominant	C/C C/T T/T	46 (63,0) 23 (31,5) 4 (5,5)	38 (40,9) 39 (41,9) 16 (17,2)	1,00 2,02 (1,05–4,02) 4,84 (1,49–15,71)	0,006 (0,008)	223,5
Доминантная Dominant	C/C C/T – T/T	46 (63,0) 27 (37,0)	38 (40,9) 55 (59,1)	1,00 2,47 (1,31–4,63)	0,0044 (0,0059)	223,6
Рецессивная Recessive	C/C – C/T T/T	69 (94,5) 4 (5,5)	77 (82,8) 16 (17,2)	1,00 3,58 (1,14–11,24)	0,017 (0,0227)	226
Сверхдоминантная Overdominant	C/C – T/T C/T	50 (68,5) 23 (31,5)	54 (58,1) 39 (41,9)	1,00 1,57 (0,83–2,99)	0,17	229,8
Лог-аддитивная Log-additive	–	–	–	2,14 (1,31–3,48)	0,0014 (0,0019)	221,5
			Ген / Gene *IFNL3*			
Кодоминантная Codominant	T/T T/G G/G	55 (75,3) 17 (23,3) 1 (1,4)	58 (62,4) 28 (30,1) 7 (5,5)	1,00 1,56 (0,77–3,17)	0,066	228,3
Доминантная Dominant	T/T T/G – G/G	55 (75,3) 18 (24,7)	58 (62,4) 35 (37,6)	1,00 1,84 (0,94–3,63)	0,073	228,5
Рецессивная Recessive	T/T – T/G G/G	72 (98,6) 1 (1,4)	86 (92,5) 7 (7,5)	1,00 5,86 (0,70–48,76	0,049 (0,065)	227,8
Сверхдоминантная Overdominant	T/T – G/G T/G	56 (76,7) 17 (23,3)	65 (69,9) 28 (30,1)	1,00 1,42 (0,70–2,86)	0,32	230,0
Лог-аддитивная Log-additive	–	–	–	1,00 1,86 (1,04–3,31)	0,03 (0,045)	227,0

значимую достоверную связь (p = 0,0014; q = 0,0019) и показала, что два неблагоприятных аллеля увеличивали риск развития пневмонии более чем в 2 раза: ОШ 2,14 (1,31–3,48). У аллельных вариантов вариабельного локуса гена *IFNL3* (rs8099917 T/G) выявлена слабовыраженная связь G-аллеля с пневмонией (p = 0,03; q = 0,045) в лог-аддитивной модели.

Известно, что инфицирование вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 чаще приводит к тяжелому течению гриппа и развитию пневмонии. В этой связи в анализируемых группах и подгруппах было установлено содержание разных штаммов вируса гриппа. В группе со среднетяжелым и тяжелым течением наблюдались легкие различия: вирус гриппа A(H3N2) чаще выявляли в группе со среднетяжелым течением (49,1% против 40,6%), вирус гриппа A(H1N1)pdm09 чаще обнаруживали у пациентов с тяжелым течением (39,1% против 28,9%), но нигде уровень статистически значимой достоверности не был достигнут (p > 0,05). Вирус гриппа B/Victoria и один случай B/Yamagata (у пациента с пневмонией) были обнаружены с близкой частотой (22,0% против 21,8%). У пациентов старше 41 года частота встречаемости этих трех штаммов вируса также не имела достоверных различий (p = 0,0922 для A(H3N2); p = 0,1295 для A(H1N1) pdm09; p = 0,9771 для вируса гриппа B). Таким образом, штаммы вируса не могли существенно повлиять на развитие пневмонии, что важно для сравниваемых подгрупп пациентов от 41 года и старше. Установлено, что частое развитие пневмонии при инфицировании вирусом A(H1N1)pdm09 свойственно варианту вируса с мутациями, приводящими к аминокислотной замене в рецептор-связывающем сайте гемагглютинина в позиции 222, где вместо остатка аспарагиновой кислоты появляются тирозин или аспарагин [15]. Однако широкого распространения этот мутантный вариант вируса A(H1N1)pdm09 не получил.

Обсуждение

Ранее, в 2017 г., отечественные исследователи А.А. Курдин и соавт., анализируя те же гены и полиморфизмы у 100 больных гриппом со среднетяжелым и тяжелым течением и у 115 пациентов с легким течением инфекции, показали, что данные группы пациентов достоверно различались по частоте обнаружения генотипа CC (2,5% против 79,1%), CT (95,0% против 21,7%) и TT (6,5% против 0%) [16]. В нашем исследовании участвовали 456 пациентов, но подобных различий не было получено (табл. 1). А.А. Курдин и соавт. не описали метод выявления генетического полиморфизма и характеристику праймеров или наборов. В 2019 г. ученые из Ирана M. Keshavarz и соавт., изучая полиморфизм генов воспалительных цитокинов и гена *IFNL3* (rs8099917 T/G) при 80 случаях тяжелого течения гриппа и 96 случаях гриппоподобных заболеваний в иранской популяции, показали, что частота аллелей T и G в сравниваемых группах достоверных различий не имела [17]. В нашем исследовании число участников было существенно больше, популяция жителей нашей страны имеет иные генетические характеристики. Но главное то, что M. Keshavarz и соавт. сделали неудачный выбор группы сравнения. Она не была контрастной к участникам с тяжелым течением гриппа (оптимально было бы использовать группу с легким течением гриппа либо лиц, редко болеющих гриппом). В исследовании M. Keshavarz и соавт. группа сравнения была сформирована из пациентов с гриппоподобными заболеваниями.

По данным настоящего исследования, тяжелое течение гриппозной инфекции, осложненное внебольничной пневмонией, достоверно реже наблюдалось у пациентов в возрасте 18–40 лет, чем в возрастных группах от 41 года и старше. У лиц старше 60 лет наиболее часто отмечалась внебольничная пневмония. Анализ групп пациентов от 41 года и старще со среднетяжелым и тяжелым течением инфекции показал, что ассоциация с развитием пневмонии наблюдалась по аллельным вариантам гена *IFNL4* (rs12979860 C/T) и существенно слабее по вариабельному локусу гена *IFNL3* (rs8099917 T/G). Пациенты с генотипом C/C (*IFNL4,* rs12979860 C/T) достоверно реже заболевали внебольничной пневмонией, чем носители других генотипов. У пациентов с генотипом C/T достоверно чаще обнаруживали пневмонию, т.е. появление T-аллеля повышало риск развития пневмонии. Данная закономерность не распространялась на более молодых участников (18–40 лет). Известно, что в молодом возрасте оптимально функционирует врожденный и адаптивный иммунный ответ [18]. Очевидно, поэтому в группе участников от 18 до 40 лет был снижен риск развития пневмонии. У возрастных пациентов показано снижение адаптивного иммунного ответа с сохранением врожденного звена [18]. Вероятно, поэтому нам удалось обнаружить у пациентов старше 40 лет ассоциацию ОНП генов *IFNL4* (rs12979860 C/T) и *IFNL3* (rs8099917 T/G), влияющих на экспрессию ИФН-λ3, с развитием пневмонии при гриппозной инфекции. По данным представленного исследования, генетическими маркерами повышенного риска развития внебольничной пневмонии при гриппе являются наличие T-аллеля в вариабельном локусе гена *IFNL4* (rs12979860 C/T) и, в меньшей значимости, G-аллеля в полиморфном локусе гена *IFNL3* (rs8099917 T/G),

Заключение

Грипп может осложняться развитием внебольничной пневмонии, которая наиболее часто является причиной летального исхода при этой инфекции. В этой связи в настоящем исследовании был выполнен анализ ряда факторов, влияющих на развитие пневмонии при гриппозной инфекции. Одним из таких факторов является возраст. Лица старше 40 лет и особенно старше 60 лет наиболее подвержены гриппу, осложненному пневмонией, что еще раз подчеркивает необходимость ежегодной вакцинации этой группы лиц от гриппа. Главной целью представленного исследования было изучение роли полиморфизма генов врожденного иммунитета *IFNL3* (rs8099917 T/G) и *IFNL4* (rs12979860 C/T), влияющих на продукцию ИФН-λ3, в развитии пневмонии при гриппозной ин-

фекции. Было установлено, что из двух проанализированных генов наиболее значимы ОНП гена *IFNL4* (rs12979860 C/T). Показано, что у пациентов старше 41 года с генотипом C/T или T/T по полиморфному локусу гена *IFNL4* (rs12979860 C/T) достоверно чаще развивалась пневмония, чем при генотипе C/C (ОШ 2,47 (1,31–4,63); p = 0,0044; q = 0,0059). Появление одного неблагоприятного аллеля T увеличивало риск развития пневмонии (ОШ 2,02 (1,05–4,02); p = 0,006; q = 0,008). Два неблагоприятных аллеля увеличивали риск более чем в 2 раза: ОШ 2,14 (1,31–3,48); p = 0,0014; q = 0,0019. У аллельных вариантов вариабельного локуса гена *IFNL3* (rs8099917 T/G) выявлена более слабо выраженная связь G-аллеля с пневмонией (ОШ 1,86 (1,04–3,31); p = 0,03; q = 0,045). Таким образом, генетическими маркерами повышенного риска развития внебольничной пневмонии при гриппе являются наличие T-аллеля в вариабельном локусе гена *IFNL4* (rs12979860 C/T) и, в меньшей значимости, G-аллеля в полиморфном локусе гена *IFNL3* (rs8099917 T/G). Данное исследование носит поисковый характер и направлено на развитие базы генетических маркеров для персонифицированной предиктивной и профилактической медицины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Iuliano A.D., Roguski K.M., Chang H.H., Muscatello D.J., Palekar R., Tempia S., et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet*. 2018; 391(10127): 1285–300. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)33293-2
2. Острые респираторные вирусные заболевания у взрослых: Клинические рекомендации. Национальное научное общество инфекционистов; 2014. Available at: https://library.mededtech.ru/rest/documents/ORVI_adult/
3. Исаков В.А. Клинико-патогенетические аспекты тяжелого гриппа. *Аллергология и иммунология*. 2002; 3(1): 136–44. https://elibrary.ru/xvrzmd
4. Покровский В.И., Семенов Б.Ф. Концепция отсроченной смерти при гриппе и тактика вакцинопрофилактики инфарктов, инсультов и летальных исходов этой инфекции. *Российский медицинский журнал.* 2003; 11(22): 1266–72. https://elibrary.ru/weoptp
5. Shi J., Zeng X., Cui P., Yan C., Chen H. Alarming situation of emerging H5 and H7 avian influenza and effective control strategies. *Emerg. Microbes Infect*. 2023; 12(1): 2155072. https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2155072
6. de Jong M.D., Simmons C.P., Thanh T.T., Hien V.M., Smith G.J., Chau T.N., et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat. Med*. 2006; 12(10): 1203–7. https://doi.org/10.1038/nm1477
7. Николаева Л.И., Сапронов Г.В., Куприянов В.В. Инфекционные болезни. Роль интерферонов-лямбда в иммунной защите от гриппа. *Инфекционные болезни*. 2019; 17(1): 86–92. https://doi.org/10.20953/1729-9225-2019-1-86-92 https://elibrary.ru/dcfhfp
8. Klinkhammer J., Schnepf D., Ye L., Schwaderlapp M., Gad H.H., Hartmann R., et al. IFN-λ prevents influenza virus spread from the upper airways to the lungs and limits virus transmission. *Elife*. 2018; 7: e33354. https://doi.org/10.7554/elife.33354
9. Fox J.M., Crabtree J.M., Sage L.K., Tompkins S.M., Tripp R.A. Interferon lambda upregulates IDO1 expression in respiratory epithelial cells after influenza virus infection. *J. Interferon Cytokine Res*. 2015; 35(7): 554–62. https://doi.org/10.1089/jir.2014.0052
10. Davidson S., McCabe T.M., Crotta S., Gad H.H., Hessel E.M., Beinke S., et al. IFNλ is a potent anti-influenza therapeutic without the inflammatory side effects of IFNα treatment. *EMBO Mol. Med*. 2016; 8(9): 1099–112. https://doi.org/10.15252/emmm.201606413
11. Kim S., Kim M.J., Kim C.H., Kang J.W., Shin H.K., Kim D.Y., et al. The superiority of IFN-λ as a therapeutic candidate to control acute influenza viral lung infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 2017; 56(2): 202–12. https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0174oc
12. Feld J.J., Kandel C., Biondi M.J., Kozak R.A., Zahoor M.A., Lemieux C., et al. Peginterferon lambda for the treatment of outpatients with COVID-19: a phase 2, placebo-controlled randomised trial. *Lancet Respir. Med*. 2021; 9(5): 498–510. https://doi.org/10.1016/s2213-2600(20)30566-x
13. Lazear H.M., Nice T.J., Diamond M.S. Interferon-λ: immune functions at barrier surfaces and beyond. *Immunity*. 2015; 43(1): 15–28. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.001
14. Отдельнова К.А. Определение необходимого числа наблюдений в комплексных социально-гигиенических исследованиях. В кн.: *Сборник трудов медицинского института им. Н.И. Пирогова «Комплексные социально-гигиенические исследования и клинико-социальные исследования»*. М.; 1980.
15. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Федякина И.Т., Кириллова Е.С., Трушакова С.В. и др. Вирусологические, эпидемиологические, клинические, молекулярно-генетические особенности эпидемии гриппа 2015–2016 гг.: доминирование вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в России и странах Северного полушария. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61(4): 159–65. https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-4-159-166
16. Курдин А.А., Амбалов Ю.М., Пшеничная Н.Ю. Значение полиморфизмов генов лямбда-интерферонов в патогенезе и клиническом течении гриппа и других острых респираторно-вирусных инфекций. *Главный врач Юга России.* 2017; (3): 49–50. https://elibrary.ru/yzbirt
17. Keshavarz M., Namdari H., Farahmand M., Mehrbod P., Mokhtari-Azad T., Rezaei F. Association of polymorphisms in inflammatory cytokines encoding genes with severe cases of influenza A/H1N1 and B in an Iranian population. *Virol. J*. 2019; 16(1): 79. https://doi.org/10.1186/s12985-019-1187-8
18. Парахонский А.П. Старение иммунной системы. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2011; (6-1): 73–4. https://elibrary.ru/necmtj

REFERENCES

1. Iuliano A.D., Roguski K.M., Chang H.H., Muscatello D.J., Palekar R., Tempia S., et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet*. 2018; 391(10127): 1285–300. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)33293-2
2. Acute respiratory viral diseases in adults: Clinical recommendations. National Infectious Diseases Scientific Society, 2014. Available at: https://library.mededtech.ru/rest/documents/ORVI_adult/ (in Russian)
3. Isakov V.A. Clinical and pathogenetic aspects of severe influenza. *Allergologiya i immunologiya*. 2002; 3(1): 136–44. https://elibrary.ru/xvrzmd (in Russian)
4. Pokrovskii V.I., Semenov B.F. The concept of delayed death in influenza and vaccine prevention tactics for heart attacks, strokes and deaths from this infection. *Rossiiskii meditsinskii zhurnal.* 2003; 11(22): 1266–72. https://elibrary.ru/weoptp (in Russian)
5. Shi J., Zeng X., Cui P., Yan C., Chen H. Alarming situation of emerging H5 and H7 avian influenza and effective control strategies. *Emerg. Microbes Infect*. 2023; 12(1): 2155072. https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2155072
6. de Jong M.D., Simmons C.P., Thanh T.T., Hien V.M., Smith G.J., Chau T.N., et al. Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytokinemia. *Nat. Med*. 2006; 12(10): 1203–7. https://doi.org/10.1038/nm1477
7. Nikolaeva L.I., Sapronov G.V., Kupriyanov V.V. The role of the interferons-lambda in immune protection against influenza. *Infektsionnye bolezni.* 2019; 17(1): 86–92. https://doi.org/10.20953/1729-9225-2019-1-86-92 https://elibrary.ru/dcfhfp (in Russian)
8. Klinkhammer J., Schnepf D., Ye L., Schwaderlapp M., Gad H.H., Hartmann R., et al. IFN-λ prevents influenza virus spread from the upper airways to the lungs and limits virus transmission. *Elife*. 2018; 7: e33354. https://doi.org/10.7554/elife.33354
9. Fox J.M., Crabtree J.M., Sage L.K., Tompkins S.M., Tripp R.A. Interferon lambda upregulates IDO1 expression in respiratory epithelial cells after influenza virus infection. *J. Interferon Cytokine Res*. 2015; 35(7): 554–62. https://doi.org/10.1089/jir.2014.0052

10. Davidson S., McCabe T.M., Crotta S., Gad H.H., Hessel E.M., Beinke S., et al. IFNλ is a potent anti-influenza therapeutic without the inflammatory side effects of IFNα treatment. *EMBO Mol. Med*. 2016; 8(9): 1099–112. https://doi.org/10.15252/emmm.201606413
11. Kim S., Kim M.J., Kim C.H., Kang J.W., Shin H.K., Kim D.Y., et al. The superiority of IFN-λ as a therapeutic candidate to control acute influenza viral lung infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 2017; 56(2): 202–12. https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0174oc
12. Feld J.J., Kandel C., Biondi M.J., Kozak R.A., Zahoor M.A., Lemieux C., et al. Peginterferon lambda for the treatment of outpatients with COVID-19: a phase 2, placebo-controlled randomised trial. *Lancet Respir. Med*. 2021; 9(5): 498–510. https://doi.org/10.1016/s2213-2600(20)30566-x
13. Lazear H.M., Nice T.J., Diamond M.S. Interferon-λ: immune functions at barrier surfaces and beyond. *Immunity*. 2015; 43(1): 15–28. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.07.001
14. Otdel'nova K.A. Determination of the required number of observations in complex social and hygienic studies. In: *Proceedings of N.I. Pirogov Medical Institute «Complex socio-hygienic studies and clinical and social research» [Sbornik trudov meditsinskogo instituta im. N.I. Pirogova «Kompleksnye sotsial'no-gigienicheskie issledovaniya i kliniko-sotsial'nye issledovaniya»]*. Moscow; 1980. (in Russian)
15. L'vov D.K., Burtseva E.I., Kolobukhina L.V., Fedyakina I.T., Kirillova E.S., Trushakova S.V., et al. Virological, epidemiological, clinic, and molecular genetic features of the influenza epidemic in 2015-2016: prevailing of the influenza A(H1N1)09 pdm virus in Russia and countries of the Northern hemisphere. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(4): 159–65. https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-4-159-166 (in Russian)
16. Kurdin A., Ambalov Yu., Pshenichnaya N. The importance of polymorphisms of lambda-interferon genes in pathogenesis and clinical aspects of Flua and other acute respiratory-viral infections. *Glavnyi vrach Yuga Rossii*. 2017; (3): 49–50. https://elibrary.ru/yzbirt (in Russian)
17. Keshavarz M., Namdari H., Farahmand M., Mehrbod P., Mokhtari-Azad T., Rezaei F. Association of polymorphisms in inflammatory cytokines encoding genes with severe cases of influenza A/H1N1 and B in an Iranian population. *Virol. J*. 2019; 16(1): 79. https://doi.org/10.1186/s12985-019-1187-8
18. Parakhonskii A.P. Aging of the immune system. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovanii.* 2011; (6-1): 73–4. https://elibrary.ru/necmtj (in Russian)

Информация об авторах:

Николаева Людмила Ивановна✉ – д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории генно-инженерных препаратов Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: l.i.nikolaeva@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-1323-5568

Стучинская Майя Денисовна – младший научный сотрудник лаборатории генно-инженерных препаратов Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: mayastay@mail.ru; https://orcid.org/0000-0001-8544-7482

Телепенина Кристина Павловна – лаборант-исследователь лаборатории генно-инженерных препаратов Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: telepenina_kristina@mail.ru; https://orcid.org/0009-0003-3380-5104

Шевченко Надежда Григорьевна – младший научный сотрудник лаборатории генно-инженерных препаратов Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: dr.nadya@inbox.ru; https://orcid.org/0000-0002-2486-4554

Куприянов Виктор Васильевич – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории генно-инженерных препаратов Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: vkoop@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-8602-1974

Краснослободцев Кирилл Геннадьевич – научный сотрудник лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: kkg_87@mail.ru; https://orcid.org/0000-0003-1745-9128

Мукашева Евгения Андреевна – научный сотрудник лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: musheva_evgeniya@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-5688-5309

Трушакова Светлана Викторовна – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: s.trushakova@gmail.com; https://orcid.org/0000-0002-9610-3041

Хлопова Ирина Николаевна – канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории хронических вирусных инфекций Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: khlopova.ira@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-7419-590X

Кружкова Ирина Сергеевна – научный сотрудник лаборатории респираторных вирусных инфекций с апробацией лекарственных средств Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: irina-kru@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-1983-481X

Кистенева Лидия Борисовна – д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории хронических вирусных инфекций Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: lborisovna2007@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0001-7336-409X

Колобухина Людмила Васильевна – д-р мед. наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории респираторных вирусных инфекций с апробацией лекарственных средств Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: lkolobuchina@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0001-5775-3343

Бурцева Елена Ивановна – д-р мед. наук, ведущий научные сотрудник, руководитиель лаборатории этиологии и эпидемиологии гриппа Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: elena-burtseva@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0003-2518-6801

Участие авторов: Николаева Л.И., Бурцева Е.И. – концепция и дизайн статьи; Николаева Л.И., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Мукашева Е.А., Краснослободцев К.Г. – написание текста; Шевченко Н.Г., Стучинская М.Д., Телепенина К.П., Хлопова И.Н., Кружкова И.С., Трушакова С.В. – сбор и анализ биоматериала; Николаева Л.И., Бурцева Е.И., Куприянов В.В. – литературный обзор; Николаева Л.И., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Кистенева Л.Б. – анализ данных; Николаева Л.И., Стучинская М.Д. – статистический расчет; Николаева Л.И., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В. – научное редактирование. Финальная версия статьи была утвержена всеми авторами.

Поступила 02.10.2024
Принята в печать 05.12.2024
Опубликована онлайн 28.12.2024

Information about the authors:

Lyudmila I. Nikolaeva✉ – D. Sci. in Biol., Leading Researcher of the Laboratory of Gene Engineering Products, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: l.i.nikolaeva@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-1323-5568

Maya D. Stuchinskaya – Junior Researcher of the Laboratory of Gene Engineering Products, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: mayastay@mail.ru; https://orcid.org/0000-0001-8544-7482

Kristina P. Telepenina – Researcher Assistant of the Laboratory of Gene Engineering Products, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: telepenina_kristina@mail.ru; https://orcid.org/0009-0003-3380-5104

Nadezhda G. Shevchenko – Junior Researcher of the Laboratory of Gene Engineering Products, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: dr.nadya@inbox.ru; https://orcid.org/0000-0002-2486-4554

Victor V. Kuprianov – C. Sci. in Biol., Senior Researcher of the Laboratory of Gene Engineering Products, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: vkoop@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-8602-1974

Kirill G. Krasnoslobodtsev – Researcher of the Laboratory of Influenza Etiology and Epidemiology, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: kkg_87@mail.ru; https://orcid.org/0000-0003-1745-9128

Evgenya A. Mukasheva – Researcher of the Laboratory of Influenza Etiology and Epidemiology, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: musheva_evgeniya@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-5688-5309

Svetlana V. Trushakova – C. Sci. in Biol., Senior Researcher of the Laboratory Influenza Etiology and Epidemiology, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: s.trushakova@gmail.com; https://orcid.org/0000-0002-9610-3041

Irina N. Khlopova – C. Sci. in Med., Leading Researcher of the Laboratory of Chronic Viral Infections, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: khlopova.ira@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-7419-590X

Irina S. Kruzhkova – Researcher of the Laboratory of Respiratory Viral Infection with Drug Testing, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: irina-kru@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-1983-481X

Lidya B. Kisteneva – D. Sci. in Med., Leading Researcher of the Laboratory of Chronic Viral Infections, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: lborisovna2007@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0001-7336-409X

Lyudmila V. Kolobukhina – D. Sci. in Med., Chief Researcher of Respiratory Viral Infection with Drug Testing, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: lkolobuchina@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0001-5775-3343

Elena I. Burtseva – D. Sci. in Med., Leading Researcher of the Influenza Etiology and Epidemiology, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: elena-burtseva@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0003-2518-6801

Contribution: Nikolaeva L.I., Burtseva E.I. – concept and design; Nikolaeva L.I., Burtseva E.I., Kolobukhina L.V., Mukasheva E.A., Krasnoslobodtsev K.G. – text writing; Shevchenko N.G., Stuchinskaya M.D., Telepenina K.P., Khlopova I.N., Kruzhkova I.S., Trushakova S.V. – collection and processing of material; Nikolaeva L.I., Burtseva E.I., Kupriyanov V.V. – literature review; Nikolaeva L.I., Burtseva E.I., Kolobukhina L.V., Kistineva L.B. – material analysis; Nikolaeva L.I., Stuchinskaya M.D. – statistical processing; Nikolaeva L.I., Burtseva E.I., Kolobukhina L.V. – editing. The final version of the article text has been confirmed by all authors.

Received 02 October 2024
Accepted 05 December 2024
Published online 28 December 2024

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-278
© ЧЕРНОРЫЖ Я.Ю., КОНДРАТЬЕВА В.М., МАЛКОВА А.П., САВОЧКИНА Т.Е., ЕЛИСЕЕВА О.В., ЛАТЫШЕВ О.Е., ЯКУНИН Д.Ю., ЗАЙКОВА О.Н., СЛУДНЯКОВА Е.С., ГРЕБЕННИКОВА Т.В., 2025

Доклинические исследования безопасности интраназальной вакцины на основе вирусоподобных частиц для профилактики COVID-19

Чернорыж Я.Ю.[1]✉, Кондратьева В.М.[1], Малкова А.П.[2], Савочкина Т.Е.[1], Елисеева О.В.[1], Латышев О.Е.[1], Якунин Д.Ю.[1], Зайкова О.Н.[1], Слуднякова Е.С.[1], Гребенникова Т.В.[1]

[1]ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;
[2]Институт медико-АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий» (АНО «ИМБИИТ»), 143090, г. Краснознаменск, Московская обл., Россия

Резюме
Введение. Масштабная и продолжительная пандемия новой коронавирусной инфекции (COVID-19) показала необходимость эффективной вакцинации. Наряду с иммуногенностью, безопасность является критически важным вопросом для вакцин, поскольку общественное доверие может способствовать успеху или провалу программ иммунизации. В рамках доклинических исследований мы оценили безопасность вакцины на основе вирусоподобных частиц (Virus-like particles, VLP) на мышах и крысах.
Цель – оценить токсичность (острую и субхроническую) и местную переносимость четырехвалентной вакцины против COVID-19 на основе VLP для интраназального введения в соответствии с правилами надлежащей лабораторной практики.
Материалы и методы. Материалом для исследования являлись половозрелые аутбредные мыши (30 самцов и 30 самок), половозрелые аутбредные крысы (45 самцов и 45 самок). Проводили оценку следующих показателей: физиологических, морфометрических и гистологических; общий и биохимический анализ крови и клинический анализ мочи.
Результаты. Не было зарегистрировано ни гибели, ни клинической картины интоксикации при исследовании на мышах острой токсичности, все показатели были в пределах физиологической нормы. При исследовании на крысах субхронической токсичности не отмечалось изменений в общем состоянии, поведении, не было гибели животных. Структура внутренних органов, показатели клинических и биохимических анализов крови, гемостаза и анализа мочи достоверно не различались между группами и не выходили за пределы нормы. При визуальной оценке, цитологическом и гистологическом анализе места введения вакцины не было выявлено местно-раздражающего действия.
Заключение. Четырехвалентная VLP-вакцина для профилактики COVID-19 безопасна, о чем свидетельствуют полученные результаты доклинических исследований, интраназальное введение не оказывает негативного влияния на функцию различных органов, уровень клеточных и биохимических биомаркеров в крови и моче мышей и крыс. В месте введения не было выявлено местно-раздражающего действия при визуальной оценке, цитологическом и гистологическом анализе.

Ключевые слова: *SARS-CoV-2; COVID-19; вирусоподобные частицы; интраназальная вакцина; безопасность; токсичность*

Для цитирования: Чернорыж Я.Ю., Кондратьева В.М., Малкова А.П., Савочкина Т.Е., Елисеева О.В., Латышев О.Е., Якунин Д.Ю., Зайкова О.Н., Слуднякова Е.С., Гребенникова Т.В. Доклинические исследования безопасности интраназальной вакцины на основе вирусоподобных частиц для профилактики COVID-19. *Вопросы вирусологии*. 2025; 70(1): 35–46. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-278 EDN: https://elibrary.ru/fzgyxe

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственной тематики Минздрава России «Разработка прототипа вакцины на основе VLP для профилактики COVID-19» (регистрационный номер 121032600024-1).
Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.
Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23.07.2010). Протокол исследования одобрен биоэтической комиссией АНО «ИМБИИТ» (Протокол № 4/2022 от 16.05.2022).

ORIGINAL STUDY ARTICLE
DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-278

Pre-clinical safety studies of intranasal virus-like particles based vaccine for prevention of COVID-19

Yana Yu. Chernoryzh[1]✉, Valeria M. Kondratieva[1], Anastasia P. Malkova[2], Tatyana E. Savochkina[1], Olesya V. Eliseeva[1], Oleg E. Latyshev[1], Dmitriy Yu. Yakunin[1], Olga N. Zaykova[1], Ekaterina S. Sludnyakova[1], Tatyana V. Grebennikova[1]

[1]N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia;
[2]Institute for Biomedical Research and Technology (IMBIIT), 143090, Krasnoznamensk, Moscow region, Russia

Abstract
Introduction. The large-scale and prolonged pandemic of the novel coronavirus disease (COVID-19) has demonstrated the need for effective vaccination. Along with immunogenicity, safety is a critical issue for vaccines, as public trust can contribute to the success or failure of immunization programs. In preclinical studies, we assessed the safety of an intranasal Virus-like particle (VLP)-based vaccine in mice and rats.
The **aim of the study** is to conduct preclinical acute and subchronic toxicity studies assessing local tolerability of an intranasal VLP vaccine against COVID-19 in accordance with good laboratory practice.
Materials and methods. Study was performed on adult outbreed mice (30 males, 30 females) and rats (45 males, 45 females). Physiological, morphometric and histological parameters, as well as general and biochemical blood tests and urine analysis were assessed.
Results. No deaths or intoxication were recorded in the acute toxicity study on mice, all parameters were within the physiological norm. In the subchronic toxicity study on rats, no changes in the general condition, behavior, or death of animals were noted. The structure of internal organs, blood and urine tests, hemostasis did not differ significantly between the groups. No local irritant effect was detected at the injection site during visual assessment, cytological and histological analysis.
Conclusion. The VLP vaccine is safe, as evidenced by the results of preclinical studies, does not negatively affect the function of various organs, the level of cellular and biochemical biomarkers in the blood and urine of mice and rats. Visual assessment, cytology and histology of the vaccine injection site did not reveal any local irritant effect.

Keywords: *SARS-CoV-2; COVID-19; Virus-like particles; intranasal vaccines; safety; toxity*

For citation: Chernoryzh Ya.Yu., Kondratieva V.M., Malkova A.P., Savochkina T.E., Eliseeva O.V., Latyshev O.E., Yakunin D.Yu., Zaykova O.N., Sludnyakova E.S., Grebennikova T.V. Pre-clinical safety studies of intranasal virus-like particles based vaccine for prevention of COVID-19. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2025; 70(1): 35–46. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-278 EDN: https://elibrary.ru/fzgyxe

Funding. The work was carried out within the framework of the State Theme of the Ministry of Health of the Russian Federation «Development of a VLP-based Vaccine Prototype for the Prevention of COVID-19» (registration number 121032600024-1).
Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.
Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the ANO «IMBIIT» (Protocol No. 4/2022 dated 16 May 2022).

Введение

Пандемия новой коронавирусной инфекции (COVID-19) привела к необходимости введения Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) режима чрезвычайной ситуации в области здравоохранения, который не отменяли более 3 лет. Несмотря на успехи глобальных мер по борьбе с распространением пандемии COVID-19, коронавирусная инфекция все еще может представлять угрозу. Это связано с постоянным появлением новых вариантов вируса SARS-CoV-2, которые возникают при накоплении мутаций в естественном процессе репликаций вируса. Для вируса SARS-CoV-2 характерна эволюция с примерной скоростью 0,0011 замены на участок в год, что соответствует примерно одной замене каждые 11 сут. В конце 2020 г. ВОЗ предложила классифицикацию новых штаммов SARS-CoV-2: 1) варианты, представляющие интерес (VOIs), – штаммы, у которых мутации привели к потенциальному увеличению тяжести заболевания вследствие снижения восприимчивости к лечению и снижения нейтрализации антителами и/или трансмиссивности из-за изменений в связывании вируса с рецепторами; 2) варианты, вызывающие озабоченность (VOCs), – штаммы с высокой трансмиссивностью, большей тяжестью заболевания и низким ответом на лечение и вакцинацию из-за отсутствия нейтрализации вырабатываемыми антителами [1]. Исследования, направленные на поиск эффективного

специфического лечения коронавирусной инфекции, не дали результатов, в лечении применяются противовирусные препараты, нацеленные на широкий спектр вирусов, включая коронавирусы, и иммуномодуляторы. Поэтому в настоящее время единственной защитой и профилактикой распространения коронавирусной инфекции является вакцинация.

Острая необходимость в вакцинации для борьбы с пандемией COVID-19 привела к разнообразию используемых платформ вакцин против COVID-19, которые представлены цельновирусными инактивированными вакцинами, белковыми субъединичными вакцинами, векторными вакцинами, вакцинами на основе ДНК и/или мРНК, и каждая имеет свои преимущества. Главный недостаток – это то, что у большинства вакцин в основе лежит формирование иммунитета только на поверхностный спайковый гликопротеин S (spike) SARS-CoV-2. Постоянные и быстрые мутации могут приводить к потере эпитопов в S-белке у новых штаммов и, следовательно, к прогнозируемому снижению нейтрализации вакциноиндуцированными антителами. Поэтому в основе подходов к разработке и оптимизации вакцин обязательно должно быть прогнозирование влияния новых VOCs, чтобы не допустить избегания или подавления иммунных ответов человека постоянно эволюционирующим вирусом.

Технология создания вакцин на основе вирусоподобных частиц (Virus-like particles, VLP) – современный и перспективный подход к созданию иммуногенных, эффективных и безопасных вакцин. VLP представляют собой самособирающиеся структурные вирусные белки, которые не содержат вирусного генома. VLP-вакцины имеют существенное преимущество по сравнению с субъединичными вакцинами, они презентуют белковые эпитопы как нативный вирус, что позволяет существенно усиливать иммунный ответ. Клинические исследования проходят 7 вакцин на основе VLP против COVID-19: LYB001 (Yantai Patronus Biotech Co Ltd), Covifenz (Medicago), NVX-CoV2373 (Novavax), VBI-2902a (VBI Vaccines Inc.), ABNCoV2 (Radboud University), RBD SARS-CoV-2 HBsAg VLP vaccine (Serum Institute of India + Accelagen Pty + SpyBiotech), SARS-CoV-2 VLP Vaccine (The Scientific and Technological Research Council of Turkey), а 19 проходят доклинические исследования[1]. Для большинства вакцин, в том числе одобренных и проходящих доклинические исследования VLP-вакцин, характерно парентеральное введение (внутримышечное или подкожное), для которого требуется соблюдение правил асептики и специально обученный персонал. Для повышения иммуногенности они применяются совместно с адъювантами различной природы, и перечисленные выше вакцины не исключение. Интраназальная иммунизация продемонстрировала многообещающую способность стимулировать секреторный иммунитет слизистых оболочек наряду с формированием гуморального и клеточного иммунного ответа, а также ряд дополнительных преимуществ, главное из которых – это простота введения и дозирования по сравнению с инъекционными формами. Защита дыхательных путей, входных ворот для вируса SARS-CoV-2, путем активации местного иммунитета слизистых оболочек является одним из главных преимуществ интраназального способа введения вакцин. По сравнению с инъекционными формами интраназальная вакцина удобна для дозирования, для проведения иммунизаций назальной вакциной не требуется специально обученный персонал, а значит, исключается нехватка специалистов, что немаловажно в случае возникновения эпидемии и/или пандемии. Кроме того, неинвазивный метод вакцинации более привлекателен для людей, а особенно для лиц с трипанофобией, что значительно расширяет круг пациентов, согласных на иммунизацию.

Четырехвалентная интраназальная VLP-вакцина против COVID-19 представляет собой смесь из 4 структурных белков SARS-CoV-2 (S, M, N, E), синтезированных в бакуловирусной системе экспрессии, очищенных и гомогенизированных. VLP имитируют вирион SARS-CoV-2, при этом не содержат нуклеиновых кислот, а следовательно, не размножаются в организме. Главным иммуногенным белком является S-белок SARS-CoV-2, при этом в составе вакцины используются VLP, содержащие S-белок с консенсусными мутациями клайдов 19A, Alpha, Delta и Omicron. Таким образом, после иммунизации в организме будут синтезироваться антитела к штаммам данных клайдов [2, 3].

Материалы и методы

Вакцина. Состав: комплекс рекомбинантных VLP, содержащих на поверхности S-белок, клайдов 19A, Alpha, Delta, Omicron SARS-CoV-2, синтезированных в бакуловирусной системе экспрессии – 80–160 мкг; калия дигидрофосфат – 0,63 мг; динатрия гидрофосфат – 0,65 мг; натрия хлорид – 3,84 мг; калия хлорид – 0,09 мг; кальция хлорид – 0,02 мг; трис(гидроксиметил)аминометан-HCl – 0,03 мг; тиомерсал – 4,00 мкг; вода для инъекций – до 0,5 мл.

Животные. Использованы половозрелые аутбредные мыши массой 25–35 г (30 самок (♀) и 30 самцов (♂)), половозрелые аутбредные крысы массой 300–400 г (45♀ и 45♂). Мышей содержали по 10 особей, крыс – по 5 особей в клетках из поликарбоната с приспособлениями для корма, воды и стальных держателей этикеток. Были сформированы следующие группы: «физ. р-р» – животные, которым вводили физиологический раствор (NaCl 0,9%); «адьювант на основе сквалена» – группа животных, которым интраназально вводили адъювант; «VLP» – группа мышей, которым вводили интраназально вакцину 200 мг антигена в дозе препарата; «VLP 80 мкг» – группа крыс, которым вводили интраназальную вакцину 80 мкг антигена в дозе; «VLP 160 мкг» – группа крыс, которым вводили интраназально вакцину 160 мкг антигена в дозе. Все ма-

[1]https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines, дата обращения 05.11.2024

нипуляции с животными осуществляли в соответствии с правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и в других научных целях ETS No. 123 (Страсбург, 1986), и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Дизайн и концепция исследования были сформированы с учетом требований Министерства здравоохранения РФ и концепции гуманного использования животных в экспериментах – «Концепция трех R»[2,3] [4–14].

Выбор доз препарата и способ введения. Мышам интраназально дробно вводили вакцину (25 мкл с интервалом 1,5 ч) с концентрацией 200 мг антигена в дозе для исследования острой токсичности, эта дозировка более чем в 2000 раз превышает дозу для человека. Крысам при исследовании субхронической токсичности VLP-вакцины вводили интраназально одну прививочную (80 мкг антигена в дозе) и удвоенную дозу для человека (160 мкг антигена в дозе). Так же как и мышам, из-за отсутствия возможности однократного интраназального введения исследуемых доз препарата, введение проводилось дробно (интервал 3 ч).

Наблюдение за животными. При исследовании острой токсичности на мышах наблюдение за животными осуществляли в течение 2 нед, а в день вакцинации – ежечасно. При исследовании хронической токсичности на крысах через 24 ч после последнего введения вакцины из каждой группы были выведены 10 животных, а за оставшимися крысами наблюдали 2 нед. Мышей и крыс подвергали эвтаназии с полным предварительным обследованием аналогично крысам, выведенным из исследуемых групп через 24 ч после последнего введения вакцины. Токсическое действие оценивали по таким критериям, как: гибель животных (сроки и количество при наличии таковых); мониторинг дыхательных показателей (диспноэ и/или тахипноэ, цианоз, ринорея); мониторинг двигательной активности (гипер-/гипокинезия, гиперсомния, атаксия, потеря чувствительности, каталепсия, прострация, тремор, фасцикуляции конвульсии); рефлексы; глазные признаки; гиперсаливация; полиурия; мониторинг сердечно-сосудистых показателей (бради-, тахикардия, аритмия); мониторинг показателей работы желудочно-кишечного тракта (диспепсия, рвота, изменения стула); пилолейомиома; алопеция; аналгезия; мышечный тонус; потребление корма и воды; зоосоциальное поведение.

Регистрация массы тела. Взвешивание проводили на весах ACOM PC-100W-5 (ACOM, Южная Корея).

Измерение температуры. Термометрию проводили ректально электронным медицинским термометром B.Well WT-03 (B.Well, Великобритания).

Потребление воды и корма. Учет проводили до начала исследования и далее с периодичностью 1 раз в 14 сут. Потребление воды определяли по разнице объема воды в бутылочках для питья до установки в клетку и через 24 ч. Аналогично определяли потребление корма – по разнице в массе до раздачи и через сутки.

Поведенческие реакции в тесте «Открытое поле». Наблюдение за поведением животного проводили в течение 10 мин в специальной установке, представляющей собой расчерченную на квадраты круглую площадку диаметром 90 см с высотой стенок 50 см с освещением красной лампой 40 Вт, которая размещалась на расстоянии 2 м. Регистрация исследуемых параметров проводилась визуально. Учитывали время на адаптацию, горизонтальную и вертикальную активность по количеству пересеченных квадратов по горизонтали и вертикали соответственно, количество актов дефекации и уринаций, а также груминг (умывание).

Показания сердечно-сосудистой деятельности, такие как частота сердечных сокращений и электрокардиографическая активность, регистрировали при помощи компьютерного электрокардиографа «ПолиСпектр-8/В» специализированного для ветеринарии (ООО «Нейрософт», Россия).

Анализ крови. Общий анализ крови выполняли на гематологическом анализаторе Mindray BC-2800-vet (Mindray, Китай) в соответствии с инструкцией производителя. Для этого в пробирки с антикоагулянтом ЭДТА «Юнивет» отбирали из хвостовой вены кровь. Оценивали количество красных и белых клеток крови (эритроцитов и лейкоцитов-моноцитов, лимфоцитов и гранулоцитов). При исследовании крови на гемостаз определяли следующие показатели: время свертывания крови, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и фибриноген. Забор крови производили также из хвостовой вены, но в пробирки с 3,8% раствором цитрата натрия. Анализ осуществляли на анализаторе показателей гемостаза АПГ-02-П (ООО «ЭМКО», Россия) в соответствии с инструкцией производителя с использованием наборов реагентов компании «Ренам».

Биохимический анализ крови проводили на фотометре «Стат факс 4500+» (Awareness Technology Inc., США) с применением стандартных наборов реагентов компаний «Юнимед» и «Ольвекс Диагностикум» в соответствии с инструкцией производителя. Отбор крови осуществляли в пробирки с гранулами для отделения сыворотки. Определяли следующие показатели: общий белок (биуретовый метод), аспартат- и аланинаминотрансферазу и щелочную фосфатазу (кинетический метод), креатинин (кинетический метод, основанный на реакции Яффе), мочевину (УФ-кинетический метод), альбумин и натрий (колориметрический метод), калий (турбидиметрический метод без депротеинизации), билирубин общий (по реакции диазотирования

[2]Национальный стандарт Российской Федерации (ГОСТ 33044-2014) «Принципы надлежащей лабораторной практики».

[3]Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 56701-2015 от 01.07.2016 «Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств».

билирубина диазосульфаниловой кислотой), глюкозу (глюкозооксидазный метод), холестерин и триглицериды (ферментативный метод).

Анализ мочи проводили с помощью полосок «Дека-Фан ЛАУРА» на экспресс-анализаторе мочи LAURA Smart (Erba Lachema s.r.o., Чехия). Определяли удельный вес мочи, уровень pH и содержание эритроцитов, лейкоцитов, белка, глюкозы, кетонов, билирубина, уробилиногена и нитритов.

Терминальные процедуры. Некропсия проводилась сразу после гибели животных по полной патологоанатомической схеме. При изучении острой токсичности эвтаназию проводили ингаляцией двуокиси углерода (CO_2), а при изучении субхронической токсичности проводили методом декапитации с предварительной анестезией.

Макроскопическое исследование. Визуально оценивали исследуемые органы, такие как: головной мозг, сердце, аорта, гортань, трахея, легкие, подчелюстная слюнная железа, щитовидная железа, тимус, лимфатические узлы, пищевод, желудок, поджелудочная железа, тонкий и толстый кишечник, печень и желчный пузырь, селезенка, почки, надпочечники, мочевой пузырь, семенники/яичники, матка, влагалище.

Микроскопическое исследование проводили на световом микроскопе Leica DM1000 (Leica Microsystems CSC GmbH, Германия) для анализа цитогистоархитектоники места введения (носовые ходы).

Морфометрический анализ. Органы взвешивали на весах DL-63 («ДЭМКОМ», Россия). Парные органы взвешивали вместе. Относительную массу органов (головной мозг, тимус, сердце, легкие, почки, надпочечники, печень, селезенка, семенники/яичники) определяли по соотношению массы исследуемого органа к массе тела животного.

Гистологическое исследование. Готовили срезы (3–4 нм) исследуемых образцов органов и тканей на микротоме RMD-4000 (MT Point, Россия) после предварительной фиксации в 15% растворе формалина, а также обезвоживания, обезжиривания и парафинизации на гистопроцессоре TLP-144 (MT Point, Россия). После фиксации полученных срезов на предметном стекле проводили депарафинизацию в ксилоле и батарее спиртов для дальнейшего окрашивания гематоксилином и эозином. Затем окрашенные образцы исследовали на световом микроскопе Leica DM1000 (Leica Microsystems CSC GmbH, Германия).

Статистический анализ. Критерий сравнения выбирали исходя из параметров нормальности распределения выборок. Достоверность различий полученных значений измеряемых показателей между контрольными и опытными группами выполняли с помощью параметрических и непараметрических методов. (*t*-критерия Стьюдента и *U*-критерий Манна–Уитни соответственно). Достоверным считали различие при $p < 0,05$.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23.07.2010). Протокол исследования одобрен биоэтической комиссией АНО «ИМБИИТ» (Протокол № 4/2022 от 16.05.2022).

Результаты

Исследование острой токсичности на мышах показало, что на протяжении всего исследования у животных не было установлено клинической картины интоксикации, гибели не зарегистрировано. Во время иммунизации животные вели себя спокойно, чихания или заглатывания препарата не наблюдалось. При последних введениях как вакцины, так и носителя у мышей наблюдались покраснение и припухлость зеркальца носа, которые проходили в течение суток. После введения вакцины, а также в остальное время наблюдений при визуальном осмотре всех животных исследуемых групп не было выявлено отклонений от нормы и различий между группами. Мыши выглядели здоровыми. Зоосоциальное поведение мышей контрольных и опытных групп не отличалось. Внешний вид, состояние шерсти, мышечный тонус и дыхание были без особенностей. Частота мочеиспускания, цвет мочи, желудочно-кишечные показатели, рефлексы соответствовали физиологической норме [15, 16]. Независимо от пола или исследуемой группы не было зарегистрировано достоверной разницы в потреблении корма и воды, прибавка в весе статистически значимо не различалась между контрольной («физ. р-р.») и опытными группами («адьювант на основе сквалена» и «VLP») на протяжении всего эксперимента ($p > 0,05$). Результаты представлены на **рисунке** *а* и *б*.

Для патоморфологической оценки органов проводили некропсию с извлечением органов. Не было установлено влияния вакцины на состояние внутренних органов мышей при макроскопическом исследовании. Достоверных как внутригрупповых, так и межгрупповых различий не обнаружено. Расположение внутренних органов было физиологически правильным, естественные отверстия без особенностей, свободной жидкости не обнаружено. Также не было обнаружено отрицательного влияния вакцины на анатомию и вес органов. Полученные результаты относительной массы внутренних органов представлены в **табл. 1.**

При исследовании субхронической токсичности на крысах не было зарегистрировано гибели животных. Мониторинг общего состояния и поведения на протяжении всего эксперимента проводился ежедневно. Отклонения не выявлены, тест «Открытое поле» – без особенностей. Реакция на внешние раздражители, ориентация в пространстве, мышечный тонус и координация движений были в пределах физиологических норм. Не было проявлений признаков агрессии. Крысы выглядели здоровыми, шерстяной покров был без особенностей, кожа – без патологических признаков. Живот не был увеличен; видимые слизистые – умеренно влажные, розовые, чистые; зубы – без изменений; уши и глаза – без воспалительных признаков; слезо- и слюноотделение – без нарушений. Дыхание ровное, без особенностей. Количество мочеиспуска-

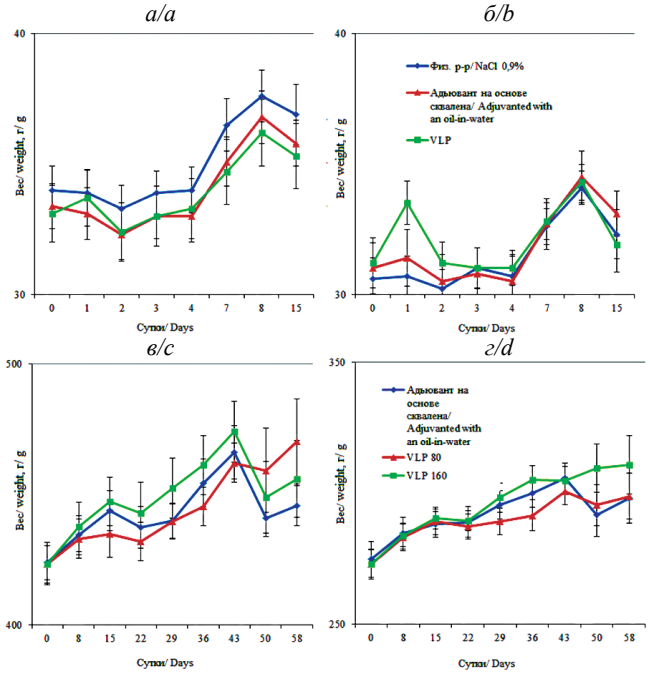

Рисунок. Средние значения массы самцов (*а*) и самок (*б*) мышей в исследуемых группах до исследования – 0-е сутки, на 1, 2, 3, 4, 7, 8 и 15-е сутки после введения вакцины, г (m ± SEM). Средние значения массы самцов (*в*) и самок (*г*) крыс в исследуемых группах до исследования – 0-е сутки, на 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50 и 58-е сутки после введения вакцины, г (m ± SEM).

По вертикали – масса животных, г; по горизонтали – продолжительность эксперимента, сутки.

Figure. Average weights of male (*a*) and female (*b*) mice in the study groups before the study – day 0, on days 1, 2, 3, 4, 7, 8 and 15 after vaccine administration, g (m ± SEM). Average weights of male (*c*) and female (*d*) rats in the study groups before the study – day 0, on days 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50 and 58 after vaccine administration, g (m ± SEM).

Vertical axis – animal weight, g; horizontal axis – experiment duration, days.

Таблица 1. Относительная масса внутренних органов самцов и самок мышей, % (m ± SEM)
Table 1. Relative mass of internal organs of mice, % (m ± SEM)

Орган Organ	Группа Group					
	Физ. р-р NaCl 0.9%		Адьювант на основе сквалена Adjuvanted with an oil-in-water		VLP	
	♀, *n* = 10	♂, *n* = 10	♀, *n* = 10	♂, *n* = 10	♀, *n* = 10	♂, *n* = 10
Головной мозг Brain	1,2 ± 0,06	1,1 ± 0,06	1,3 ± 0,05	1,0 ± 0,04	1,3 ± 0,09	1,1 ± 0,08
Тимус Thymus	0,2 ± 0,03	0,1 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,01
Сердце Heart	0,4 ± 0,01	0,4 ± 0,01	0,4 ± 0,02	0,4 ± 0,01	0,4 ± 0,01	0,4 ± 0,02
Легкие Lungs	0,8 ± 0,11	0,7 ± 0,07	0,7 ± 0,06	0,9 ± 0,11	0,9 ± 0,11	0,7 ± 0,12
Почки Kidneys	1,1 ± 0,04	1,2 ± 0,04	1,1 ± 0,04	1,3 ± 0,03	1,1 ± 0,04	1,3 ± 0,06
Надпочечники Adrenal glands	0,04 ± 0,002	0,02 ± 0,001	0,03 ± 0,002	0,02 ± 0,002	0,04 ± 0,002	0,02 ± 0,001
Печень Liver	3,8 ± 0,13	3,6 ± 0,06	3,8 ± 0,14	3,6 ± 0,07	3,6 ± 0,10	3,8 ± 0,09
Селезенка Spleen	0,4 ± 0,07	0,3 ± 0,02	0,4 ± 0,08	0,3 ± 0,02	0,4 ± 0,07	0,4 ± 0,03
Тимус/селезенка Thymus/spleen	0,5 ± 0,12	0,5 ± 0,05	0,5 ± 0,06	0,5 ± 0,05	0,5 ± 0,10	0,5 ± 0,05
Семенники/яичники Testes/Ovaries	0,1 ± 0,01	0,6 ± 0,04	0,1 ± 0,01	0,7 ± 0,03	0,2 ± 0,01	0,7 ± 0,05

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 данные представлены в виде средних значений по группе со стандартными ошибками среднего (m ± SEM).

Note. Here and in the table. 2, 3 data are presented as group means with standard errors of the mean (m ± SEM).

ний и дефекаций – в соответствии с физиологической нормой. Нос – без выделений. У некоторых животных после трехкратной инстилляции за день как вакцины, так и носителя в носовую полость появились покраснение и припухлость носового зеркальца. Описанные явления исчезали самостоятельно через сутки. Термо-

метрия животных не выявила отклонений за пределы физиологической нормы [15, 16]. Не было обнаружено достоверного влияния интраназального введения VLP-вакцины как в прививочной, так и в двойной прививочной дозировках, на динамику массы тела крыс, что показывает отсутствие негативного влияния VLP-вакцины на этот показатель (**рис.** *в* и *г*).

Средние групповые значения клинического анализа крови представлены в **табл. 2**. Через сутки после последней иммунизации (43-и сутки) было выявлено достоверное увеличение менее чем в 2 раза количества тромбоцитов у самцов крыс, получавших 160 мкг антигена в дозе препарата (двойная прививочная доза) по сравнению с контрольной группой. Выявленное увеличение количества тромбоцитов носило обратимый характер и не наблюдалось в других опытных группах или при иных сроках проведения клинического анализа крови в течение всего исследования. Через 14 сут не было статистически значимых различий данного показателя между опытными и контрольными группами. При этом не было достоверных различий между группами по остальным исследуемым показателям анализа крови, которые не выходили за границы физиологических норм для крыс [15, 16].

Исследование системы гемостаза по таким показателям коагулограммы, как АЧТВ, время рекальцификации и фибриноген, не выявило достоверных различий между опытными и контрольными группами. Показатели биохимического анализа крови (общий белок, холестерин, триглицериды, билирубин общий, аспартат- и аланинаминотрансфераза, щелочная фосфатаза, мочевина) и анализа мочи (белок, кетоны, удельный вес, pH,) у крыс, получавших интраназальную вакцину на основе VLP в прививочной и двойной прививочной дозе, статистически значимо не отличались от аналогичных показателей у крыс контрольных групп. У самцов и самок крыс не были выявлены признаки интоксикации и патологические отклонения в структуре внутренних органов. Средние значения относительной массы внутренних органов крыс представлены в **табл. 3**.

В опытной группе крыс, которым вводили интраназально VLP-вакцину в двойной прививочной дозировке (160 мкг антигена в дозе), было выявлено увеличение в 1,5 раза относительной массы селезенок у самок и легких у самцов по сравнению с контрольной группой. Несмотря на то что увеличение было статистически значимым, значения не выходили за границы физиологических норм для лабораторных крыс [15, 16].

Таблица 2. Показатели клинического анализа крови самцов и самок крыс на 1-е и 14-е сутки после последней вакцинации (43 и 58-е сутки эксперимента соответственно), % (m ± SEM)

Table 2. Clinical blood test parameters of rats on the 1st and 14th days after the last immunization (43th and 58th days of the experiment, respectively), % (m ± SEM)

Показатель Blood count	Сутки Days	Группа Group					
		Адьювант на основе сквалена Adjuvanted with an oil-in-water		VLP 80 мкг VLP 80 μg		VLP 160 мкг VLP 160 μg	
		♀, *n* = 15	♂, *n* = 15	♀, *n* = 15	♂, *n* = 15	♀, *n* = 15	♂, *n* = 15
RBC, 10^{12}/л RBC, 10^{12}/l	43	7,8 ± 0,11	7,9 ± 0,37	7,7 ± 0,33	8,3 ± 0,20	7,9 ± 0,30	8,3 ± 0,19
	58	8,0 ± 0,26	8,7 ± 0,23	7,8 ± 0,14	8,7 ± 0,27	7,6 ± 0,12	8,2 ± 0,42
PLT, 10^9/л PLT, 10^9/l	43	374,6 ± 28,01	355,7 ± 49,87	417,2 ± 32,29	363,2 ± 28,48	517,6 ± 70,96	600,4 ± 67,74*
	58	347,2 ± 10,84	338,0 ± 16,10	365,2 ± 7,89	369,2 ± 5,15	330,0 ± 10,50	372,4 ± 7,55
HCT, %	43	43,0 ± 0,69	41,6 ± 1,75	41,5 ± 1,72	43,9 ± 1,00	42,9 ± 1,63	44,0 ± 1,08
	58	43,3 ± 1,04	46,1 ± 1,18	42,2 ± 1,06	45,0 ± 1,29	41,7 ± 0,47	43,9 ± 2,02
HGB, г/л HGB, g/l	43	147,3 ± 2,58	139,4 ± 6,10	141,8 ± 6,04	147,1 ± 3,46	146,1 ± 5,87	144,0 ± 7,91
	58	149,2 ± 3,83	160,0 ± 4,45	146,7 ± 4,14	154,3 ± 5,18	144,2 ± 2,06	144,7 ± 7,02
WBC, 10^9/л WBC, 10^9/l	43	10,9 ± 1,72	10,1 ± 0,99	9,9 ± 1,11	9,0 ± 1,20	9,8 ± 1,09	11,0 ± 1,54
	58	11,0 ± 1,72	17,5 ± 1,60	11,0 ± 1,55	12,2 ± 2,40	15,0 ± 1,19	15,7 ± 0,72
LYM, %	43	63,1 ± 1,90	64,4 ± 0,95	67,7 ± 0,99	67,3 ± 1,73	65,8 ± 1,93	64,9 ± 1,78
	58	64,5 ± 2,32	57,3 ± 2,20	62,0 ± 1,18	53,5 ± 3,24	63,8 ± 5,59	56,5 ± 5,37
MON, %	43	4,1 ± 0,27	3,8 ± 0,16	3,7 ± 0,18	3,3 ± 0,14	4,0 ± 0,35	3,7 ± 0,17
	58	4,1 ± 0,86	4,0 ± 0,35	4,5 ± 0,34	3,9 ± 0,22	3,8 ± 0,27	4,0 ± 0,33
GRAN, %	43	32,8 ± 1,90	31,9 ± 0,87	28,6 ± 0,88	29,4 ± 1,66	30,2 ± 1,85	31,5 ± 1,67
	58	31,4 ± 2,25	38,7 ± 2,34	31,7 ± 0,90	39,9 ± 3,42	28,4 ± 8,36	36,5 ± 4,42

Примечание. RBC – эритроциты; PLT – тромбоциты; HCT – гематокрит; HGB – гемоглобин; WBC – лейкоциты; LYM – лимфоциты; MON – моноциты; GRAN – гранулоциты. * – статистически значимое различие в сравнении с контролем по *t*-критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

Note. RBC – erythrocytes; PLT – platelets; HCT – hematocrit; HGB – hemoglobin; WBC – leukocytes; LYM – lymphocytes; MON – monocytes; GRAN – granulocytes. * – statistically significant difference compared to the control according to Student's *t*-test ($p < 0.05$).

Таблица 3. Морфометрический анализ внутренних органов самцов и самок крыс на 1-е и 14-е сутки после последней вакцинации (43 и 58-е сутки эксперимента соответственно), % (m ± SEM)

Table 3. Relative mass of internal organs of rats on the 1st and 14th days after the last immunization (43th and 58th days of the experiment, respectively), % (m ± SEM)

Орган Organ	Сутки Days	Группа Group					
		Адьювант на основе сквалена Adjuvanted with an oil-in-water		VLP 80 мкг VLP 80 μg		VLP 160 мкг VLP 160 μg	
		♀, *n* = 15	♂, *n* = 15	♀, *n* = 15	♂, *n* = 15	♀, *n* = 15	♂, *n* = 15
Головной мозг Brain	43	0,6 ± 0,02	0,4 ± 0,01	0,6 ± 0,01	0,4 ± 0,02	0,6 ± 0,02	0,4 ± 0,01
	58	0,6 ± 0,03	0,4 ± 0,02	0,6 ± 0,03	0,4 ± 0,01	0,6 ± 0,02	0,5 ± 0,02
Тимус Thymus	43	0,13 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01
	58	0,10 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,003	0,1 ± 0,01	0,1 ± 0,01
Сердце Heart	43	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,03	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,004
	58	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,02	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,0 ± 0,01	0,3 ± 0,02
Легкие Lungs	43	0,6 ± 0,05	0,4 ± 0,03	0,6 ± 0,05	0,5 ± 0,03	0,5 ± 0,05	0,4 ± 0,03
	58	0,5 ± 0,03	0,5 ± 0,04	0,5 ± 0,05	0,4 ± 0,04	0,5 ± 0,03	0,6 ± 0,02*
Почки Kidneys	43	0,6 ± 0,01	0,6 ± 0,02	0,6 ± 0,02	0,6 ± 0,02	0,6 ± 0,01	0,5 ± 0,01
	58	0,6 ± 0,02	0,6 ± 0,03	0,6 ± 0,01	0,6 ± 0,01	0,6 ± 0,03	0,6 ± 0,02
Надпочечники Adrenal glands	43	0,02 ± 0,002	0,01 ± 0,001	0,02 ± 0,001	0,01 ± 0,001	0,02 ± 0,001	0,01 ± 0,001
	58	0,02 ± 0,003	0,01 ± 0,001	0,02 ± 0,002	0,01 ± 0,001	0,02 ± 0,002	0,01 ± 0,001
Печень Liver	43	2,4 ± 0,05	2,5 ± 0,08	2,4 ± 0,06	2,4 ± 0,06	2,4 ± 0,06	2,3 ± 0,04
	58	2,5 ± 0,05	2,4 ± 0,10	2,5 ± 0,13	2,5 ± 0,13	2,8 ± 0,13	2,3 ± 0,05
Селезенка Spleen	43	0,3 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,02	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,2 ± 0,01
	58	0,3 ± 0,01	0,2 ± 0,01	0,3 ± 0,01	0,2 ± 0,004	0,3 ± 0,03*	0,2 ± 0,02
Семенники/яичники Testes/Ovaries	43	0,04 ± 0,004	0,7 ± 0,02	0,04 ± 0,002	0,7 ± 0,03	0,04 ± 0,002	0,7 ± 0,02
	58	0,04 ± 0,002	0,7 ± 0,03	0,04 ± 0,005	0,7 ± 0,01	0,04 ± 0,001	0,8 ± 0,03

Примечание. * – статистически значимое различие в сравнении с контролем по *t*-критерию Стьюдента ($p < 0,05$).

Note. * – statistically significant difference compared to the control according to Student's *t*-test ($p < 0.05$).

При визуальной оценке, цитологическом и гистологическом анализе места введения вакцины не было выявлено местно-раздражающего действия.

Обсуждение

Несмотря на ограниченные данные по безопасности вакцин против SARS-CoV-2, их применение в условиях пандемии было необходимо. При этом развитие в последующем нежелательных явлений и тяжелых осложнений у добровольцев неблагоприятно сказывается на доверии населения к вакцинации. Библиометрический анализ 1312 исследований вакцин от COVID-19, проведенный Y. Chen и соавт., показал, что они в первую очередь сосредоточены на клинических испытаниях [17], в то время как доклинические исследования безопасности практически не освещаются.

Ранее было показано, что одобренные к применению вакцины на основе VLP: против вируса папиломы человека (Gardasil, Gardasil9, Cervarix), гепатита B (Sci-B-Vac), гепатита E (Hecolin) и малярии (Mosquirix), зарекомендовали себя как безопасные, иммуногенные и эффективные [18]. Все эти вакцины вводятся внутримышечно, так же как и 7 VLP-вакцин против COVID-19, которые находятся на разных стадиях клинических исследований[1]. Разработка вакцин против SARS-CoV-2 с интраназальным способом введения все больше привлекает интерес исследователей разных стран и, несмотря на разнообразие возможных платформ, преимущественно это векторные вакцины [19]. Создание поливалентных вакцин для профилактики COVID-19, эффективных в отношении новых вариантов SARS-CoV-2, по-прежнему является актуальной задачей [20]. Одним из важных этапов разработки вакцин является изучение безопасности, в том числе определение острой и хронической токсичности, поэтому были проведены доклинические исследования безопасности ранее разработанных, полученных и охарактеризованных VLP [21] при интраназальном способе введения.

В соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств под ред. А.Н. Миронова [10], исследования на животных предоставляют наиболее полную информацию

о токсических свойствах тестируемой вакцины, которую предполагается применять у человека. Мыши и крысы являются стандартными объектами токсикологических исследований в количестве, достаточном для полной регистрации изучаемых эффектов и статистической обработки полученных данных.

В настоящей работе приведены результаты исследований острой (мыши) и субхронической (крысы) токсичности с оценкой местной переносимости, проведенных на аутбредных животных (для исключения генотипической зависимости) обоего пола, с разбросом по массе тела менее 10% и количестве, достаточном для статистической обработки результатов, но не превышающем этически допустимые количества для формирования опытных и контрольных групп.

При исследовании острой токсичности на мышах вводили однократно интраназально VLP-вакцину с концентрацией 200 мг антигена в дозе препарата, что превышает более чем в 2000 раз прививочную дозу для человека. Исследуемая вакцина оказалась нетоксична, отсутствовали признаки интоксикации и гибель животных, в связи с чем подсчет летальных доз был невозможен. Полученные результаты совпадают с данными, которые были получены другими исследователями [22, 23], они также не смогли провести расчеты летальных доз из-за отсутствия смертности исследуемых животных. Это подтверждает низкую токсичность вакцин на основе VLP.

В доклинических исследованиях субхронической токсичности крысам вводили одну прививочную дозу вакцины, рассчитанную для человека (80 мкг), и удвоенную дозу (160 мкг). Примечательно, что, как и в случае с исследованием на мышах, различий по исследуемым показателям между группами не было. При этом в случае введения двойной прививочной дозы препарата крысам через сутки после последней иммунизации (43-и сутки) у самцов отмечалось проходящее статистически значимое увеличение количества тромбоцитов менее чем в 2 раза, а на 58-е сутки выявлено увеличение почти в 1,5 раза селезенок у самок и легких у самцов, но поскольку эти значения не превышали физиологические нормы для лабораторных крыс [15, 16], то полученные отклонения можно отнести к флуктуационным изменениям, не связанным с вакцинацией. При визуальной оценке, цитологическом и гистологическом анализе места введения вакцины не было выявлено местно-раздражающего действия. Доклинические исследования, представленные Иранскими исследователями, показали, что субъединичная вакцина с гетерологичным методом вакцинации «прайм-буст», когда животным вводили две дозы вакцины внутримышечно, а одну дозу интраназально, не показала никаких изменений в общих клинических наблюдениях; массе тела и потреблении пищи, клинических показателях, гематологическом исследовании, химическом анализе крови и патологическом исследовании жизненно важных органов. Была установлена безопасность вакцины после введения однократной и повторной дозы препарата [23].

Непрерывная оценка безопасности вакцин крайне необходима, а ее результаты следует распространять для укрепления доверия к программам иммунизации для повышения приверженности общества вакцинопрофилактике [24].

Интраназальная иммунизация продемонстрировала многообещающую способность стимулировать секреторный иммунитет слизистых оболочек наряду с индукцией гуморального и клеточного иммунитета, а также имеет дополнительное преимущество простоты введения и дозирования по сравнению с парентеральными формами введения.

Продемонстрированная в настоящем исследовании безопасность при изучении острой и субхронической токсичности четырехвалентной вакцины на основе VLP для профилактики COVID-19 интраназального применения позволяет проводить дальнейшую разработку этого лекарственного препарата в широких доклинических и последующих клинических исследованиях.

Заключение

Представленное исследование острой и субхронической токсичности с оценкой местной переносимости четырехвалентной VLP-вакцины против COVID-19 является частью доклинических исследований безопасности, иммуногенности и эффективности интраназальной вакцины на основе VLP против COVID-19. Концепция и дизайн исследования были сформированы с учетом требований МЗ РФ, стандартов в области доклинического изучения безопасности новых фармакологических средств – системы GLP (Good Laboratory Practice) и руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств под ред. А.Н. Миронова.

Как исследование острой токсичности на аутбредных мышах, так и исследование субхронической токсичности на аутбредных крысах продемонстрировало безопасность четырехвалентной вакцины на основе VLP для профилактики COVID-19. Было показано, что инстилляции в нос (прививочной дозы, двойной прививочной дозы и дозировки антигена, превышающей более чем в 2000 раз прививочную дозу для человека) не оказывают токсического действия на организм лабораторных животных – крыс и мышей. А отмеченные незначительные изменения носили преходящий характер и не выходили за границы физиологической нормы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fernandes Q., Inchakalody V.P., Merhi M., Mestiri S., Taib N., Moustafa Abo El-Ella D., et al. Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines. *Ann. Med.* 2022; 54(1): 524–40. https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2031274
2. Гребенникова Т.В., Елисеева О.В., Латышев О.Е., Савочкина Т.Е., Цибезов В.В., Черепушкин С.А. и др. Рекомбинантные вирусоподобные частицы для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2. Патент RU 2769224 C1; 2022. https://elibrary.ru/prmwjl
3. Гребенникова Т.В., Елисеева О.В., Латышев О.Е., Черепушкин С.А., Цибезов В.В., Лебедева В.В. и др. Вирусоподобные химерные частицы для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2, содержащие белки коронавируса и ротавируса. Патент RU 2779810 C1; 2022.

4. Гуськова Т.А., Сюбаев Р.Д. Токсикологические аспекты одновременного использования различных лекарственных средств. Токсикология лекарственных средств. М.: Русский врач; 2003: 116–40.
5. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. Лабораторные животные, их разведение и использование в эксперименте. Киев; 1982.
6. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных. *Ланимагология*. 1993; (1): 29.
7. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике. М.; 1987.
8. Назаренко Г.И., Кишкун А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований: Практическое руководство. М.: Медицина; 2007.
9. Трахтенберг И.М. Проблемы нормы в токсикологии. М.; 1991.
10. Миронов А.Н. ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К; 2012.
11. Миронов А.Н., Меркулов В.А. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том 3. М.: Полиграф-Плюс; 2014.
12. Гарбер Д.С., Барби Р.В., Билицки Д.Т., Клейтон Ли.Э., Донован Д.К., Кон Д.Ф. и др. Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. М.: ИРБИС; 2017. https://elibrary.ru/zrjvdj
13. WHO. Guidelines on the non-clinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines; 2014. Available at: https://who.int/publications/m/item/nonclinical-evaluation-of-vaccine-adjuvants-and-adjuvanted-vaccines-annex-2-trs-no-987
14. Требования Международного комитета по науке по использованию в экспериментальных исследованиях лабораторных животных. *Бюллетень ИКЛАС*. 1978; (24): 4–5.
15. Линева А. Физиологические показатели нормы животных. Справочник. М.: Аквариум ЛТД; 2003.
16. Абрашова Т.В., Гущин Я.А., Ковалева М.А., Рыбакова А.В., Селезнева А.И., Соколова А.П. и др. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. СПб.: ЛЕМА; 2013. https://elibrary.ru/ptsruo
17. Chen Y., Cheng L., Lian R., Song Z., Tian J. COVID-19 vaccine research focusses on safety, efficacy, immunoinformatics, and vaccine production and delivery: a bibliometric analysis based on VOSviewer. *Biosci. Trends.* 2021; 15(2): 64–73. https://doi.org/10.5582/bst.2021.01061
18. Nooraei S., Bahrulolum H., Hoseini Z.S., Katalani C., Hajizade A., Easton A.J., et al. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *J. Nanobiotechnology.* 2021; 19(1): 59. https://doi.org/10.1186/s12951-021-00806-7.
19. Bai Z., Wan D., Lan T., Hong W., Dong H., Wei Y., et al. Nanoplatform based intranasal vaccines: current progress and clinical challenges. *ACS Nano.* 2024; 18(36): 24650–81. https://doi.org/10.1021/acsnano.3c10797.
20. Marks P.W., Gruppuso P.A., Adashi E.Y. Urgent need for next-generation COVID-19 vaccines. *JAMA*. 2023; 329(1): 19–20. https://doi.org/10.1001/jama.2022.22759
21. Латышев О.Е., Зайкова О.Н., Елисеева О.В., Савочкина Т.Е., Чернорыж Я.Ю., Сыроешкин А.В. и др. Разработка, получение и характеристика вирусоподобных частиц SARS-CoV-2 (Coronaviridae: orthocoronavirinae: betacoronavirus: sarbecovirus). *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(2): 175–86. https://doi.org/10.36233/0507-4088-226 https://elibrary.ru/gkxfed
22. Banihashemi S.R., Es-Haghi A., Fallah Mehrabadi M.H., Nofeli M., Mokarram A.R., Ranjbar A., et al. Safety and efficacy of combined intramuscular/intranasal RAZI-COV PARS vaccine candidate against SARS-CoV-2: A preclinical study in several animal models. *Front. Immunol*. 2022; 13: 836745. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.836745
23. Vakhrusheva A.V., Kudriavtsev A.V., Kryuchkov N.A., Deev R.V., Frolova M.E., Blagodatskikh K.A., et al. SARS-CoV-2 subunit virus-like vaccine demonstrates high safety profile and protective efficacy: preclinical study. *Vaccines (Basel).* 2022; 10(8): 1290. https://doi.org/10.3390/vaccines10081290
24. Антонова Н.А., Ерицян К.Ю. Систематический обзор эмпирических исследований факторов отказа от вакцинации. *Гигиена и санитария*. 2018; 97(7): 664–70. https://doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-7-664-670 https://elibrary.ru/uxaexo

REFERENCES

1. Fernandes Q., Inchakalody V.P., Merhi M., Mestiri S., Taib N., Moustafa Abo El-Ella D., et al. Emerging COVID-19 variants and their impact on SARS-CoV-2 diagnosis, therapeutics and vaccines. *Ann. Med.* 2022; 54(1): 524–40. https://doi.org/10.1080/07853890.2022.2031274
2. Grebennikova T.V., Eliseeva O.V., Latyshev O.E., Savochkina T.E., Tsibezov V.V., Cherepushkin S.A., et al. Recombinant virus-like particles for induction of specific immunity against severe acute respiratory syndrome virus SARS-CoV-2. Patent RU 2769224 C1; 2022. https://elibrary.ru/prmwjl (in Russian)
3. Grebennikova T.V., Eliseeva O.V., Latyshev O.E., Cherepushkin S.A., Tsibizov V.V., Lebedeva V.V., et al. Virus-like chimeric particles for the induction of specific immunity against the severe acute respiratory syndrome virus SARS-CoV-2, containing proteins of coronavirus and rotavirus. Patent RU 2779810 C1; 2022. (in Russian)
4. Gus'kova T.A., Syubaev R.D. Toxicological Aspects of Simultaneous Use of Various Medicines. Toxicology of Medicines [Toksikologicheskie aspekty odnovremennogo ispol'zovaniya razlichnykh lekarstvennykh sredstv. Toksikologiya lekarstvennykh sredstv]. Moscow: Russkii vrach; 2003; 116–40. (in Russian)
5. Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., Zakhariya E.A. Laboratory Animals, their Breeding and Use in Experiment [Laboratornye zhivotnye, ikh razvedenie i ispol'zovanie v eksperimente]. Kiev; 1982. (in Russian)
6. International recommendations for conducting biomedical research using animals. *Lanimagologiya*. 1993; (1): 29. (in Russian)
7. Menshikov V.V. Laboratory Research Methods in the Clinic [Laboratornye metody issledovaniya v klinike]. Moscow; 1987. (in Russian)
8. Nazarenko G.I., Kishkun A.A. Clinical Evaluation of Laboratory Research Results: A Practical Guide [Klinicheskaya otsenka rezul'tatov laboratornykh issledovanii: Prakticheskoe rukovodstvo]. Moscow: Meditsina; 2007. (in Russian)
9. Trakhtenberg I.M. Problems of Norm in Toxicology [Problemy normy v toksikologii]. Moscow; 1991. (in Russian)
10. Mironov A.N. ed. Guidelines for Conducting Preclinical Studies of Medicines [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanii lekarstvennykh sredstv]. Moscow: Grif and K; 2012. (in Russian)
11. Mironov A.N., Merkulov V.A. Guidelines for the Examination of Medicines. Volume 3 [Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennykh sredstv. Tom 3]. Moscow: Poligraf-Plyus; 2014. (in Russian)
12. Garber D.S., Barbi R.V., Bilitski D.T., Kleiton Li.E., Donovan D.K., Kon D.F., et al. Guidelines for the Maintenance and Use of Laboratory Animals [Rukovodstvo po soderzhaniyu i ispol'zovaniyu laboratornykh zhivotnykh]. Moscow: IRBIS; 2017. https://elibrary.ru/zrjvdj (in Russian)
13. WHO. Guidelines on the non-clinical evaluation of vaccine adjuvants and adjuvanted vaccines; 2014. Available at: https://who.int/publications/m/item/nonclinical-evaluation-of-vaccine-adjuvants-and-adjuvanted-vaccines-annex-2-trs-no-987
14. Requirements of the International Committee for Science on the use of laboratory animals in experimental research. *Byulleten' IKLAS*. 1978; (24): 4–5. (in Russian)
15. Lineva A. Physiological Indicators of the Norm of Animals. Reference Book [Fiziologicheskie pokazateli normy zhivotnykh. Spravochnik]. Moscow: Aquarium LTD; 2003. (in Russian)
16. Abrashova T.V., Gushchin Ya.A., Kovaleva M.A., Rybakova A.V., Selezneva A.I., Sokolova A.P., et al. Guide. Physiological, Biochemical and Biometric Indicators of the Norm of Experimental Animals [Spravochnik. Fiziologicheskie, biokhimicheskie i biometricheskie pokazateli normy eksperimental'nykh zhivotnykh]. St. Petersburg: LEMA; 2013. https://elibrary.ru/ptsruo (in Russian)
17. Chen Y., Cheng L., Lian R., Song Z., Tian J. COVID-19 vaccine research focusses on safety, efficacy, immunoinformatics, and vaccine production and delivery: a bibliometric analysis based on VOSviewer. *Biosci. Trends*. 2021; 15(2): 64–73. https://doi.org/10.5582/bst.2021.01061
18. Nooraei S., Bahrulolum H., Hoseini Z.S., Katalani C., Hajizade A., Easton A.J., et al. Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *J. Nanobiotechnology.* 2021; 19(1): 59. https://doi.org/10.1186/s12951-021-00806-7
19. Bai Z., Wan D., Lan T., Hong W., Dong H., Wei Y., et al. Nanoplatform based intranasal vaccines: current progress and clinical challenges. *ACS Nano.* 2024; 18(36): 24650–81. https://doi.org/10.1021/acsnano.3c10797

20. Marks P.W., Gruppuso P.A., Adashi E.Y. Urgent need for next-generation COVID-19 vaccines. *JAMA*. 2023; 329(1): 19–20. https://doi.org/10.1001/jama.2022.22759
21. Latyshev O.E., Zaykova O.N., Eliseeva O.V., Savochkina T.E., Chernoryzh Ya.Yu., Syroeshkin A.V., et al. Development, production and characterization of SARS-CoV-2 virus-like particles (Coronaviridae: orthocoronavirinae: betacoronavirus: sarbecovirus). *Voprosy virusologii*. 2024; 69(2): 175–86. https://doi.org/10.36233/0507-4088-226 https://elibrary.ru/gkxfed (in Russian)
22. Banihashemi S.R., Es-Haghi A., Fallah Mehrabadi M.H., Nofeli M., Mokarram A.R., Ranjbar A., et al. Safety and efficacy of combined intramuscular/intranasal RAZI-COV PARS vaccine candidate against SARS-CoV-2: A preclinical study in several animal models. *Front. Immunol.* 2022; 13: 836745. https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.836745
23. Vakhrusheva A.V., Kudriavtsev A.V., Kryuchkov N.A., Deev R.V., Frolova M.E., Blagodatskikh K.A., et al. SARS-CoV-2 subunit virus-like vaccine demonstrates high safety profile and protective efficacy: preclinical study. *Vaccines (Basel)*. 2022; 10(8): 1290. https://doi.org/10.3390/vaccines10081290
24. Antonova N.A., Yeritsyan K.Yu. The systematic review of empirical research of factors of refusal from vaccination. *Gigiena i Sanitaria (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2018; 97(7): 664–70. https://doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-7-664-670 https://elibrary.ru/uxaexo (in Russian)

Информация об авторах:

Чернорыж Яна Юрьевна✉ – канд. мед. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: revengeful_w@mail.ru; https://orcid.org/0000-0001-9848-8515

Кондратьева Валерия Михайловна – аспирант лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: 1999valeriak@mail.ru; https://orcid.org/0000-0001-9163-4516

Малкова Анастасия Павловна – заведующая лабораторией биологических исследований Института медико-АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий» (АНО «ИМБИИТ»), Московская обл., Краснознаменск, Россия. E-mail: nastena0302@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-2817-4817

Савочкина Татьяна Евгеньевна – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: tasavochkina@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0003-4366-8476

Елисеева Олеся Васильевна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: olesenka80@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-0723-9749

Латышев Олег Евгеньевич – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: oleglat80@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-5757-3809

Якунин Дмитрий Юрьевич – аспирант лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: yd364@mail.ru; https://orcid.org/0009-0009-4531-5739

Зайкова Ольга Николаевна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: zaykova_o_n@mail.ru; https://orcid.org/0000-0003-4708-2069

Слуднякова Екатерина Сергеевна – ведущий инженер по внедрению научных разработок ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: ekaterina.ses@mail.ru; https://orcid.org/0009-0000-4925-5205

Гребенникова Татьяна Владимировна – д-р биол. наук, профессор, чл.-корр. РАН, заместитель директора по научной работе подразделения Института вирусологии им. Д.И. Ивановского, руководитель Испытательного центра ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: t_grebennikova@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-6141-9361

Участие авторов: Чернорыж Я.Ю. – проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Кондратьева В.М. – проведение экспериментов, подготовка текста; Малкова А.П. – проведение экспериментов; Савочкина Т.Е. – подготовка текста; Елисеева О.В. – концепция и дизайн исследований, анализ и интерпретация данных; Латышев О.Е. – проведение экспериментов; Якунин Д.Ю. – анализ и интерпретация данных; Зайкова О.Н. – анализ и интерпретация данных; Слуднякова Е.С. – проведение контроля качества препарата; Гребенникова Т.В. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста, одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

Поступила 08.11.2024
Принята в печать 16.12.2024
Опубликована онлайн 28.12.2024

Information about the authors:

Yana Yu. Chernoryzh✉ – PhD, Candidate of Medical Sciences, Researcher, laboratory of molecular diagnostics, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: revengeful_w@mail.ru; https://orcid.org/0000-0001-9848-8515

Valeria M. Kondratieva – graduate student, laboratory of molecular diagnostics, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: 1999valeriak@mail.ru; https://orcid.org/0000-0001-9163-4516

Anastasia P. Malkova – head of the Laboratory of Biological Research Institute for Biomedical Research and Technology (IMBIIT), Krasnoznamensk, Moscow region, Russia. E-mail: nastena0302@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-2817-4817

Tatyana E. Savochkina – Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: tasavochkina@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0003-4366-8476

Olesya V. Eliseeva – PhD, Senior Scientist, Laboratory of molecular diagnostics, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: olesenka80@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-0723-9749

Oleg E. Latyshev – PhD, Senior Scientist, Laboratory of molecular diagnostics, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: oleglat80@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-5757-3809

Dmitriy Yu. Yakunin – graduate student of laboratory of molecular diagnostics, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: yd364@mail.ru; https://orcid.org/0009-0009-4531-5739

Olga N. Zaykova – PhD, Senior Scientist at the Laboratory of Molecular Diagnostics, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: zaykova_o_n@mail.ru; https://orcid.org/0000-0003-4708-2069

Ekaterina S. Sludnyakova – Leading engineer for the implementation of scientific developments of N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: ekaterina.ses@mail.ru; https://orcid.org/0009-0000-4925-5205

Tatyana V. Grebennikova – Doctor of Biological Sciences, Professor, Corresponding Member RAS, deputy Director for Science of the Division of the Ivanovsky Virology Institute Head of the Control Center of N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: t_grebennikova@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-6141-9361

Contribution: Chernoryzh Ya.Yu. – performing the experiments, data analysis and interpretation, text preparation; Kondratieva V.M. – performing the experiments, text preparation; Malkova A.P. – performing the experiments; Savochkina T.A. – text preparation; Eliseeva O.V. – concept and design of research, data analysis and interpretation; Latyshev O.E. – performing the experiments; Yakunin D.Yu. – analysis and interpretation of data; Zaykova O.N. – data analysis and interpretation; Sludnyakova E.S. – vaccine quality control; Grebennikova T.V. – the concept and design of the study, analysis and interpretation of data, preparation of the text, approval of the final version of the article for publication.

Received 08 November 2024
Accepted 16 December 2024
Published online 28 December 2024

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-280

© СТЕПАНЮК М.А., ЛЕГОСТАЕВ С.С., КАРЕЛИНА К.В., ТИМОФЕЕВА Н.Ф., ЕМЦОВА К.Ф., ОХЛОПКОВА О.В., ТАРАНОВ О.С., ПРОТОПОПОВ А.В., ТЕРНОВОЙ В.А., ЛОКТЕВ В.Б., СВЯТЧЕНКО В.А., АГАФОНОВ А.П., 2025

Выявление и характеризация вируса Dezidougou (род *Negevirus*) в комарах (*Ochlerotatus caspius*), собранных на территории Республики Саха (Якутия)

Степанюк М.А.[1], Легостаев С.С.[1], Карелина К.В.[1], Тимофеева Н.Ф.[2], Емцова К.Ф.[1], Охлопкова О.В.[1]✉, Таранов О.С.[1], Протопопов А.В.[2], Терновой В.А.[1], Локтев В.Б.[1], Святченко В.А.[1], Агафонов А.П.[1]

[1]ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, Россия;
[2]ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», 677000, Республика Саха (Якутия), г. Якутск, Россия

Резюме
Введение. Мониторинг и исследование микроорганизмов, переносимых членистоногими, имеют важное значение. В последнее время с развитием методов секвенирования нового поколения (NGS) у насекомых идентифицировано множество ранее неизвестных вирусов.
Цель исследования. Изоляция вирусов из комаров отобранных в Республике Саха (Якутия), с последующим исследованием нового для России негевируса, выделенного из комаров вида *Ochlerotatus caspius*, включая определение его полной нуклеотидной последовательности, филогенетическую и вирусологические характеристики.
Материалы и методы. Изоляцию вируса Dezidougou проводили на культуре клеток C6/36 (*Aedes albopictus*). Электронную микроскопию осуществляли с использованием электронного микроскопа JEM 1400. Скрининговое определение нуклеотидных последовательностей выполняли с применением метода NGS на высокопроизводительном секвенаторе MiSeq, Illumina (США). Определение полногеномной нуклеотидной последовательности проводили секвенированием по методу Сэнгера. Филогенетический анализ выполняли с использованием базы данных GenBank и программ Vector NTI Advance 11, MEGA 11.
Результаты. Выделенный из комаров вирус эффективно реплицировался в клетках C6/36, вызывая их гибель. При этом он не размножался в использованных клеточных культурах млекопитающих. Выделенный вирус при интрацеребральном инфицировании мышей-сосунков не вызывал у них патологических проявлений. При электронно-микроскопическом исследовании очищенной вируссодержащей суспензии было показано наличие сферических вирусных частиц диаметром 45–55 нм. Результаты полногеномного секвенирования идентифицировали его принадлежность к вирусу Dezidougou, впервые выделенному в Кот д'Ивуаре. Нуклеотидная последовательность генома штамма Yakutsk 2023 вируса Dezidougou была депонирована в базе данных GenBank (PP975071.1).
Заключение. Впервые в Российской Федерации был выделен и охарактеризован вирус Dezidougou рода *Negevirus.* Проведение дальнейших исследований распространенности негевирусов, их вирусологических особенностей, потенциального значения для здравоохранения и влияния на векторную компетентность переносчиков является важным и перспективным.

Ключевые слова: *вирус Dezidougou; негевирусы; insect specific viruses; Республика Саха (Якутия)*

Для цитирования: Степанюк М.А., Легостаев С.С., Карелина К.В., Тимофеева Н.Ф., Емцова К.Ф., Охлопкова О.В., Таранов О.С., Протопопов А.В., Терновой В.А., Локтев В.Б., Святченко В.А., Агафонов А.П. Выявление и характеризация вируса Dezidougou (род *Negevirus*) в комарах (*Ochlerotatus caspius*), собранных на территории Республики Саха (Якутия). *Вопросы вирусологии*. 2025; 70(1): 47–56. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-280 EDN: https://elibrary.ru/pbmmdx

Финансирование. Исследование было выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2019-1665 и Государственного задания 9/21.
Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.
Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use 2010. Протокол исследования одобрен Комитетом по Биоэтике ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (Протокол № 02 от 03.04.2023).

ORIGINAL STUDY ARTICLE
DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-280

Detection and characterization of the Dezidougou virus (genus *Negevirus)* in mosquitoes (*Ochlerotatus caspius*) collected in the Republic of Sakha (Yakutia)

Marina A. Stepanyuk[1], Stanislav S. Legostaev[1], Kristina V. Karelina[1], Nina F. Timofeeva[2], Ksenia F. Emtsova[1], Olesia V. Ohlopkova[1]✉, Oleg S. Taranov[1], Albert V. Protopopov[2], Vladimir A. Ternovoi[1], Valery B. Loktev[1], Victor A. Svyatchenko[1], Alexander P. Agafonov[1]

[1]State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», 630559, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia;
[2]M.K. Ammosov North-Eastern Federal University, 677000, Republic of Sakha (Yakutia), Yakutsk, Russia

Abstract
Introduction. Monitoring and research on arthropod-borne microorganisms is important. Recently, with the development of next-generation sequencing methods, many previously unknown viruses have been identified in insects.
Aim of the study. Isolation of viruses from mosquitoes sampled in the Republic of Sakha (Yakutia), followed by the study of a new for Russia negevirus isolated from mosquitoes of the species *Ochlerotatus caspius*, including determination of its complete nucleotide sequence, phylogenetic and virological characteristics.
Materials and methods. Dezidougou virus isolation was performed on C6/36 (*Aedes albopictus*) cell culture. Electron microscopy was performed using a JEM 1400 electron microscope. Nucleotide sequence screening was performed by NGS on a high-throughput sequencer MiSeq, Illumina (USA). Full genome nucleotide sequence was determined by Sanger sequencing. Phylogenetic analysis was performed using GenBank database, using Vector NTI Advance 11 and MEGA 11 programs.
Results. The virus isolated from mosquitoes replicated efficiently in C6/36 cells, causing their death. However, it did not replicate in the mammalian cell cultures used. The isolated virus did not cause pathologic manifestations in suckling mice when infected intracerebrally. Electron microscopic examination of the purified virus-containing suspension showed the presence of spherical viral particles with a diameter of 45–55 nm. The results of full genome sequencing identified it as belonging to Dezidougou virus, first isolated in Côte d'Ivoire. The nucleotide sequence of the genome of Yakutsk 2023 strain of Dezidougou virus was deposited in GenBank (PP975071.1).
Conclusion. Dezidougou virus of genus Negevirus was isolated and characterized for the first time in the Russian Federation. Further studies on the prevalence of negeviruses, their virological features, potential importance for public health and their impact on vector competence of vectors are important and promising.

Keywords: *Dezidougou virus; negeviruses; insect specific viruses; Republic of Sakha (Yakutia)*

For citation: Stepanyuk M.A., Legostaev S.S., Karelina K.V., Timofeeva N.F., Emtsova K.F., Ohlopkova O.V., Taranov O.S., Protopopov A.V., Ternovoi V.A., Loktev V.B., Svyatchenko V.A., Agafonov A.P. Detection and characterization of the Dezidougou virus (genus Negevirus) in mosquitoes (Ochlerotatus caspius) collected in the Republic of Sakha (Yakutia). *Problems of Virology* (*Voprosy Virusologii*). 2025; 70(1): 47–56. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-280 EDN: https://elibrary.ru/pbmmdx

Funding. The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, agreement No. 075-15-2019-1665 and State Assignment 9/21.
Conflict of interest. The authors declare no apparent and potential conflicts of interest related to the publication of this article.
Ethics approval. The authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals according to the «Consensus author guidelines for animal use» 2010. The study protocol was approved by the Bioethics Committee of the State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor (Protocol No. 02 of April 03, 2023).

Введение

Исторически сложился особый интерес к вирусам, инфицирующим членистоногих, из-за их участия в распространении вирусов, патогенных для человека и животных. Изначально под понятием «вирусы, специфичные для насекомых» (insect specific viruses, ISVs) подразумевали вирусы рода *Ortoflavivirus* (семейство Flaviviridae), способные реплицироваться только в клетках насекомых, но при этом обладающие схожей организацией генома с ортофлавивирусами, патогенными для позвоночных [1, 2]. С развитием методов высокопроизводительного секвенирования были идентифицированы новые ISVs [3, 4]. К настоящему времени группа ISVs включает в себя представителей разных семейств: Baculoviridae, Poxviridae, Iridoviridae, Ascoviridae, Polydnaviridae, геном которых представлен двухцепочечной ДНК; Parvoviridae (одноцепочечная ДНК); Reoviridae, Tetraviridae,

Dicistroviridae, Nodaviridae, Picornaviridae, Flaviviridae (РНК(+)); Rhabdoviridae (РНК(−)) [1–5].

Представители рода *Negevirus* обнаружены в разных частях мира и инфицируют широкий круг гематофагов (комаров родов *Culex, Aedes* и *Anopheles*, а также москитов рода *Lutzomyia*). В то же время негевирусы генетически близки с вирусами растений из родов *Cilevirus, Higrevirus* и *Blunervirus* (Kitaviridae), что позволило выдвинуть гипотезу о роли растений в естественном цикле передачи негевирусов [6, 7]. Род *Negevirus* носит название по первому полностью охарактеризованному изоляту *Negev virus* [6]. К негевирусам на сегодняшний день относятся более 36 видов вирусов, не включая 30 неклассифицированных вирусов (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browse/).

Вирус Dezidougou (DEZV) впервые был выделен в Институте Пастера (Дакар, Сенегал) из популяции комаров *Aedes aegypti*, собранных вблизи деревни Дезидугу (Dezidougou), Кот-д'Ивуар в 1987 г. [6, 7]. Позже DEZV был обнаружен в разных частях света: Европа, Африка, Центральная и Южная Америка [6, 8, 9]. Вирионы негевирусов имеют сферическую форму диаметром 45–50 нм [6]. Геном негевирусов представлен несегментированной одноцепочечной РНК с положительным смыслом, размером 7–10 к.б. Большинство негевирусов имеют три открытые рамки считывания (open reading frame, ORF), фланкированные нетранслируемыми областями на 5'- и 3'-концах. Каждая ORF разделена короткими межгенными областями, наибольшая рамка ORF1 кодирует вирусную полимеразу, ORF2 – гликопротеин, а ORF3 – мембранные белки [7]. На конце вирусного генома присутствует поли(A)-хвост длиной от 13 до 52 п.н. [6].

Цель работы – изоляция вирусов из комаров, отобранных в Республике Саха (Якутия), а также исследование нового для России вируса DEZV, выделенного из комаров вида *Ochlerotatus caspius*, включая определение его полной нуклеотидной последовательности, филогенетическую и вирусологическую характеристики.

Материалы и методы

За полевой период 2023 г. на территории Республики Саха (Якутия) в Сайсарском (62.029955/129.668761) и Центральном районах (62.009133/129.744127) были отловлены комары в количестве 500 особей. Комаров транспортировали в сумках-холодильниках на влажной салфетке при температуре +4 °C и хранили при температуре −18–24 °C. Комаров сортировали по фенотипическим признакам и объединяли в пулы по 10 особей. Морфологическими ключами для определения рода служили: размер особи, цвет чешуек, длина лапок и строение ротового аппарата. Для определения вида комаров секвенировали фрагмент 16S рРНК и фрагмент гена *COI* митохондриального генома. Всего был исследован 51 пул комаров.

Перед гомогенизацией всех комаров промывали в 70% этаноле, а затем дважды водой для удаления потенциальных поверхностных микроорганизмов. Полученные пулы комаров *Ochlerotatus* sp. гомогенизировали в 300 мкл физиологического раствора на гомогенизаторе TissueLyser LT (Qiagen, Нидерланды).

Изоляцию вируса проводили на высокочувствительной для ISVs культуре клеток C6/36 (*Aedes albopictus*) [10–12]. Монослой выращивали до образования 80–90% конфлюентности в 24-луночном планшете (Greiner, Австрия) в среде DMEM F12 (Gibco, США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США), пенициллин 100 МЕ/мл и стрептомицин 100 мкг/мл (Gibco, США), в атмосфере с 5% CO_2 при температуре 28 °C. Культуру инфицировали отфильтрованными гомогенатами комаров и инкубировали на протяжении 7 сут, оценивая возможные проявления цитопатического эффекта (ЦПЭ). После этого планшеты с клеточными монослоями подвергали трем циклам замораживания/оттаивания, полученные суспензии осветляли от клеточного дебриса центрифугированием 8000g при 4 °C в течение 5 мин и использовали для выполнения пассажа (инфицирование свежих монослоев клеток C6/36 аналогично вышеописанному). После выявления выраженного вирусоспецифического ЦПЭ вирусными суспензиями инфицировали монослои клеток C6/36, выращенные в культуральных флаконах (Greiner, Австрия). Определение инфекционного титра полученной вируссодержащей суспензии проводили по стандартной методике на культуре C6/36 микрометодом с регистрацией результатов микроскопией и МТТ-тестом [13, 14]. Расчет титра осуществляли по методу Спирмена–Кербера [15].

Световую микроскопию выполняли с использованием инвертированного микроскопа Olympus CKX53 (Olympus, Япония), с фиксацией цифровой камерой Olympus SC50 (Olympus, Япония) при увеличении ×200 и цифровой обработкой в программе Cellsens Standard.

Для проведения электронной микроскопии вируссодержащую культуральную среду осветляли от клеток центрифугированием при 8000g в течение 10 мин для удаления остатков клеточного дебриса. Вирус концентрировали с использованием концентратора для центрифуг VivaSpin (Sartorius, Германия) в течение 30 мин при 6000g. Концентрат ресуспендировали, фиксировали формалином и наносили в виде суспензий на медные сеточки, покрытые пленкой-подложкой из формвара и стабилизированные углеродом. Препараты окрашивали 1% водным раствором уранилацетата по общепринятой методике. Образцы исследовали при помощи электронного микроскопа JEM 1400 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Анализ и обработку изображения осуществляли с помощью программного пакета iTEM (SIS, Германия).

Способность DEZV инфицировать клетки млекопитающих исследовали на перевиваемых культурах: HEK-293A (клетки почки эмбриона человека), Vero E6 (клетки почки зеленой мартышки), а также СПЭВ (клетки почки эмбриона свиньи). Монослой клеток в культуральных флаконах T-25 заражали 0,1 мл инокулята и инкубировали в поддерживающей среде

DMEM F12 с 2% FBS (фетальная бычья сыворотка) в течение 10 сут. Полученные клеточные лизаты тестировали на наличие инфекционного вирусного потомства титрованием на клеточной культуре C6/36.

Проверку восприимчивости животных к вирусу DEZV осуществляли на 2–3-дневных беспородных мышах-сосунках. Наблюдение за животными, инфицированными интрацеребрально 0,02 мл инокулята, проводили в течение 21 сут.

Скрининговое определение нуклеотидных последовательностей ISVs проводили методом высокопроизводительного секвенирования. Тотальную РНК экстрагировали с помощью «Реагент Extract RNA» («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. Водную фазу, полученную после добавления хлороформа и последующего центрифугирования, собирали и разбавляли 1 : 1 свежеприготовленным 70% этанолом и очищали на спин-колонках Cleanup Mini («Евроген», Россия) и обрабатывали Benzonaze (Merck, Германия) [16]. Синтез первой цепи кДНК проводили с использованием модуля NEBNext Ultra Directional (New England Biolabs Inc., США) для синтеза первой цепи ДНК. Синтез второй цепи ДНК выполняли с использованием UMI Second Strand Synthesis Module for QuantSeq FWD Illumina (Lexogen, Австрия). Подготовленные dsDNA библиотеки анализировали на высокопроизводительном секвенаторе MiSeq (Illumina, США). Cutadapt (версия 1.18) и SAMtools (версия 0.1.18) использовали для удаления адаптеров Illumina и повторного чтения. Контиги были собраны *de novo* с использованием ассемблера MIRA (версия 4.9.6).

Определение полной нуклеотидной последовательности РНК вируса DEZV проводили с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), используя праймеры (**Приложение 1**), комплементарные фрагментам генома исследуемого вируса. Постановку ОТ-ПЦР осуществляли на термоциклере C1000 (Bio-Rad, США) в 15 мкл реакционной смеси. Полученные ампликоны разделяли методом гель-электрофореза в 2% агарозном геле, в трис-ацетатном буфере («Евроген», Россия) с 0,1% бромида этидия (Sisco Research Laboratories, Индия).

Реакцию секвенирования по Сэнгеру проводили с использованием набора BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США), на автоматическом анализаторе 3500xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Полученные нуклеотидные последовательности выравнивали по прототипным последовательностям с использованием программного продукта UniproUGENE v. 1.48. Филогенетический анализ выполняли с использованием базы данных GenBank. Построение филогенетических деревьев выполняли в программах Vector NTI Advance 11 и MEGA 11. Филогенетические деревья были рассчитаны по методу максимального правдоподобия с использованием 500 реплик бутстрепа.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use 2010. Протокол исследования одобрен Комитетом по Биоэтике ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (Протокол № 02 от 03.04.2023).

Результаты

При попытке изоляции вирусов из гомогенатов 51 пула комаров было выполнено 3 последовательных пассажа на культуре C6/36. При выполнении 3-го пассажа на монослое клеток C6/36, соответствующему одному из используемых для инфицирования пулов, на 5-е сутки инкубации было зарегистрировано возникновение цитопатических проявлений, усиливающихся при дальнейшем инкубировании. Для подтверждения наличия вызывающего литическую инфекцию вируса выполнили дополнительный 4-й пассаж на конфлюэнтном монослое C6/36. На **рис. 1** представлены микрофотографии, иллю-

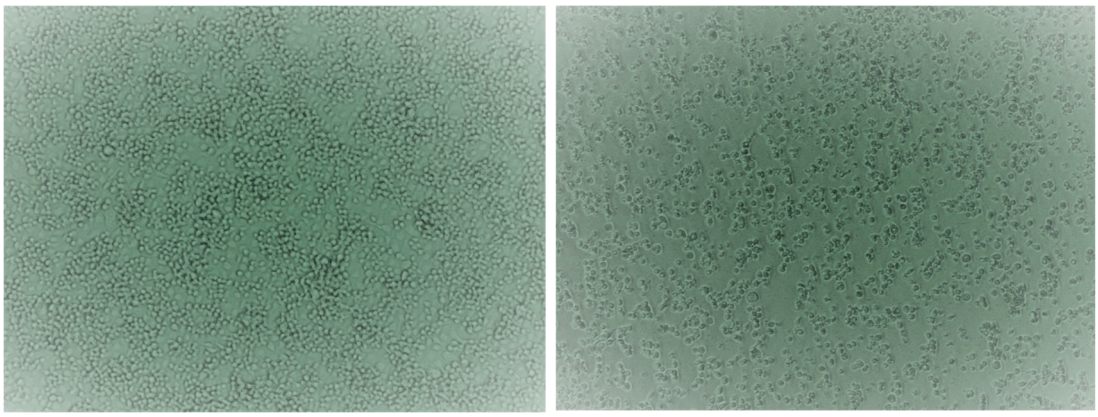

Рис. 1. Световая микроскопия (×200) культуры клеток C6/36, инфицированной штаммом DEZV Yakutsk 2023, через 120 ч после инфицирования.

Слева представлен контроль культуры клеток C6/36.

Fig. 1. Light microscopy (×200) of C6/36 cell culture infected with DEZV Yakutsk 2023 strain 120 hours after infection.

On the left is a control of C6/36 cell culture.

стрирующие наличие выраженного вирусоспецифического ЦПЭ, приводящего к 6-м суткам после инфицирования к 100% гибели клеток. Инфекционная активность выделенного вирусного изолята была определена титрованием на клеточной культуре C6/36 и составила 7,1 lg ТЦД$_{50}$/мл. Для определения формы и размеров вирусных частиц проводили электронно-микроскопическое исследование. Негативно окрашенная суспензия вируса содержала частицы преимущественно диаметром 48–52 нм, округлой формы, с более электронно-плотной областью в центральной части (**рис. 2**).

Для определения потенциальной способности выделенного вирусного изолята реплицироваться в клетках млекопитающих инфицировали клеточные культуры Vero E6, HEK-293A и СПЭВ с множественностью 10 ТЦД$_{50}$/кл и инкубировали в течение 10 сут. Вирусоспецифического воздействия на клеточные культуры не было выявлено. Клеточные лизаты вышеуказанных культур были подвергнуты титрованию на культуре C6/36. Инфекционного вируса не обнаружили. Полученные результаты доказывают неспособность выделенного вирусного изолята реплицироваться в использованных клетках млекопитающих.

Для выявления возможных патогенных свойств выделенного вируса инфицировали мышей-сосунков. Показано, что интрацеребральное инфицирование дозой 10^5 ТЦД$_{50}$/мышь не вызывало каких-либо клинических проявлений инфекции за весь период наблюдения (21 сут).

Скрининговое определение нуклеотидных последовательностей суммарной РНК из инфицированных клеток C6/36 методом секвенирования нового поколения (NGS) позволило идентифицировать фрагмент нуклеотидной последовательности, соответствующей ORF1 генома негевируса Dezidougou. Длина фрагмента составляла 471 п.н. с количеством прочтений 1465, степенью покрытия 293. Для определения полной нуклеотидной последовательности негевируса DEZV проводили секвенирование по Сэнгеру. Геном представляет собой несегментированную одноцепочечную РНК с положительным смыслом, размером 9010 п.н., имеет три открытые рамки считывания. Экспериментально определенная последовательность была депонирована в базе данных GenBank под номером: PP975071.1. Сходство нуклеотидной последовательности выделенного варианта DEZV Yakutsk 2023 с известными изолятами негевирусов приведено в **таблице**. Наиболее высокий уровень сходства (92%) по нуклеотидной последовательности DEZV Yakutsk 2023 показал в сравнении с изолятом из *Coquillettidia richiardii* из Германии (DEZV OP576003). Аналогичный показатель в сравнении с вариантом DEZV, выделенным в Испании (MT096525), составил 86%. Уровень сходства с нуклеотидными последовательностями других негевирусов был следующим: с Kustavi Negevirus (ON949944, Испания) – 69,6%, Utsjoki Negevirus 3 (ON955101, Финляндия) – 72,1%, Wallerfield virus (KX518839, Панама) и Uxmal virus (MH719095.1, Мексика) – 68%. Наличие большого количества аминокислотных замен свидетельствует о существенном генетическом разнообразии негевирусов.

На **рис. 3** представлено филогенетическое дерево с выделенным нами DEZV Yakutsk 2023 и негевирусами. Наиболее близким к DEZV Yakutsk 2023 является прототипный Dezidougou virus strain 8345 (OP576003.1) из Германии с уровнем идентичности 91,95%. Из других негевирусов наиболее близкими являются вирусы, выделенные в Финляндии (Utsjoki Negevirus 1, ON949947), Castlerea virus в Австралии (KX886280) и Ying Kou virus в Китае (isolate NC 040636.1) с уров-

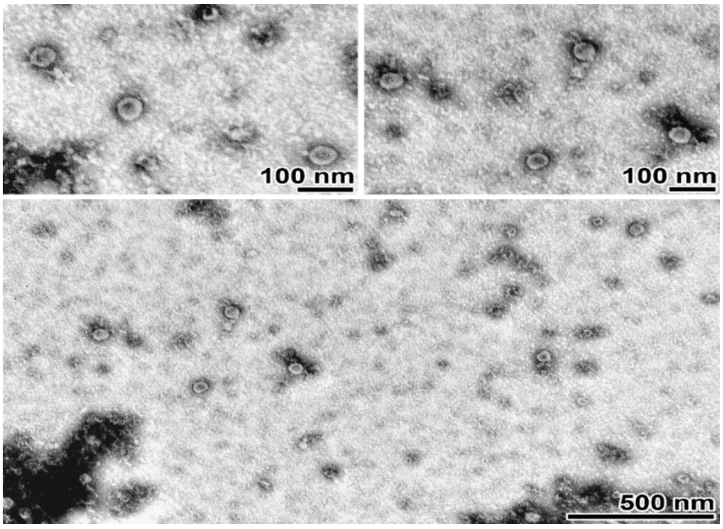

Рис. 2. Просвечивающая электронная микроскопия очищенной суспензии вируса.

Частицы округлой формы диаметром 45–55 нм и электронно-плотной областью в центральной части. Контрастирование 2% уранилацетатом. Бар указан на снимках.

Fig. 2. Transmission electron microscopy of a purified virus suspension.

Rounded particles with a diameter of 45–55 nm and an electron-dense region in the central part. Contrasted with 2% uranyl acetate. The scale is indicated on images.

Таблица. Уровни сходства (%) нуклеотидной/выведенной аминокислотной последовательностей штамма DEZV Yakutsk 2023 в сравнении с наиболее близкими штаммами негевирусов

Table. Levels of homology (%) of nucleotide/derived amino acid sequences of strain DEZV Yakutsk 2023 in comparison with the closest negevirus strains

Название штамма Name of strain	GenBank	Страна Country	Год Year	Нуклеотидная последовательность, % Nucleotide sequence, %	Аминокислотная последовательность, % Amino acid sequence, %
Dezidougou virus strain 8345	OP576003.1	Германия Germany	2014	91,95	98,40
Dezidougou virus strain ArA 20086	JQ675604.1	Кот-д'Ивуар Côte d'Ivoire	1984	85,22	96,27
Dezidougou virus strain DEZI/ Aedes africanus/SEN/ DAK-AR-41524/1984	KY968698.1	Сенегал Senegal	1984	86,24	96,18
Dezidougou virus isolate FTA2-3	MT096525.1	Испания Spain	2015	86,08	96,44
Kustavi Negevirus isolate FIN/VS-2018/100	ON949944.1	Финляндия Finland	2017	69,61	71,62
Agua Salud Negevirus isolate PA-2013-MP416-PP	MK959116.1	Панама Panama	2013	67,31	57,38
Wallerfield virus strain TR7904	NC_023440.1	Тринидад и Тобаго Trinidad and Tobago	2009	67,84	61,27
Wallerfield virus isolate PA-2013-MP416-PP	MK959117.1	Панама Panama	2013	68,16	61,45
Uxmal virus isolate UXMV-M985	MH719095.1	Мексика Mexico	2007	68,57	60,58
Utsjoki Negevirus 3 isolate FIN/L-2018/06	ON955101.1	Финляндия Finland	2015	72,14	82,15
Culex Biggie-like virus strain CBigVL/Kern	MH188028.1	США USA	2016	70,88	55,19
Culex negev-like virus 3 strain mos172X44875	NC_035129.1	Австралия Australia	2015	70,00	55,30
Tanay virus isolate 11-3, complete genome	KF425262.1	Филиппины Philippines	2005	70,02	52,82
Goutanap virus 16GH1	LC504569.1	Гана Ghana	2016	68,85	56,00

нем сходства 72,1–72,4% по нуклеотидным последовательностям.

Обсуждение

За последние десятилетия было обнаружено большое число вирусов насекомых, которые входят в различные семейства, включая вирусы, относящиеся к негевирусам.

Выделенный нами из пулов комаров, отобранных в Республике Саха (Якутия), вирус эффективно реплицировался в клетках C6/36 (*Aedes albopictus*), вызывая их гибель. При этом он был не способен инфицировать и размножаться в клеточных культурах млекопитающих (Vero E6, HEK-293A и СПЭВ). Выделенный вирус при интрацеребральном инфицировании высокой дозой не вызывал патологических проявлений у мышей-сосунков. Результаты полногеномного секвенирования определили его принадлежность к негевирусам, наибольший уровень гомологии был отмечен с Dezidougou virus, впервые выделенным в Кот-д'Ивуаре. При электронно-микроскопическом исследовании очищенной вируссодержащей суспензии показано наличие характерных для негевирусов сферических вирусных частиц диаметром 45–55 нм. В ряде исследований негевирусов было показано, что эти вирусы размножаются только в клетках членистоногих и не реплецируют в клетках позвоночных. Так, в работе [6] с вирусами Negev (NEGV), Piura (PIUV), Dezidougou (DEZV), Ngewotan (NWTV), Loreto (LORV) и Santana (SANV) авторы инфицировали клеточные культуры C6/36, Vero и BHK-21, а также новорожденных мышей (внутримозговая инокуляция). Все перечисленные вирусы были способны реплицироваться лишь в клетках C6/36 и не вызывали заболевания сосунков, что согласуется с результатами настоящего исследования.

Род *Negevirus* состоит из разнообразной группы специфичных для насекомых вирусов, с геномом,

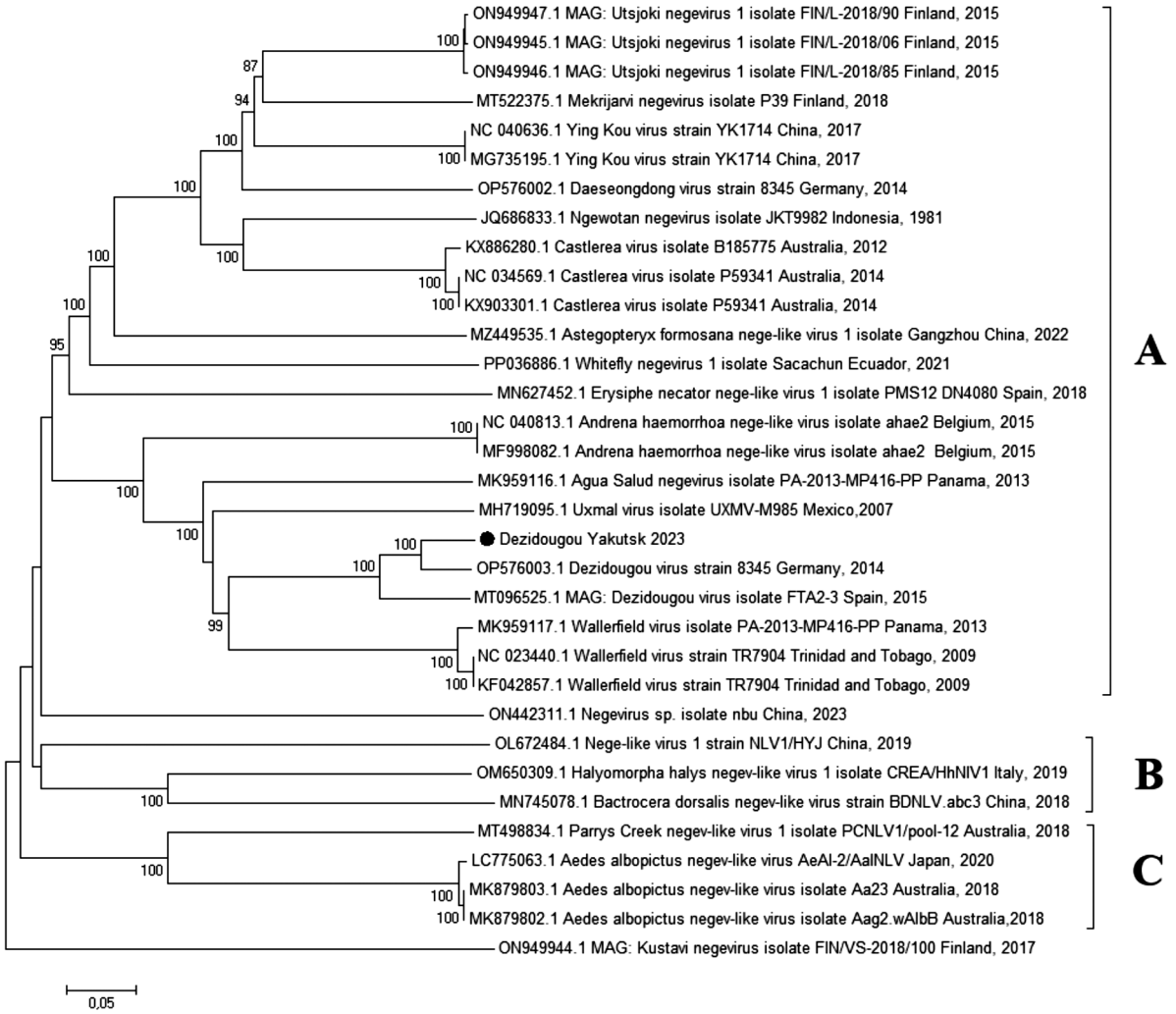

Рис. 3. Филодендрограмма, отображающая анализ максимального правдоподобия полноразмерных вирусных последовательностей DEZV и других негевирусов.

Последовательность, охарактеризованная в этом исследовании, выделена символом (●). A, B и C – основные ветви негевирусов.

Fig. 3. Phylodendrogram showing the maximum likelihood analysis of full-length viral sequences of DEZV and viruses of the genus Negevirus.

The sequence characterized in this study is highlighted with the symbol (●). A, B, and C are the main branches of negeviruses.

представленным одноцепочечной (+)РНК, выделенной от комаров и москитов-флеботоминов в Бразилии, Колумбии, Перу, Панаме, США, Германии, Испании и Непале. Данные вирусы были изолированы из пулов комаров, собранных в полевых условиях, что позволяет предположить их довольно широкую распространенность среди комаров в природе. Для большинства негевирусов характерны высокая генетическая изменчивость и наличие межвидовой передачи. Негевирусы широко географически распространены и имеют разнообразный круг хозяев среди насекомых – комары родов *Culex*, *Aedes* и *Anopheles*, москиты рода *Lutzomyia* и др. [17, 18]. Наши результаты о выделении DEZIV в Республике Саха (Якутия) в России подтверждают данные о широком географическом распространении негевирусов.

Биологическое и потенциальное значение для здравоохранения негевирусов еще предстоит определить. Поскольку негевирусы изначально были выделены из отобранных в природе комаров разных родов, которые являются переносчиками арбовирусов, то существует возможность влияния негевирусной инфекции на восприимчивость и векторную компетентность переносчиков к вирусным патогенам позвоночных. Так, экспериментально, на *Ae. aegypti* было показано, что инфицирование комаров определенными штаммами бактериального эндосимбионта *Wolbachia* препятствует репликации вируса денге и снижает компетентность переносчика [18, 19]. И если бактериальный эндосимбионт может изменить компетентность комара-переносчика к арбовирусам, то вполне вероятно, что вирусный симбионт тоже может оказывать аналогичный эффект. Счита-

ется, что ISVs также могут потенциально использоваться в качестве агентов биологического контроля с предполагаемым исключением суперинфекции патогенными для человека арбовирусами и поддержания эффекта в природе посредством трансовариальной передачи [20]. В недавней работе показано, что негевирус Piura эффективно ингибирует репликацию вируса Зика в клетках насекомых. Коинфицирование клеток C6/36 с PIUV приводило к 10 000-кратному снижению инфекционного титра вируса Зика по сравнению с моноинфицированными вирусом Зика клетками. В то же время вирус Зика не был способен ингибировать репликацию PIUV [21]. E. Patterson и соавт. [22] продемонстрировали, что вирус Negev ингибирует репликацию арбовирусов Чикунгунья и восточного энцефалита лошадей, относящихся к роду *Alphavirus*, в коинфицированных клетках комаров. Другими исследователями было показано, что специфичный для насекомых Culex Flavivirus (CxFV) Izabal не подавлял репликацию вируса Западного Нила (ВЗН) в клетках C6/36 и комарах *Culex quinquefas ciatus*. Особенно важно, что трансмиссионная эффективность в отношении ВЗН была усилена у инфицированных CxFV комаров [23].

Ранее экспериментально было показано, что негевирусы обнаруживаются в слюнных железах насекомых и, значит, существует потенциальная возможность передачи вируса позвоночному хозяину во время кормления [24, 25]. Следовательно, люди и другие позвоночные могут иметь контакт с негевирусами, что повышает вероятность некоторых из них адаптироваться и, в конечном итоге, сформироваться уже как условный патоген позвоночных. Существует обоснованное предположение о том, что многие вирусы позвоночных, передающиеся членистоногими, первоначально были специфичными для насекомых [7]. Предположение о том, что ISVs являются предками арбовирусов, делает эти вирусы потенциальным инструментом для изучения эволюции перехода от одного хозяина к другим.

Заключение

Впервые на территории Российской Федерации в пуле комаров, отобранных в Республике Саха (Якутия), был идентифицирован и выделен вирус, относящийся к негевирусам. Выделенный штамм негевируса DEZV Yakutsk 2023 эффективно реплицировался в клетках C6/36 (*Ae. albopictus*), вызывая их гибель. При этом он был не способен инфицировать и размножаться в использованных клеточных культурах млекопитающих и не вызывал патологических проявлений у мышей-сосунков при интрацеребральном инфицировании. Методом NGS и секвенированием по методу Сэнгера установлена полная нуклеотидная последовательность вирусного генома DEZV Yakutsk 2023 и проведен филогенетический анализ.

Дальнейшее исследование распространенности негевирусов, их вирусологических особенностей, потенциального значения для здравоохранения и влияния на векторную компетентность переносчиков представляется важным и перспективными.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kuno G. A survey of the relationships among the viruses not considered arboviruses, vertebrates, and arthropods. *Acta Virol.* 2004; 48(3): 135–44.
2. Calzolari M., Zé-Zé L., Vázquez A., Sánchez Seco MP., Amaro F., Dottori M. Insect-specific flaviviruses, a worldwide widespread group of viruses only detected in insects. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 40: 381–8. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.032
3. Roundy CM., Azar SR., Rossi SL., Weaver SC., Vasilakis N. Insect-specific viruses: a historical overview and recent developments. *Adv. Virus Res.* 2017; 98: 119–46. https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.10.001
4. Blitvich B.J., Firth A.E. Insect-specific flaviviruses: a systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. *Viruses*. 2015; 7(4): 1927–59. https://doi.org/doi: 10.3390/v7041927
5. Carvalho V.L., Long M.T. Insect-specific viruses: an overview and their relationship to arboviruses of concern to humans and animals. *Virology*. 2021; 557: 34–43. https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.01.007
6. Vasilakis N., Forrester N.L., Palacios G., Nasar F., Savji N., Rossi SL., et al. Negevirus: a proposed new taxon of insect-specific viruses with wide geographic distribution. *J. Virol.* 2013; 87(5): 2475–88. https://doi.org/10.1128/JVI.00776-12
7. Nunes M.R.T., Contreras-Gutierrez M.A., Guzman H., Martins L.C., Barbirato M.F., Savit C., et al. Genetic characterization, molecular epidemiology, and phylogenetic relationships of insect-specific viruses in the taxon Negevirus. *Virology.* 2017; 504: 152–67. https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.01.022
8. Auguste A.J., Carrington C.V.F., Forrester N.L., Popov V.L., Guzman H., Widen S.G., et al. Characterization of a novel Negevirus and a novel Bunyavirus isolated from Culex (Culex) declarator mosquitoes in Trinidad. *J. Gen. Virol.* 2014; 95(Pt. 2): 481–5. https://doi.org/10.1099/vir.0.058412-0
9. Truong Nguyen P.T., Culverwell C.L., Suvanto M.T., Korhonen E.M., Uusitalo R., Vapalahti O., et al. Characterisation of the RNA virome of nine Ochlerotatus species in Finland. *Viruses*. 2022; 14(7): 1489. https://doi.org/10.3390/v14071489
10. da Silva Ribeiro A.C., Martins L.C., da Silva S.P., de Almeida Medeiros D.B., Miranda K.K.P., Nunes Neto J.P., et al. Negeviruses isolated from mosquitoes in the Brazilian Amazon. *Virol. J.* 2022; 19(1): 17. https://doi.org/10.1186/s12985-022-01743-z
11. Hermanns K., Marklewitz M., Zirkel F., Overheul G.J., Page R.A., Loaiza J.R., et al. Agua Salud alphavirus defines a novel lineage of insect-specific alphaviruses discovered in the New World. *J. Gen. Virol.* 2020; 101(1): 96–104. https://doi.org/10.1099/jgv.0.001344
12. Auguste A.J., Langsjoen R.M., Porier D.L., Erasmus J.H., Bergren N.A., Bolling B.G., et al. Isolation of a novel insect-specific flavivirus with immunomodulatory effects in vertebrate systems. *Virology*. 2021; 562: 50–62. https://doi.org/10.1016/j.virol.2021.07.004
13. Svyatchenko V., Nikonov S., Mayorov A., Gelfond M., Loktev V. Antiviral photodynamic therapy: Inactivation and inhibition of SARS-CoV-2 in vitro using methylene blue and Radachlorin. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2021; 33: 102112. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102112
14. Toth K., Spencer J., Dhar D., Sagartz J., Buller R., Painter G., et al. Hexadecyloxypropyl-cidofovir, CMX001, prevents adenovirus induced mortality in a permissive, immunosuppressed animal model. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2008; 105(20): 7293–97. https://doi.org/10.1073/pnas.0800200105
15. Lei C., Yang J., Hu J., Sun X. On the calculation of TCID 50 for quantitation of virus infectivity. *Virol. Sin.* 2021; 36(1): 141–4. https://doi.org/10.1007/s12250-020-00230-5
16. Rodgers MA., Wilkinson E., Vallari A., McArthur C., Sthreshley L., Brennan CA., et al. Sensitive next-generation sequencing method reveals deep genetic diversity of HIV-1 in the Democratic Republic of the Congo. *J. Virol.* 2017; 91(6): e01841-16. https://doi.org/10.1128/JVI.01841-16

17. Walker T., Jeffries C.L., Mansfield K.L., Johnson N. Mosquito cell lines: history, isolation, availability and application to assess the threat of arboviral transmission in the United Kingdom. *Parasit. Vectors.* 2014; 7: 382. https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-382
18. Müller G., Schlein Y. Plant tissues: the frugal diet of mosquitoes in adverse conditions. *Med. Vet. Entomol.* 2005; 19(4): 413–22. https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2005.00590.x
19. Moreira L.A., Iturbe-Ormaetxe I., Jeffery J.A., Lu G., Pyke A.T., Hedges L.M., et al. A Wolbachia symbiont in Aedes aegypti limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell.* 2009; 139(7): 1268–78. https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042
20. Öhlund P., Lundén H., Blomström A.L. Insect-specific virus evolution and potential effects on vector competence. *Virus Genes*. 2019; 55(2): 127–37. https://doi.org/10.1007/s11262-018-01629-9
21. Carvalho V.L., Prakoso D., Schwarz E.R., Logan T.D., Nunes B.T.D., Beachboard S.E., et al. Negevirus Piura suppresses Zika virus replication in mosquito cells. *Viruses.* 2024; 16(3): 350. https://doi.org/10.3390/v16030350
22. Patterson EI., Kautz TF., Contreras-Gutierrez MA., Guzman H., Tesh RB., Hughes GL. Negeviruses reduce replication of alphaviruses during coinfection. *J. Virol.* 2021; 95(14): e0043321. https://doi.org/10.1128/JVI.00433-21
23. Kent R.J., Crabtree M.B., Miller B.R. Transmission of West Nile virus by Culex quinquefasciatus say infected with Culex Flavivirus Izabal. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 4(5): e671. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000671
24. Higgs S., Beaty B.J. Natural cycles of vector-borne pathogens. In: Marquardt M.C., ed. *Biology of Disease Vectors.* New York: Elsevier Academic Press; 2005: 167–85.
25. Guerrero D., Cantaert T., Missé D. Aedes mosquito salivary components and their effect on the immune response to arboviruses. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020; 10: 407. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00407

Информация об авторах:

Степанюк Марина Алексеевна – младший научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия. E-mail: stepanyuk_ma@vector.nsc.ru; https://orcid.org/0009-0002-2658-7746

Легостаев Станислав Сергеевич – стажер-исследователь отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия. E-mail: legostaev_ss@vector.nsc.ru; https://orcid.org/0000-0002-6202-445x

Карелина Кристина Вячеславовна – стажер-исследователь отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия. E-mail: karelina_kv@vector.nsc.ru; https://orcid.org/0009-0003-1421-1765

Тимофеева Нина Федоровна – научный сотрудник УНТЛ «Технологии полимерных нанокомпозитов» ФГАОУ ВО СВФУ им. М.К. Аммосова, Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия. E-mail: niakswan@mail.ru; https://orcid.org/0000-0001-9895-5873

Емцова Ксения Федоровна – стажер-исследователь отдела микроскопических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия. E-mail: k.emtsova@g.nsu.ru; https://orcid.org/0009-0003-5165-5357

Охлопкова Олеся Викторовна✉ – канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела биофизики и экологических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия. E-mail: ohlopkova_ov@vector.nsc.ru; https://orcid.org/0000-0002-8214-7828

Таранов Олег Святославович – заведующий отделом микроскопических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия. E-mail: taranov@vector.nsc.ru; https://orcid.org/0000-0002-6746-8092

Протопопов Альберт Васильевич – д-р биол. наук, главный научный сотрудник ФГАОУ ВО СВФУ им. М.К. Аммосова, Якутск, Республика Саха (Якутия), Россия. E-mail: a.protopopov@mail.ru; https://orcid.org/0000-0001-6543-4596

Терновой Владимир Александрович – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия. E-mail: tern@vector.nsc.ru; https://orcid.org/0000-0003-1275-171x

Локтев Валерий Борисович – д-р биол. наук, профессор, академик РАЕН, главный научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия. E-mail: loktev@vector.nsc.ru; https://orcid.org/0000-0002-0229-321x

Святченко Виктор Александрович – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия. E-mail: svyat@vector.nsc.ru; https://orcid.org/0000-0002-2729-0592

Агафонов Александр Петрович – д-р биол. наук, генеральный директор ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Россия. E-mail: agafonov@vector.nsc.ru; https://orcid.org/0000-0003-2577-0434

Участие авторов: Терновой В.А., Локтев В.Б., Святченко В.А. – концепция и дизайн исследования; Степанюк М.А., Легостаев С.С. – проведение экспериментов; Святченко В.А. – координация и анализ вирусологического этапа работы; Степанюк М.А., Карелина К.В. – сборка нуклеотидных последовательностей и публикация в базе данных; Степанюк М.А., Терновой В.А. – филогенетический анализ и интерпретация данных; Степанюк М.А., Охлопкова О.В., Тимофеева Н.Ф., Протопопов А.В. – сбор биоматериала; Емцова К.Ф., Таранов О.С. – микроскопические исследования; Степанюк М.А., Охлопкова О.В., Терновой В.А., Локтев В.Б., Святченко В.А. – подготовка рукописи, рецензирование текста и полученных результатов, оформление текста; Агафонов А.П. – администрирование, координация, финальное редактирование рукописи.

Поступила 17.11.2024
Принята в печать 10.01.2025
Опубликована 28.02.2025

Information about the authors:

Marina A. Stepanyuk – junior researcher of the department of molecular virology of flaviviruses and viral hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: stepanyuk_ma@vector.nsc.ru; https://orcid.org/0009-0002-2658-7746

Stanislav S. Legostaev – trainee researcher of the department of molecular virology of flaviviruses and viral hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: legostaev_ss@vector.nsc.ru; https://orcid.org/0000-0002-6202-445x

Kristina V. Karelina – trainee researcher of the department of molecular virology of flaviviruses and viral hepatitis, State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: karelina_kv@vector.nsc.ru; https://orcid.org/0009-0003-1421-1765

Nina F. Timofeeva – Researcher at the Department of Polymer Nanocomposites Technologies at M.K. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Sakha Republic, Russia. E-mail: niakswan@mail.ru; https://orcid.org/0000-0001-9895-5873

Ksenia F. Emtsova – trainee researcher of microscopic research department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: k.emtsova@g.nsu.ru; https://orcid.org/0009-0003-5165-5357

Olesia V. Ohlopkova✉ – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Department of Biophysics and Environmental Research, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: ohlopkova_ov@vector.nsc.ru; https://orcid.org/0000-0002-8214-7828

Oleg S. Taranov – head of microscopic research department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: taranov@vector.nsc.ru; https://orcid.org/0000-0002-6746-8092

Albert V. Protopopov – Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher, M.K. Ammosov North-Eastern Federal University, Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), Russia. E-mail: a.protopopov@mail.ru; https://orcid.org/0000-0001-6543-4596

Vladimir A. Ternovoi – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, Department of Molecular Virology of Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: tern@vector.nsc.ru; https://orcid.org/0000-0003-1275-171x

Valery B. Loktev – MD, PhD, DSc, Prof., academician RANS, Chief Researcher, Department of Molecular Virology of Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: loktev@vector.nsc.ru; https://orcid.org/0000-0002-0229-321x

Victor A. Svyatchenko – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, Department of Molecular Virology of Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: svyat@vector.nsc.ru; https://orcid.org/0000-0002-2729-0592

Alexander P. Agafonov – Doctor of Biological Sciences, Director General, Federal Biotechnology and Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: agafonov@vector.nsc.ru; https://orcid.org/0000-0003-2577-0434

Contribution: Ternovoy V.A., Loktev V.B., Svyatchenko V.A. – concept and design of the study; Stepanyuk M.A., Legostaev S.S. – conducting experiments; Svyatchenko V.A. – coordination and analysis of the virological stage of work; Stepanyuk M.A., Karelina K.V. – assembly of nucleotide sequences and publication in the database; Stepanyuk M.A., Ternovoy V.A. – phylogenetic analysis and interpretation of data; Stepanyuk M.A., Ohlopkova O.V., Timofeeva N.F., Protopopov A.V. – collection of biomaterial; Emtsova K.F., Taranov O.S. – microscopic studies; Stepanyuk M.A., Ohlopkova O.V., Ternovoy V.A., Loktev V.B., Svyatchenko V.A. – preparation of the manuscript, review of the text and obtained results, text design; Agafonov A.P. – administration, coordination, final editing of the manuscript. Received

Reseived 17 November 2024
Accepted 10 January 2025
Published 28 February 2025

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-286
© БУТЫРСКИЙ А.Ю., МОРОЗОВА Е.Н., САРКИСЯН К.А., 2025

Оценка возможности определения количественного содержания гемагглютинина в готовой лекарственной форме инактивированных вакцин для профилактики гриппа, содержащих адъювант

Бутырский А.Ю.✉, Морозова Е.Н., Саркисян К.А.

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

Резюме
Введение. Основным показателем качества, обеспечивающим эффективность вакцин для профилактики гриппа, является специфическая активность. Определение показателя в гриппозной вакцине, содержащей адъювант Совидон, проводят в полуфабрикате – тривакцине до добавления адъюванта. Настоящий подход имеет ряд недостатков. Важное значение для выпуска в гражданский оборот лекарственного препарата, соответствующего требованиям нормативной документации, имеет оценка статистической управляемости производственного процесса по результатам контроля показателя «специфическая активность».
Цель работы **–** оценка сопоставимости результатов количественного определения гемагглютинина в полуфабрикате вакцины для профилактики гриппа и в готовой лекарственной форме; анализ результатов контроля показателя качества «специфическая активность» для оценки статистической управляемости производственного процесса.
Материалы и методы. Для исследования методом одиночной радиальной иммунодиффузии использовали полуфабрикат вакцины для профилактики гриппа (тривакцина до добавления адъюванта Совидон) и соответствующие серии готовой лекарственной формы. Расчет содержания гемагглютинина проводили при помощи программного обеспечения SIAMS Photolab. Для построения контрольных карт Шухарта (X-карты) в программе Microsoft Excel применяли паспортные данные предприятия – производителя лекарственного препарата.
Результаты. Статистический анализ показал, что результаты количественного определения гемагглютинина в полуфабрикате вакцины и готовой форме лекарственного препарата достоверно не отличаются (при уровне значимости $p < 0,05$). Анализ контрольных карт Шухарта показал наличие критериев, свидетельствующих о тенденциях к выходу производственного процесса из состояния статистической управляемости.
Заключение. Показана принципиальная возможность и обоснована целесообразность определения количественного содержания гемагглютинина в готовой лекарственной форме вакцины, содержащей адъювант Совидон. Выявленные тренды при анализе контрольных карт Шухарта являются основанием для установления причины выхода производственного процесса из состояния статистической управляемости и анализа рисков выпуска в гражданский оборот серий вакцины, не соответствующих установленным требованиям.

Ключевые слова: *вакцины для профилактики гриппа; гемагглютинин вируса гриппа; одиночная радиальная иммунодиффузия; специфическая активность; адъювант; карты Шухарта; статистическое управление процессами*

Для цитирования: Бутырский А.Ю., Морозова Е.Н., Саркисян К.А. Оценка возможности определения количественного содержания гемагглютинина в готовой лекарственной форме инактивированных вакцин для профилактики гриппа, содержащих адъювант. *Вопросы вирусологии*. 2025; 70(1): 57–65. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-286 EDN: https://elibrary.ru/itvlmz

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200103-5).
Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ORIGINAL STUDY ARTICLE
DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-286

The evaluation of the possibility of the estimation the amount of hemagglutininin in the final lots of inactivated adjuvanted influenza vaccines

Aleksey Yu. Butirskiy✉, Elena N. Morozova, Karine A. Sarkisyan

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

Abstract
Introduction. The main quality indicator for inactivated influenza vaccines is their potency (the amount of hemagglutinin). The potency test for the influenza vaccine with the SOVIDON adjuvant is carried out in a trivalent bulk vaccine before the addition of the adjuvant. This approach has its fair share of drawbacks. The analysis of the statistical process control and stability by control charts plays an important role in the release of influenza vaccines.
The aim of the study is to compare the results of hemagglutinin quanitation in the trivalent bulk vaccine and in the final lots of influenza vaccine with SOVIDON adjuvant; as well as the analysis of the potency test results to evaluate the statistical process control.
Materials and methods. This study covered the inactivated influenza vaccine with the SOVIDON adjuvant. Both the trivalent bulks vaccine before the addition of the adjuvant and the final lots were investigated by single radial immunodiffusion assay. The software SIAMS Photolab was used to calculate the amount of hemagglutinin. Microsoft Excel was used to create the control charts using the data of the manufacturer.
Results. The data of the study confirm the absence of statistically significant differences ($p < 0.05$) of the content of hemagglutinin in the trivalent bulks and the final lots of the influenza vaccine. The analysis of control charts showed the presence of out-of-control signals.
Conclusion. The study has shown the possibility and feasibility of the potency testing of the influenza vaccine with the SOVIDON adjuvant. The presence of out-of-control signals on the control charts is the basis for the identification of the reasons behind the changes and for the analysis of risks of the release of a defective influenza vaccine.

Keywords: *influenza vaccines; the hemagglutinin of influenza virus; a single radial immunodiffusion (SRID); the potency of vaccine; adjuvant; Shewhart charts; Statistical process control*

For citation: Butirskiy A.Yu., Morozova E.N., Sarkisyan K.A. Evaluation of the possibility of determining the quantitative content of hemagglutinin in the final lots of inactivated and adjuvanted influenza vaccines. *Problems of Virology* (*VoprosyVirusologii*). 2025; 70(1): 57–65. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-286 EDN: https://elibrary.ru/itvlmz

Funding. This study was conducted within the framework of the State assignment of Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products No.056-00026-24-01 for conducting applied research (Agreement No.124022200103-5).
Conflict of interest. The authors declare no apparent and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Введение

Грипп до настоящего времени остается инфекционным заболеванием, представляющим особую значимость для практического здравоохранения. По данным Роспотребнадзора, заболеваемость гриппом за период 2017–2021 гг. варьировала в диапазоне от 14,96 (2021 г.) до 37,31 (2019 г.) случая на 100 тыс. населения, а в последние 2 года регистрировался резкий ее подъем: 60,8 и 166,94 случая на 100 тыс. населения в 2022–2023 гг. соответственно [1]. Экономический ущерб в Российской Федерации в 2023 г. от гриппа составил 9 813 451,4 тыс. рублей[1]. В первую очередь эпидемиологическая и социальная значимость гриппа определяется высокой контагиозностью инфекции, широкой восприимчивостью населения к возбудителю инфекции, значительной частотой осложнений у пациентов из самых уязвимых слоев (дети в возрасте до 14 лет, пациенты старше 65 лет, беременные женщины, пациенты с легочными и сердечно-сосудистыми хроническими заболеваниями). В этой связи важнейшим мероприятием, показавшим высокую эффективность для управления гриппозной инфекцией, является ежегодная всероссийская прививочная кампания против гриппа. Установлено, что вакцинация в случае совпадения вакцинных и циркулирующих штаммов вируса гриппа на 90% снижает заболеваемость гриппом, на 56% – других ОРВИ, на 48% – число госпитализаций, связанных с осложнениями после перенесенного заболевания [2]. С учетом рекомендаций Всемирной организации здравоохранения охват прививками против гриппа в группах риска должен быть не менее 75%; охват прививками против гриппа населения в целом по стране и по субъектам Рос-

[1]Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 году». М.; 2024..

сийской Федерации в отдельности – не менее 45%[2]. За последние 5 лет количество привитых ежегодно колебалось в пределах 69 122 430–85 898 810 (абс. значения). Обращает на себя внимание подъем заболеваемости в последние 2 года, несмотря на то что охват населения прививками не снижался по сравнению с 2021 г., когда регистрировался минимальный уровень заболеваемости за десятилетие. В этих условиях пристального внимания требует выпуск в гражданский оборот гриппозных вакцин, соответствующих всем показателям качества. Основным показателем качества, обеспечивающим профилактическую эффективность гриппозных вакцин, является специфическая активность. Данный показатель характеризуется количественным содержанием гемагглютининов подтипов и типов вируса гриппа, актуальных на текущий эпидемический сезон и входящих в состав вакцины. Помимо общепринятой классификации гриппозных вакцин, в зависимости от типа производства (цельновирионные, расщепленные, субъединичные вакцины) отечественные вакцины можно классифицировать по составу вспомогательных веществ: содержащие адъювант и не содержащие адъювант.

В состав адъювантных вакцин для профилактики гриппа, зарегистрированных на сегодняшний день в Российской Федерации, входит один из двух возможных адъювантов: азоксимера бромид или Совидон.

В соответствии с требованиями Государственной фармакопеи Российской Федерации[3], для контроля показателя качества «специфическая активность» вакцин для профилактики гриппа используется метод одиночной радиальной иммунодиффузии (ОРИД), предложенный J.M. Wood и соавт. и внедренный в 1978 г. в рутинную практику контроля вакцин [3, 4]. Важным условием, обеспечивающим правильность получения достоверных результатов испытания, является образование на пластине колец преципитации в лунках с испытуемым образцом, сопоставимых по характеристикам (четкость границ, диаметр колец) с кольцами преципитации в лунках со стандартным образцом. В зависимости от состава гриппозной вакцины адъювант, входящий в ее состав, может изменять вид колец преципитации, что в свою очередь может влиять на правильность измерения диаметра зон преципитации. Например, при определении количества гемагглютинина в готовой вакцине, содержащей адъювант азоксимера бромид, образуемые кольца преципитации характеризуются размытым контуром, сливающимся с внутренним фоном, что не позволяет корректно установить границы считывания и получить достоверные результаты испытания. Следует отметить, что производителем показана возможность контроля показателя в готовом препарате, однако предложенный метод предусматривает особые условия отмывки пластин с агарозой и увеличивает время испытания на несколько суток.

В 2012 г. была зарегистрирована отечественная вакцина для профилактики гриппа, содержащая адъювант Совидон [5]. В соответствии с действующей нормативной документацией на препарат выпускающий контроль качества по показателю «специфическая активность» проводят на образцах полуфабриката (субъединичной тривакцины до добавления адъюванта). Существенным недостатком использования полуфабриката в качестве объекта испытания является короткий срок годности (от 3 до 6 мес), что ограничивает его применение для изучения стабильности вакцин для профилактики гриппа на протяжении срока годности готовой лекарственной формы или при расследовании рекламаций с мест применения. Количество гемагглютинина в готовой лекарственной форме определяют расчетным методом: путем умножения значения, полученного при определении в полуфабрикате, на определенный коэффициент, зависящий от объема добавляемого адъюванта. Однако данный подход не учитывает вероятность нарушений в производственном процессе на этапе добавления адъюванта и последующих стадиях, которые могут влиять на фактическое содержание гемагглютинина в готовом препарате. В этой связи предпочтительным является проведение испытания по показателю «специфическая активность» на образцах готовой лекарственной формы [6].

В последние годы все большее признание получает идеология «фармацевтическая система качества» (ФСК), представленная впервые на Международной конференции по гармонизации требований к регистрации лекарственных средств для медицинского применения (ICH) в Брюсселе. На сегодняшний день выделяют 4 основных элемента ФСК: 1) мониторинг процессов и качества продукции; 2) система корректирующих и предупреждающих действий; 3) управление изменениями; 4) анализ со стороны руководства [7]. Одним из наглядных инструментов оценки качества выпускаемых в гражданский оборот вакцин для профилактики гриппа является оценка статистической управляемости производственного процесса путем построения и анализа контрольных карт Шухарта. Известно, что производственный процесс находится на приемлемом и стабильном уровне, позволяющем обеспечить соответствие качества продукции регламентированным требованиям, если его изменчивость обусловлена случайными причинами, действующими постоянно и трудно поддающимися обнаружению. Своевременное выявление отклонений от установленных контрольных границ позволяет незамедлительно провести анализ производственных рисков и предотвратить выпуск некачественной вакцины [8, 9].

Цель настоящей работы – оценить сопоставимость результатов количественного определения гемагглютинина в полуфабрикате вакцины и в готовой лекар-

[2]СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

[3]«ФС.3.3.1.0028.20. Фармакопейная статья. Вакцина гриппозная инактивированная» (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 28.07.2020 № 751).

ственной форме, провести анализ результатов контроля показателя качества «специфическая активность» по паспортным данным для оценки статистической управляемости производственного процесса с помощью контрольных карт Шухарта.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования использовали 31 серию полуфабрикатов (тривакцины до добавления адъюванта Совидон) и соответствующих им серий готовой лекарственной формы вакцины для профилактики гриппа, содержащей адъювант Совидон. В качестве стандартных образцов (антигенов) использовали стандартные образцы, предусмотренные нормативной документацией на испытуемую вакцину, охарактеризованные по количественному содержанию гемагглютинина соответствующих штаммов вируса гриппа: подтипа A/Victoria/4897/2022 (IVR-238) (H1N1), подтипа A/Thailand/8/2022 (H3N2) IVR-237, типа B/Austria/1359417/2021 (BVR-26) (Victoria lineage). В качестве стандартных образцов (сывороток) использовали стандартные сыворотки, содержащие антитела к гемагглютинину вируса гриппа подтипов A(H1N1), A(H3N2) и типа B, гомологичные стандартным антигенам.

Испытания проводили методом ОРИД в соответствии с методикой, изложенной в нормативной документации на лекарственный препарат. Основные этапы методики включали в себя: 1) приготовление пластин с 1,5% агарозой, содержащей соответствующую стандартную сыворотку; 2) смешивание испытуемых образцов с детергентом и инкубацию не менее 30 мин при комнатной температуре; 3) приготовление разведений испытуемых образцов с буферным раствором в соотношении 1 : 0, 3 : 1, 1 : 1, 1 : 3; 4) внесение разведений испытуемых образцов в объеме 20 мкл в лунки пластины с агарозой; 5) инкубацию пластин не менее 18 ч во влажной камере при температуре 20 ± 5 °C; 6) окрашивание пластин с последующей отмывкой от излишков красителя до проявления линий преципитаций; 7) учет результатов при помощи программного обеспечения SIAMS Photolab.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием программного обеспечения StatPlus (version 7). Нормальность распределения оценивали по критерию Шапиро–Уилка, для оценки равенства дисперсий в сравниваемых группах использовали тест Левена. Статистическую значимость различий в группах с нормальным распределением данных определяли по критерию Стьюдента (*t*-тест для двух независимых выборок) при уровне значимости $p < 0,05$; в группах с ненормальным распределением данных – по критерию Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0,05$.

Построение контрольных карт Шухарта проводили в программе Microsoft Excel, одна точка на графике соответствует количественному содержанию гемагглютинина в одной серии лекарственного препарата по данным предприятия-производителя. Для расчета верхней (UCL) и нижней (LCL) контрольных границ, значений стандартного отклонения процесса (σ) руководствовались общепринятыми требованиями[4].

Требования ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015 предусматривают использование 8 критериев для оценки статистической управляемости производственного процесса:

– критерий 1 – одна точка вне зоны A;
– критерий 2 – 9 точек подряд в зоне C или по одну сторону от центральной линии;
– критерий 3 – 6 возрастающих или убывающих точек подряд;
– критерий 4 – 14 попеременно возрастающих и убывающих точек;
– критерий 5 – 2 из 3 последовательных точек в зоне A;
– критерий 6 – 4 из 5 последовательных точек в зоне B или вне ее;
– критерий 7 – 15 последовательных точек в зоне C, выше или ниже центральной линии;
– критерий 8 – 8 последовательных точек по обеим сторонам центральной линии и ни одной в зоне C.

Критерии 1, 2, 3, 7 расценивали как критические, 4, 5, 6, 8 – как предупреждающие.

Результаты

При учете результатов обращали внимание на визуальные характеристики колец преципитации, образовавшихся вокруг лунок с внесенными образцами. Основными критериями приемлемости результатов на этапе визуального анализа являлись: сопоставимость колец преципитации, полученных при внесении в лунки пластин образцов тривакцины (эталон сравнения) и образцов лекарственного препарата; соответствие интенсивности колец преципитации для испытуемых образцов интенсивности колец преципитации для стандартных образцов (антигенов); отсутствие двойных колец преципитации во всех лунках пластины. В качества эталона сравнения использовали кольца преципитации, образующиеся при взаимодействии стандартной сыворотки с антигеном, содержащимся в тривакцине и стандартном антигене. Особое внимание уделяли интенсивности колец и четкости их границ.

В случае соблюдения вышеуказанных критериев проводили построение графиков зависимости квадратов диаметров колец преципитации от разведений испытуемого образца/стандартного образца (антигена) и расчет количественного содержания гемагглютинина в образцах при помощи специализированного программного обеспечения. Графики представляют собой прямые линии, построенные методом наименьших квадратов. На данном этапе учитывали критерии приемлемости результатов испытания: отсутствие пересечения графиков, построенных для стандартного образца и испытуемого образца; расстояние между

[4]«ГОСТ Р ИСО 7870-2-2015. Национальный стандарт Российской Федерации. Статистические методы. Контрольные карты. Часть 2. Контрольные карты Шухарта».

начальными точками графиков (разведение 1 : 3) – не более 3 мм^2. Для пересчета в готовом лекарственном препарате полученное содержание гемагглютинина в тривакцине умножали на 0,9 (коэффициент, представляющий собой частное, полученное от деления объема серии тривакцины до добавления адъюванта (мл) на объем серии вакцины после добавления адъюванта).

Полученные данные оценивали на нормальность распределения при помощи критерия Шапиро–Уилка (**табл. 1**). Если уровень значимости (p) > 0,05, то распределение относили к нормальному.

Для изучения возможности определения количественного содержания гемагглютинина в образцах готовой лекарственной формы вакцины для профилактики гриппа была проведена статистическая оценка достоверности различий в попарно сравниваемых группах (тривакцина/лекарственный препарат). Результаты представлены в **табл. 2, 3**. Выводы о достоверности различий делали по уровню значимости: если p > 0,05, то различия в сравниваемых группах отсутствуют.

Результаты статистического анализа экспериментальных данных показали, что в 2 случаях попарно сравниваемые группы (группы 1 и 2, 5 и 6) имели нормальный характер распределения и в 1 случае (группы 3 и 4) – ненормальный характер, что обусловило разный выбор статистических критериев для оценки различий между 2 независимыми выборками: критерий Стьюдента для нормального распределения

Таблица 1. Оценка нормальности распределения значений, характеризующих содержание гемагглютининов вируса гриппа в испытуемых образцах

Table 1. Evaluation for normality of distribution of hemagglutinin content in test samples

№ группы Group No.	Объект испытания Test sample	Вакцинный штамм Vaccine strain	Среднее значение Mean value	Критерий Шапиро–Уилка (W) Shapiro–Wilk criterion (W)	p	Характер распределения Normality of distribution
1	Тривакцина Trivaccine	A/Victoria (H1N1)	5,205 (n = 31)	0,948	0,141	Нормальный Normal
2	Лекарственный препарат Drug	A/Victoria (H1N1)	5,186 (n = 31)	0,961	0,312	Нормальный Normal
3	Тривакцина Trivaccine	A/Thailand (H3N2)	5,539 (n = 31)	0,902	0,008	Ненормальный Abnormal
4	Лекарственный препарат Drug	A/Thailand (H3N2)	5,542 (n = 31)	0,927	0,037	Ненормальный Abnormal
5	Тривакцина Trivaccine	B/Austria	11,185 (n = 30)	0,962	0,345	Нормальный Normal
6	Лекарственный препарат Drug	B/Austria	11,160 (n = 30)	0,958	0,268	Нормальный Normal

Таблица 2. Оценка достоверности различий содержания гемагглютинина в сериях тривакцины и лекарственного препарата для штаммов вирусов гриппа A/Victoria (H1N1), B/Austria с использованием критерия Стьюдента

Table 2. The evaluation of hemagglutinin content in test samples (strain A/Victoria (H1N1), strain B/Austria) by t-test (Student test)

№ групп Group No.	Среднее (тривакцина) Mean (trivaccine)	Среднее (лекарственный препарат) Mean (final lot)	Критерий Стьюдента (t) Student test (t)	p	Вывод о достоверности различий Conclusion on the reliability of differences
1, 2	5,205	5,186	0,189	0,851	Отсутствуют None
5, 6	11,185	11,160	0,108	0,914	Отсутствуют None

Таблица 3. Оценка достоверности различий содержания гемагглютинина в сериях тривакцины и лекарственного препарата для штамма вируса гриппа A/Thailand (H3N2) с использованием критерия Манна–Уитни

Table 3. The evaluation of hemagglutinin content in test samples (strain A/Thailand (H3N2)) by Mann–Whitney U test

№ группы Group No.	Сумма рангов (тривакцина) Rank total (trivaccine)	Сумма рангов (лекарственный препарат) Rank total (final lot)	Критерий Манна–Уитни (U) Mann–Whitney U test (U)	p	Вывод о достоверности различий Conclusion on the reliability of differences
3, 4	1010,5	942,5	446,5	0,632	Отсутствуют None

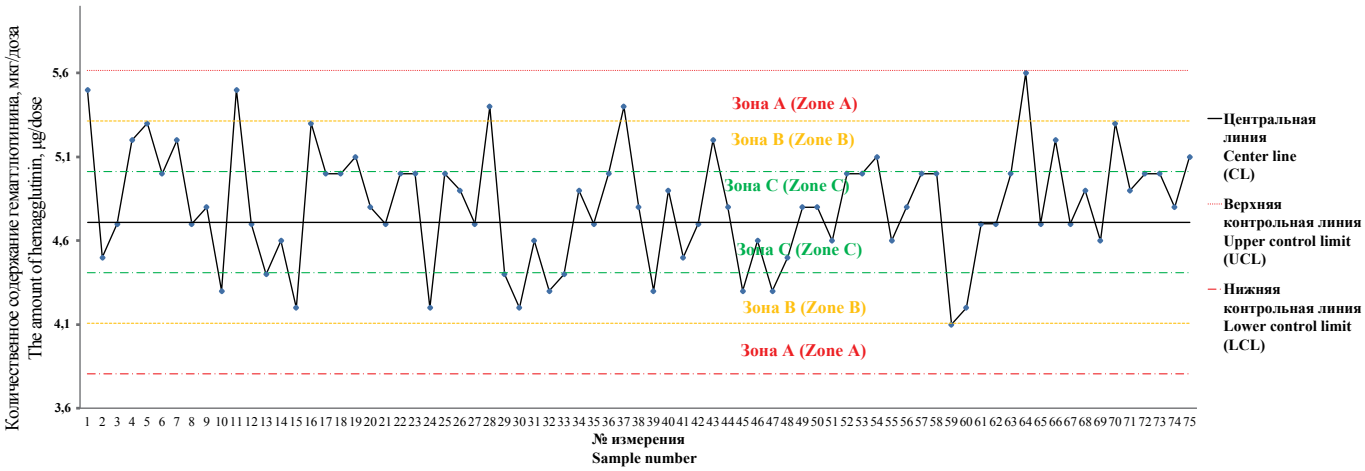

Рис. 1. Контрольная карта оценки стабильности производственного процесса вакцины для профилактики гриппа по результатам определения количественного содержания гемагглютинина вируса гриппа подтипа A(H1N1) в сериях вакцины.

Описание в тексте.

Fig. 1. The Control chart for evaluation of stability of the influenza vaccine production (the content of influenza virus strain A(H1N1) hemagglutinin in final lots of the vaccine).

Description in the text.

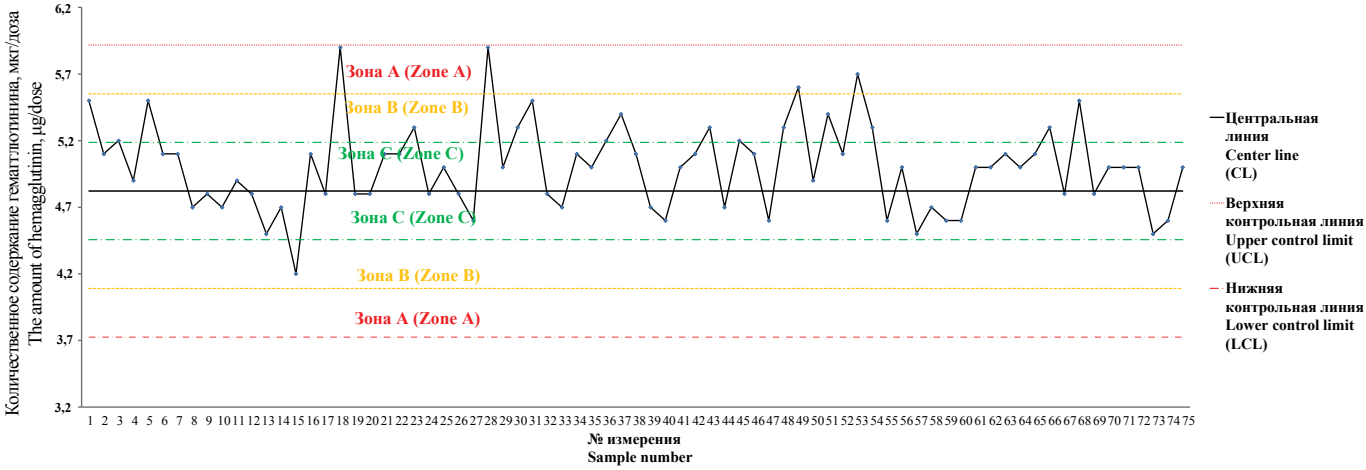

Рис. 2. Контрольная карта оценки стабильности производственного процесса вакцины для профилактики гриппа по результатам определения количественного содержания гемагглютинина вируса гриппа подтипа A(H3N2) в сериях вакцины.

Описание в тексте.

Fig. 2. The Control chart for evaluation of stability of the influenza vaccine production (the content of influenza virus strain A(H3N2) hemagglutinin in final lots of the vaccine).

Description in the text.

и критерий Манна–Уитни для ненормального распределения. Проведенный анализ продемонстрировал, что во всех случаях статистически достоверные различия во всех попарно сравниваемых группах отсутствуют.

Результаты анализа статистической управляемости процесс производства вакцины для профилактики гриппа представлены на **рис. 1–3**.

На оси Y каждого графика приведены значения содержания гемагглютинина в микрограммах на 1 дозу препарата (мкг/доза), на оси X – количество измерений. Для анализа полученных данных на каждом графике проведены центральная линия (CL), соответствующая среднему значению полученных измерений, и по 3 дополнительные линии с каждой стороны от центральной линии, соответствующие рассчитанным значениям ±1σ, ±2σ, ±3σ (UCL – верхняя контрольная линия, LCL – нижняя контрольная линия). Зоны, ограниченные центральной линией и линиями ±1σ, ±2σ, ±3σ, на графике обозначены «зона C», «зона B», «зона A» соответственно. В случае обнаружения признаков, соответствующих критериям из раздела «Материалы и методы», номер критерия указывали на графике.

Во всех измерениях специфическая активность серий вакцины для профилактики гриппа соответствовала требованиям нормативной документа-

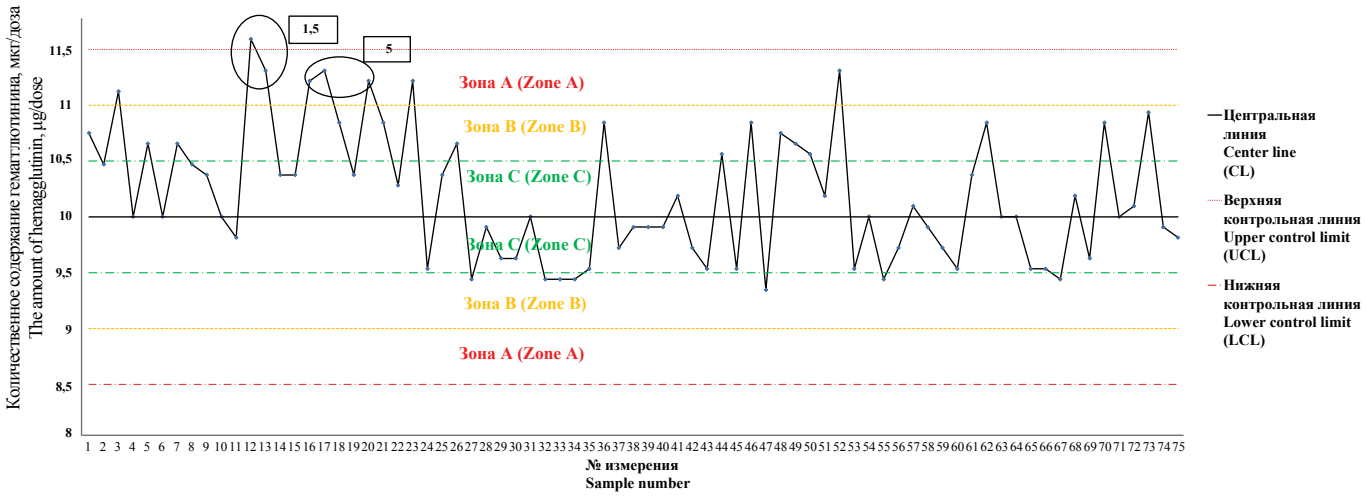

Рис. 3. Контрольная карта оценки стабильности производственного процесса вакцины для профилактики гриппа по результатам определения количественного содержания гемагглютинина вируса гриппа типа B в сериях вакцины.

Описание в тексте.

Fig. 3. The Control chart for evaluation of stability of the influenza vaccine production (the content of influenza virus strain B hemagglutinin in final lots of the vaccine).

Description in the text.

ции: для подтипов A (H1N1) и A (H3N2) – от 4,0 до 6,0 мкг/доза, для типа B – от 9,0 до 13,0 мкг/доза.

Из рис. 1 видно, что критерии, сигнализирующие о действии специальных (внешних) причин, не свойственных производственному процессу, отсутствуют. Однако обращает на себя внимание тот факт, что в 3 случаях (измерения 11, 28, 37) выявляется тенденция к формированию критерия 5, в 1 случае (измерения 59–64) – критерия 3 и в 1 случае (измерение 64) – критерия 1. В последнем случае измерение 64 достигает значения (5,6 мкг на дозу), установленного для верхней контрольной границы, не выходя при этом за пределы зоны A.

На рис. 2 критерии, сигнализирующие о действии специальных (внешних) причин, также отсутствуют. Однако в 2 случаях (измерения18, 28) прослеживается тенденция к формированию критичного критерия 1: измерения достигают значения (5,9), установленного для верхней контрольной границы, при этом не выходя за пределы зоны A, но приближаясь вплотную к верхней границе нормативного содержания гемагглютинина в вакцине (6,0 мкг гемагглютинина на дозу).

Из рис. 3 видно, что в 1 случае установлен критерий 1 (измерение 12), в 2 случаях – критерий 5 (измерения 16, 17), наблюдается тенденция к формированию критерия 3 (измерения 7–11).

Обсуждение

При планировании испытания рассматривалась гипотеза о том, что адъювант Совидон, содержащийся в вакцине, может изменять стандартный вид колец преципитации, ухудшать качество отмывки пластин от красителя, снижать контрастность колец преципитации по отношению к агарозному гелю и, как следствие, приводить к некорректному измерению квадратов диметров и, соответственно, получению недостоверных результатов.

При учете результатов испытания в качества эталона сравнения использовали кольца преципитации, образующиеся при взаимодействии стандартной сыворотки с антигеном, содержащимся в тривакцине и стандартном антигене. Особое внимание уделяли интенсивности колец и четкости их границ.

Сравнительный анализ визуальных характеристик колец преципитации показал, что кольца, образуемые вакциной с адъювантом, не отличались от колец эталонов сравнения. Дополнительная обработка пластин путем погружения в буферный раствор и отмывки неспецифических компонентов не требовалась. Было показано, что критерии приемлемости на этапе визуальной оценки результатов соблюдались для каждого объекта исследования независимо от вакцинного штамма вируса гриппа, входящего в состав вакцины, и содержания адъюванта в готовом препарате (от 0,8 до 1,2 мг/мл).

При проведении расчетов в программе SIAMS Photolab анализировали графики линейной зависимости квадратов диаметров колец преципитации от разведений образцов вакцины с адъювантом. Для всех наблюдений было установлено, что диаметр колец преципитации уменьшался в ряду разведений вакцины: 1 : 0–3 : 1–1 : 1–1 : 3, при этом коэффициент детерминации (R^2) колебался в диапазоне 0,900–0,998. Было установлено, что критерии приемлемости для графиков также соблюдались во всех случаях: графики, построенные для испытуемых образцов и стандартных антигенов, не пересекались, начальные точки графиков отстояли друг от друга в пределах 3 мм^2.

Показано, что адъювант Совидон не влияет на достоверность определения количественного содержа-

ния гемагглютинина в готовой лекарственной форме методом ОРИД. Таким образом, изменение объекта испытаний при проведении исследований по подтверждению соответствия выпускаемых в гражданский оборот гриппозных вакцин с адъювантом позволит проводить контроль показателя «специфическая активность» путем прямого измерения количества гемагглютинина, а не расчетным способом. Данный факт приобретает особое значение, т.к. контроль готовой лекарственной формы позволяет обнаружить несоответствие по показателю «специфическая активность» в случае воздействия негативных внешних факторов на лекарственный препарат с момента выпуска препарата предприятием-производителем и до момента его поступления в испытательную лабораторию. Кроме того, расширяются возможности по исследованию стабильности лекарственного препарата, срок годности (12 мес) которого превышает срок годности полуфабриката (3 мес), и изучению качества вакцины в случае расследования рекламаций с мест применения гриппозной вакцины.

Анализ построенных контрольных карт позволяет сделать вывод о наличии специальных причин, влияющих на производственный процесс. Обращает на себя внимание контрольная карта, представленная на рис. 3. Выявленный критерий 1 относится к критическому типу и может сигнализировать о необходимости воздействия на сам производственный процесс. Серьезность ситуации подчеркивает тот факт, что в непосредственной близости от обнаруженного критерия регистрируется критерий 5 и прослеживается тенденция к выходу за пределы контрольной верхней границы для двух точек на графике (измерения 20, 23). В последующем наблюдается возвращение производственного процесса в состояние статистической управляемости, но уже измерение 52 приближается к верхней контрольной границе. В сложившейся ситуации можно говорить о высокой вероятности снижения степени стабильности производственного процесса вакцины для профилактики гриппа.

На контрольной карте, представленной на рис. 1, сформированные критерии нестабильности производственного процесса отсутствуют, однако регистрируется выход 5 измерений в зону А, при этом одна из точек достигла верхней контрольной границы, не выходя за ее пределы. Представленная на рисунке ситуация может свидетельствовать о повышении риска выхода производственного процесса из состояния статистического управления.

Оценка данных, приведенных на рис. 2, показывает появление критерия 5 дважды. Хотя указанный критерий относится к типу предупреждающих критериев, не требующих воздействия на производственный процесс, на контрольной карте зафиксированы 2 случая достижения верхней контрольной границы и 2 случая выхода измерений в зону А. Следует отметить, что измерения достигают верхней контрольной точки в непосредственной близости от первого критерия 5 (точки 6–14).

В целом можно выделить 2 подхода в случае регистрации критериев нестабильности производственного процесса в зависимости от типа обнаруженных критериев. Получение результата, выходящего за пределы контрольной границы (зоны А), указывает на то, что производственный процесс может быть неконтролируемым. Контрольная карта в этом случае сигнализирует о том, что может присутствовать специальная причина изменчивости и следует каким-либо образом воздействовать на процесс, например, возможны: проведение анализа данных для определения источников специальной причины в целях устранения и сокращения влияния этой причины в будущем; регулирование производственного процесса; остановка производственного процесса и проведение корректирующих действий [10].

Если результаты измерений находятся вне пределов предупреждающих границ (±2σ), но внутри контрольных границ, то, несмотря на то что никаких воздействий на процесс не требуется, целесообразно обратить внимание на выявление наличия или отсутствия специальной причины.

Заключение

Показана принципиальная возможность и обоснована целесообразность определения количественного содержания гемагглютинина в готовой лекарственной форме вакцины для профилактики гриппа, содержащей адъювант Совидон.

Выявленные тренды при анализе контрольных карт Шухарта являются основанием для установления причины выхода производственного процесса вакцины для профилактики гриппа из состояния статистической управляемости и анализа рисков выпуска в гражданский оборот серий вакцины, не соответствующих установленным требованиям.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никифоров В.В., Полибин Р.В., Суранова Т.Г., Полежаева Н.А. Грипп вчера, сегодня и завтра. Итоги мониторинга иммунизации и заболеваемости в эпидемические сезоны 2019–2020, 2020–2021, 2021–2022, 2022–2023 годов. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2023; 28(6): 373–86. https://doi.org/10.17816/EID607411 https://elibrary.ru/milthb
2. Ерофеева М.К., Стукова М.А., Шахланская Е.В., Бузицкая Ж.В., Максакова В.Л., Крайнова Т.И. и др. Оценка профилактической эффективности гриппозных вакцин. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2021; 20(5): 52–60. https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-5-52-60-52-60 https://elibrary.ru/zcbuzk
3. Wood J.M., Schild G.C., Newman R.W., Seagroatt V. An improved single-radial-immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: application for potency determinations of inactivated whole virus and subunit vaccines. *J. Biol. Stand*. 1977; 5(3): 237–47. https://doi.org/10.1016/s0092-1157(77)80008-5
4. Wood J.M., Weir J.P. Standardisation of inactivated influenza vaccines – learning from history. *Influenza Other Respir. Viruses*. 2018; 12(2): 195–201. https://doi.org/10.1111/irv.12543
5. Никифорова А.Н., Исакова-Сивак И.Н., Ерофеева М.К., Фельдблюм И.В., Руденко Л.Г. Результаты изучения безопасности иммуногенности отечественной субъединичной адъювантной вакцины Совигрипп у добровольцев 18-60 лет. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014; (2): 72–8. https://elibrary.ru/sbeunx
6. Minor P.D. Assaying the potency of influenza vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2015; 3(1): 90–104. https://doi.org/10.3390/vaccines3010090
7. Хохлов А.Л., Пятигорская Н.В., ред. *Промышленная фармация. Путь создания продукта*. М.: Российская академия наук; 2019.

8. Демидова П.В., Мефед К.М., Давыдов Д.С., Саркисян К.А., Мовсесянц А.А., Меркулов В.А. Оценка стабильности показателей качества отечественной вакцины против гриппа, предназначенной для иммунизации населения в течение эпидемического сезона 2017-2018 гг. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018; 18(2): 121–32. https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-121-132 https://elibrary.ru/xqrelj
9. Алексеева И.А., Перелыгина О.В., Колышкина Е.Д. Оценка стабильности производства коклюшного, дифтерийного и столбнячного компонентов АКДС-вакцины с помощью контрольных карт Шухарта. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021; 21(4): 256–65. https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-256-265 https://elibrary.ru/vnsstr
10. Уилер Д., Чамберс Д. *Статистическое управление процессами: Оптимизация бизнеса с использованием контрольных карт Шухарта*. М.: Альпина Бизнес Букс; 2024.

REFERENCES

1. Nikiforov V.V., Polibin R.V., Suranova T.G., Polezhaeva N.A. Flu yesterday, today and tomorrow. The results of monitoring immunization and morbidity in the epidemic seasons 2019–2020, 2020–2021, 2021–2022, 2022–2023. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni.* 2023; 28(6): 373–86. https://doi.org/10.17816/EID607411 https://elibrary.ru/milthb (in Russian)
2. Erofeeva M.K., Stukova M.A., Shakhlanskaya E.V., Buzitskaya Zh.V., Maksakova V.L., Krainova T.I. et al. Evaluation of the preventive effectiveness of influenza vaccines in the epidemic season 2019–2020 in St. Petersburg. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika.* 2021; 20(5): 52–60. https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-5-52-60-52-60 https://elibrary.ru/zcbuzk (in Russian)
3. Wood JM, Schild GC, Newman RW, Seagroatt V. An improved single-radial-immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: application for potency determinations of inactivated whole virus and subunit vaccines. *J Biol Stand*. 1977; 5: 237-247. https://doi.org/10.1016/S0092-1157(77)80008-5.
4. John M.Wood, Jerry P.Weir. Standardisation of inactivated influenza vaccines – Learning from history. *Influenza Other Respi Viruses*. 2018; 12: 195-201. doi: 10.1111/irv.12543. Epub 2018 Feb 2.
5. Nikiforova A.N., Isakova-Sivak I.N., Erofeeva M.K., Fel'dblum I.V., Rudenko L.G. The results of studying the Safety and immunogenicity of domestic subunit adjuvanted vaccine Sovigripp in volunteers from 18 to 60 years old. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika.* 2014; (2): 72–8. https://elibrary.ru/sbeunx (in Russian)
6. Philip D. Minor. Assaying the Potency of Influenza Vaccines. *Vaccines*. 2015; 3(1): 90-104. https://doi.org/10.3390/vaccines3010090.
7. Khokhlov A.L., Pyatigorskaya N.V., eds. *The Industrial Pharmacy. Product Development Cycle [Promyshlennaya farmatsiya. Put' sozdaniya produkta].* Moscow: Rossiiskaya akademiya nauk; 2019. (in Russian)
8. Demidova P.V., Mefed K.M., Davydov D.S., Sarkisyan K.A., Movsesyants A.A., Merkulov V.A. Analysis of batch to batch consistency of a locally produced influenza vaccine for the 2017–2018 influenza season. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2018; 18(2): 121–32. https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-2-121-132 https://elibrary.ru/xqrelj (in Russian)
9. Alekseeva I.A., Perelygina O.V., Kolyshkina E.D. Estimation of production consistency of diphtheria, tetanus, and pertussis components of the DTP vaccine using Shewhart charts. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2021; 21(4): 256–65. https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-256-265 https://elibrary.ru/vnsstr (In Russian)
10. Wheeler D., Chambers D. *Understanding Statistical Process Control.* Knoxville, Tennessee: SPC Press; 1992.

Информация об авторах:

Бутырский Алексей Юрьевич✉ – главный эксперт лаборатории вирусных вакцин ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: Butirskiy@expmed.ru; https://orcid.org/0000-0002-0352-522X

Морозова Елена Николаевна – эксперт 2-й категории лаборатории вирусных вакцин ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: Morozovaen@expmed.ru; https://orcid.org/0009-0005-0478-1558

Саркисян Каринэ Арташесовна – канд. мед. наук, начальник лаборатории вирусных вакцин ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: Sarkisyan@expmed.ru; https://orcid.org/0000-0003-0445-7086

Участие авторов: Бутырский А.Ю. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Морозова Е.Н. – проведение экспериментов, сбор и анализ данных; Саркисян К.А. – концепция и дизайн исследования, обсуждение результатов исследования, научное редактирование окончательной версии статьи для публикации.

Поступила 27.12.2024
Принята в печать 14.02.2025
Опубликована 28.02.2025

Information about the authors:

Aleksey Yu. Butirskiy✉ – chief expert of viral vaccines laboratory, Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia. E-mail: Butirskiy@expmed.ru; https://orcid.org/0000-0002-0352-522X

Elena N. Morozova – expert of viral vaccines laboratory, Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia. E-mail: Morozovaen@expmed.ru; https://orcid.org/0009-0005-0478-1558

Karine A. Sarkisyan – candidate of medical science, head of viral vaccines laboratory, Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia. E-mail: Sarkisyan@expmed.ru; https://orcid.org/0000-0003-0445-7086

Contribution: Butirskiy A.Yu. – the study concept and design, conducting of the experiments, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Morozova E.N. – conducting of the experiments, collecting and analysis of the data; Sarkisyan K.A. – the study concept and design, the discussion of the results, final approval of the article for publication.

Received 27 December 2024
Accepted 14 February 2025
Published 28 February 2025

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-289
© ПАШКОВ Е.А., ШИКВИН Д.А., ПАШКОВ Г.А., НАГИЕВА Ф.Г., БОГДАНОВА Е.А., БЫКОВ А.С., ПАШКОВ Е.П., СВИТИЧ О.А., ЗВЕРЕВ В.В., 2025

Оценка профилактического эффекта нокдауна клеточных генов *NXF1, PRPS1* и *NAA10* при гриппозной инфекции на модели *in vitro*

Пашков Е.А.[1,2]✉, Шиквин Д.А.[3], Пашков Г.А.[1,2], Нагиева Ф.Г.[1], Богданова Е.А.[2], Быков А.С.[2], Пашков Е.П.[2], Свитич О.А.[1,2], Зверев В.В.[1,2]

[1]ФГБУН «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Минздрава России, 105064, г. Москва, Россия;
[2]ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Россия;
[3]ФГБОУ ВО Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова РТУ МИРЭА,, 119454, г. Москва, Россия

Резюме
Введение. Грипп – острое респираторное вирусное инфекционное заболевание, индуцируемое одноименными вирусами. Существующие на сегодняшний день профилактические и терапевтические подходы имеют важное противоэпидемическое значение, однако имеется ряд проблем, таких как быстрое возникновение резистентных штаммов, отсутствие формирования перекрестного иммунитета и эффективность вакцин. Одним из подходов в создании противогриппозных средств является использование механизма РНК-интерференции и малых интерферирующих РНК (миРНК), комплементарных к матричной РНК мишени вирусных и клеточных генов.
Цель – оценка профилактического противогриппозного эффекта миРНК, направленных к клеточным генам *NXF1, PRPS1* и *NAA10*, на модели *in vitro.*
Материалы и методы. Исследовали антигенные варианты вируса гриппа типа А: A/California/7/09 (H1N1), A/WSN/33 (H1N1) и A/Brisbane/59/07 (H1N1); клеточные культуры A549 и MDCK. Исследование выполняли посредством молекулярно-генетических (трансфекции, выделение нуклеиновых кислот, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени) и вирусологических методов (заражение клеточных культур, титрование по визуальному цитопатическому действию, оценка вирусного титра посредством метода Рамакришнана).
Результаты. Показано, что миРНК, таргетированные к клеточным генам *NXF1, PRPS1* и *NAA10* при профилактическом применении в клеточной культуре в концентрации 0,25 мкг на лунку, при инфицировании штаммами вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1), A/WSN/33 (H1N1) и A/Brisbane/59/07 (H1N1) при множественности инфекции 0,01, снижают вирусную репликацию до уровня 220 $ТЦД_{50}$ на 1 мл клеточной среды, тогда как в контрольных необработанных клетках вирусный урожай составил ~10^6 $ТЦД_{50}$ на 1 мл среды.
Выводы. Снижение экспрессии указанных генов *NXF1, PRPS1* и *NAA10* приводит к нарушению жизненного цикла и активности вирусов гриппа. Подобный подход может быть потенциально исследован и использован для близко- и дальнородственных представителей иных семейств вирусов.

Ключевые слова: *РНК-интерференция; экспрессия генов; миРНК; вирусная РНК; вирусная репродукция; NXF1; PRPS1; NAA10*

Для цитирования: Пашков Е.А., Шиквин Д.А., Пашков Г.А., Нагиева Ф.Г., Богданова Е.А., Быков А.С., Пашков Е.П., Свитич О.А., Зверев В.В. Оценка профилактического эффекта нокдауна клеточных генов *NXF1*, *PRPS1* и *NAA10* при гриппозной инфекции на модели *in vitro. Вопросы вирусологии*. 2025; 70(1): 66–77. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-289 EDN: https://elibrary.ru/oqonmm

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Фонда содействия инновациям в рамках договора № 18362ГУ/2023 от 09 августа 2023 г.
Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.
Этическое утверждение. Исследование одобрено этическим комитетом ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол № 04-21 от 18.02.2021).

ORIGINAL STUDY ARTICLE
DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-289

Assessment of the preventive effect of knockdown of cellular genes *NXF1, PRPS1* and *NAA10* in influenza infection in an *in vitro* model

Evgenij A. Pashkov[1,2]✉, Dmitry A. Shikvin[3], George A. Pashkov[1,2], Firaya G. Nagieva[1], Ekaterina A. Bogdanova[2], Anatoly S. Bykov[2], Evgenij P. Pashkov[2], Oxana A. Svitich[1,2], Vitaliy V. Zverev[1,2]

[1]1I.I. Mechnikov Scientific and Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia;
[2]Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 119991, Moscow, Russia;
[3]Institute of Fine Chemical Technologies named after M.V. Lomonosov RTU MIREA, Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «MIREA – Russian Technological University», 119454, Moscow, Russia

Abstract
Introduction. Influenza is an acute respiratory viral infectious disease caused by the influenza viruses. Current preventive and therapeutic approaches are of great anti-epidemic importance, but there are a number of problems, such as the rapid emergence of resistant strains, the lack of cross-immunity and the effectiveness of vaccines. One of the approaches to the development of anti-influenza agents is the use of RNA interference and small interfering RNAs complementary to the mRNA target of viral and cellular genes.
Aim – to evaluate the prophylactic anti-influenza effect of siRNAs directed to the cellular genes *NXF1*, *PRPS1* and *NAA10* in an *in vitro* model.
Materials and methods. Antigenic variants of influenza A virus: A/California/7/09 (H1N1), A/WSN/33 (H1N1) and A/Brisbane/59/07 (H1N1); cell cultures A549 and MDCK. The study was performed using molecular genetic (transfection, NC isolation, RT-PCR-RV) and virological (cell culture infection, titration by visual CPE, viral titer assessment using the Ramakrishnan method) methods.
Results. It was shown that siRNAs targeting the cellular genes *NXF1*, *PRPS1* and *NAA10,* when used prophylactically in cell culture at a concentration of 0.25 μg per well, during infection with influenza virus strains A/California/7/09 (H1N1), A/WSN/33 (H1N1) and A/Brisbane/59/07 (H1N1) at a multiplicity of infection of 0.01, reduced viral replication to a level of 220 $TCID_{50}$ per 1 ml of cell medium, whereas in control untreated cells the viral yield was ~106 $TCID_{50}$ per 1 ml of medium.
Conclusions. Reproduction of influenza A viruses directly depends on the protein products of the *NXF1*, *PRPS1*, and *NAA10* genes. Reduced expression of these genes disrupts the life cycle and activity of influenza viruses. Such an approach can potentially be studied and used for closely and distantly related representatives of other virus families.

Keywords: *RNA interference; gene expression; siRNA; viral RNA; viral reproduction; NXF1; PRPS1; NAA10*

For citation: Pashkov E.A., Shikvin D.A., Pashkov G.A., Nagieva F.G., Bogdanova E.A., Bykov A.S., Pashkov E.P., Svitich O.A., Zverev V.V. Assessment of the preventive effect of knockdown of cellular genes *NXF1, PRPS1* and *NAA10* in influenza infection in an *in vitro* model. *Problems of Virology* (*Voprosy Virusologii*). 2025; 70(1): 66–77 (In Russ.). DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-289 EDN: https://elibrary.ru/oqonmm
Funding. Financing. The study was carried out with financial support from the Innovation Promotion Fund under contract No. 18362GU/2023 dated August 9, 2023.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.
Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus author guidelines for animal use (IAVES, July 23, 2010). The study was approved by the Ethics Committee of Sechenov University (Minutes No. 04-21 dated February 18, 2021).

Введение

Грипп – острое респираторное вирусное инфекционное заболевание, индуцируемое одноименными вирусами, относящимися к семейству Orthomyxoviridae. Согласно информационному бюллетеню CDC (Centers for Disease Control and Prevention, США), с 2020 г. и по настоящее время в мире регистрируется постоянный рост числа случаев гриппозной инфекции[1]. Ежегодное нарастание случаев инфицирования вирусами гриппа типа А среди человеческой популяции вызывает обеспокоенность, связанную с возможностью возникновения новой пандемии гриппозной инфекции [1].

Течение гриппа варьирует от острой преходящей лихорадки до тяжелого заболевания, осложнения которого могут вызывать дисфункцию сердечно-

[1]Centers for Disease Control and Prevention. Past reported global human cases with highly pathogenic avian influenza A(H5N1) (HPAI H5N1) by country, 1997–2024. https://www.cdc.gov/bird-flu/php/avian-flu-summary/chart-epi-curve-ah5n1.html

сосудистой, дыхательной, иммунной, мочеполовой и центральной нервной систем, а также провоцировать развитие вторичных грибковых либо бактериальных инфекций [2–8]. Имеющиеся на сегодняшний день профилактические и терапевтические подходы имеют важное противоэпидемическое значение, однако также существует и ряд проблем, таких как быстрое возникновение резистентных штаммов, отсутствие формирования перекрестного иммунитета и эффективность вакцин, колеблющаяся на уровне от 70 до 90% у пациентов в возрасте моложе 65 лет и от 30 до 40% у пациентов, чей возраст 65 лет и старше [9]. Наряду с этим состав противогриппозных вакцин должен ежегодно обновляться в соответствии с прогнозируемой циркуляцией тех или иных антигенных вирусных вариантов [10, 11].

На сегодняшний день для терапии гриппозной инфекции FDA (U.S. Food and Drug Administration, США) рекомендованы четыре препарата: Xofluza (Балоксавира марбоксил) Rapivab (Перамивир), Relenza (Занамивир) и Tamiflu (Осельтамивир), классифицируемые в зависимости от ингибирующего гриппозную репродукцию механизма [12, 13]. Механизм действия препарата Xofluza заключается в ингибировании активности вирусной РНК-полимеразы, а остальных – в ингибировании нейраминидазы вируса гриппа [13]. Появление «эмергентных» лекарственно-устойчивых штаммов обуславливает необходимость разработки инновационных подходов в создании новых противогриппозных препаратов с выраженным противовирусным эффектом, улучшенной переносимостью и сниженной токсичностью до начала пандемии.

Подводя итог вышесказанному, можно отметить, что высокую актуальность для обеспечения безопасности населения имеет вопрос разработки дешевых, эффективных и безопасных противогриппозных средств профилактики и терапии.

РНК-интерференция – это эволюционно сложившийся механизм регуляции генной экспрессии и поддержания иммунного гомеостаза эукариот. Регуляция экспрессии генов в данном случае проявляется в качестве временного сайленсинга активности целевого гена. Сущность РНК-интерференции заключается в подавлении экспрессии целевой матричной РНК (мРНК) или гена с помощью молекулы малой интерферирующей РНК (миРНК). Механизм РНК-интерференции заключается в том, что чужеродная экзогенная двухцепочечная РНК расщепляется белком-эндонуклеазой Dicer на короткие фрагменты длиной от 21 до 25 пар нуклеотидов (миРНК), которые в цитоплазме связываются с белковым комплексом RISC (RNA-induced silencing complex), после чего происходит деградация целевой мРНК и блокировка трансляции [14, 15]. В настоящее время проходят лабораторные и клинические испытания терапевтические препараты, проявляющие противовирусную активность в отношении вирусного гепатита С (SPC3649), вирусного гепатита В (NucB1000), геморрагической лихорадки Эбола (TKM-Ebola), а также ряда других вирусных инфекций [16, 17]. Имеется доказанный противовирусный эффект от применения миРНК в отношении возбудителей вирусных инфекций животных, таких как вирусная болезнь Марека, ящур, трансмиссивный гастроэнтерит свиней, вирусная лихорадка о'ньонг-ньонг [18–21]. Разработка и использование новых противовирусных композиций миРНК, наряду с уже существующими, позволит эффективнее ограничить распространение вирусных патогенов в человеческой популяции [22].

Одним из подходов в создании противогриппозных средств является использование специфических миРНК, комплементарных к мРНК мишени клеточных генов. Данный метод опосредован тем, что вирус гриппа имеет склонность к высокой мутационной изменчивости [23]. Исходя из этого, в данном случае целесообразнее влиять на экспрессию клеточных генов, чьи белковые продукты способствуют репродукции вируса гриппа в клетке, ввиду того что риск образования альтернативного вирусного репродуктивного пути низок [24]. Для проведения подобной оценки нами были выбраны следующие клеточные гены-мишени: *NXF1, PRPS1* и *NAA10*. Ген *NAA10* кодирует экспрессию белка NαA (N-концевая ацетилтрансфераза), который необходим для осуществления пострансляционной модификации белков, в том числе и вирусных. Ацетилирование белков вируса гриппа приводит к повышению вирусной вирулентности [22]. Ген *PRPS1* кодирует экспрессию белка PRPS1, катализирующего фосфорибозилирование рибозы-5-фосфата до 5-фосфорибозил-1-пирофосфата. Это необходимо для биосинтеза пуриновых оснований, в частности аденина, входящего в состав вирусной РНК (вРНК) [25]. Ген *NXF1* также кодирует экспрессию одноименного белка, участвует в процессе экспорта молекул из нуклеоплазмы в цитоплазму. Вирусный белок NS1 способен связываться с осью TAP/NXF1, что будет способствовать экспорту вирусной мРНК из ядра [26].

Подходы, направленные на профилактику вирусной инокуляции и связанные с подавлением клеточных генов, экспрессирующих белки, критически важные для вирусной репродукции, представляют особый интерес. Исходя из вышесказанного, **целью** настоящей работы являлось миРНК-опосредованное подавление активности генов *NXF1, PRPS1* и *NAA10* для оценки последующего профилактического и вирусингибирующего эффекта миРНК.

Материалы и методы

Малые интерферирующие РНК. Анализ нуклеотидных последовательностей для последующего выбора миРНК осуществляли с использованием программ Geneious (Geneious, США) и siDirect 2.1 (University of Tokyo, Япония). Посредством Geneious выполняли выравнивание транскриптов мРНК целевых генов и затем через программу siDirect 2.1 проводили подбор миРНК. Синтез миРНК производили на базе НПО «Синтол» (Москва, Россия).

Вирусы. Антигенные варианты вируса гриппа А: A/California/7/09 (H1N1), A/WSN/33 (H1N1) и A/Brisbane/59/07 (H1N1) были полученные из коллек-

ции вирусов ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова. Используемая множественность заражения в работе (мн.з.) составила 0,01.

Определение вирусного титра. Вирусную активность оценивали по максимальному разведению вируссодержащей жидкости, при котором определялась конечная точка визуального проявления цитопатического действия (ЦПД) в культуре клеток А549 [27]. Значения вирусного титра даны в $ТЦД_{50}$/мл (тканевых цитотоксических доз/мл).

Клеточные линии. Использовали клеточную линию MDCK, представляющую собой эпителий почечных канальцев собаки (Институт Пастера, Франция), а также клеточную линию А549 – карциномные альвеолярно-базальные эпителиальные клетки человека (коллекция ATCC-CCL-185, США). Подробные условия культивирования используемых клеточных линий представлены в нашем раннем исследовании [28].

Метилтетразолиевый тест (МТТ-тест). Цитотоксический эффект миРНК оценивали с помощью колориметрического МТТ-теста. Подробные условия проведения МТТ-теста также представлены в нашем раннем исследовании [28]. По аналогии с работой M. Estrin и соавт., порог выживаемости трансфицированных клеток составлял 70% от выживаемости отрицательного контроля [29].

Трансфекция миРНК в клеточную культуру. Трансфекцию миРНК проводили на 24-луночных планшетах в клеточную линию А549 по достижении 70% клеточного монослоя (S лунки – 2 см^2, посевная концентрация клеток на лунку $2{,}5 \times 10^5$. Количество вещества миРНК составило 0,25 мкг на лунку[2]). На начальном этапе выполняли смешивание реагента Geneject40 («Молекта», Россия)[2] и Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, США), которые затем добавляли к смеси миРНК и Opti-MEM. Полученный комплекс инкубировали в течение 15 мин при температуре 25 °С. За время инкубации проводилась промывка клеток раствором Хенкса («ПанЭко», Россия) и бессывороточной средой Opti-MEM.. В качестве неспецифического контроля была использована миРНК L2, направленная к гену светляковой люциферазы, которая была разработана и апробирована ранее к.б.н. Файзулоевым Е.Б. для исключения неспецифического действия других миРНК, а также для оценки их эффективности [30].

Инокуляция трансфицированных вирусом гриппа клеток. Через 4 ч с момента трансфекции удаляли поддерживающую среду из лунок с трансфицированными клетками и инокулировали по 0,5 мл вируссодержащей жидкости с мн.з. 0,01, после чего вновь помещали клетки в CO_2-инкубатор.

Выделение нуклеиновых кислот. Выделение общей РНК из лизата клеток выполняли с использованием набора «Рибосорб» («Амплисенс», Россия) в соответствии со служебным протоколом. Полученная РНК хранилась при температуре −70 °С.

Реакция обратной транскрипции. Обратную транскрипцию (ОТ) выполняли с использованием коммерческого набора реагентов ОТ-1 («Синтол», Россия) согласно протоколу производителя. Реакционную ОТ-смесь с внесенной в нее выделенной РНК инкубировали в термостате «Термит» («ДНК-Технология», Россия) при температурно-временно́м режиме 37 °С в течение 60 мин и 95 °С в течение 5 мин.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Оценку динамики концентрации вРНК выполняли с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с набором праймеров, специфичных для гена *M* [31]. Использовали набор реагентов для проведения ПЦР в присутствии красителя EVA Green и референтного красителя ROX («Синтол»). Реакцию ПЦР-РВ проводили в амплификаторе «ДТ-96» («ДНК-технология», Россия) при следующих настройках: 95 °С – 5 мин (1 цикл); 62 °С – 40 с, 95 °С – 15 с (40 циклов).

Оценка изменения экспрессии генов. Для анализа данных, полученных в ходе количественной ПЦР-РВ, и оценки изменения экспрессии целевых генов использовали метод Пфаффля [32].

Этическое утверждение. Исследование было одобрено этическим комитетом ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол № 04-21 от 18.02.2021).

Статистическая обработка данных. Оценку достоверности итоговых результатов проводили с использованием статистического непараметрического критерия суммы рангов Вилкоксона, а также с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2013 (Microsoft, США) [33]. Разницу считали достоверной при уровне статистической значимости $p \leq 0{,}05$.

Результаты

Определение значений цитотоксического действия миРНК

На 1-е сутки с момента заражения приемлемый уровень выживаемости отмечался при использовании всех миРНК, однако на 2-е сутки выживаемость была выше в клетках, обработанных миРНК: *NXF1.1, PRPS1.2* и *NAA10.1*, и составила 77,0 ± 3,0, 86,0 ± 1,5 и 72,0 ± 4,0% соответственно. Следует отметить, что к 3-м суткам с момента трансфекции указанных комплексов наблюдалось выраженное повышение жизнеспособности клеток, превышающее данный показатель относительно иных миРНК. Полученные результаты представлены в **табл. 1**.

Определение таргетного эффекта используемых миРНК

Для дальнейшей работы были отобраны миРНК *NXF1.1*, *PRPS1.2* и *NAA10.1.* Оценку их целевого действия проводили в течение 3 сут на клеточной культуре А549. Установлено, что трансфекция миРНК *NXF1.1* вызывает достоверное снижение количества транскрипционных продуктов одноименного гена до уровня в 6,0, 16,0 и 21,0% в 1, 2-е и 3-и

[2]http://molecta.ru/wordpress/transfection

Таблица 1. Процент жизнеспособных клеток по отношению к контролю после трансфекции миРНК
Table 1. Percent of viable cells relative to control after siRNA transfection

миРНК siRNA	1-е сутки 1st day	2-е сутки 2nd day	3-и сутки 3rd day
NXF1.1	**77,0 ± 3,0**	**67,0 ± 1,0**	**71,0 ± 2,0**
NXF1.2	73,0 ± 2,0	60,0 ± 4,0	67,0 ± 7,0
PRPS1.1	101,0	65,0 ± 8,0	71,0 ± 6,0
PRPS1.2	**86,0 ± 1,5**	**67,0 ± 2,0**	**79,0 ± 3,0**
NAA10.1	**72,0 ± 4,0**	**70,0 ± 3,0**	**83,0 ± 4,0**
NAA10.2	116,0 ± 8,0	65,0 ± 3,0	81,0 ± 1,0
siL2	83,0 ± 2,0	86,0 ± 4,0	92,0 ± 3,0
К− (нетрансф.) К− (non-transfected)	100	100	100

Примечание. За 100% принята оценка выживаемости необработанных клеток (отриц. контроль). Пороговое значение выживаемости установлено на уровне 70%. Жирным шрифтом выделены наименования комплексов и наименее токсичные значения снижения жизнеспособности клеток.

Note. The survival rate of untreated cells (negative control) was taken as 100%. The threshold value of survival was set at 70%. Names of complexes and the least toxic values based on cell viability reduction are marked in bold font.

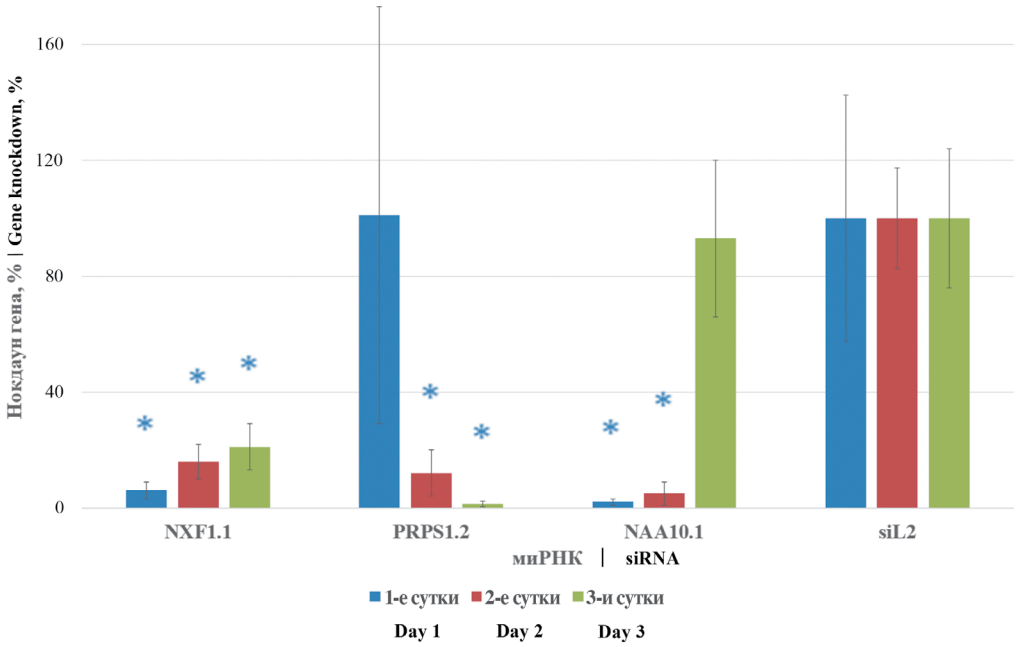

Рис. 1. Изменение транскриптов генов *NXF1*, *PRPS1* и *NAA10* в динамике.

На оси абсцисс представлены миРНК и их одноименные целевые клеточные гены; на оси ординат – процент изменения уровня транскрипта. Данные критерия Пфаффля представлены в процентах. * – $p \leq 0{,}05$.

Fig. 1. Dynamic changes in *NXF1*, *PRPS1* and *NAA10* gene transcripts.

siRNA and their target cellular genes of the same name are shown on the X-axis; % change in transcript level is shown on the Y-axis. Pfaffl test data are presented in %. * – $p \leq 0.05$.

сутки соответственно, по сравнению со значениями, полученными при анализе клеток, трансфицированных неспецифической миРНК siL2. Схожий результат был получен при использовании миРНК *NAA10.1,* где достоверный уровень продуктов транскрипции целевого гена в течение 2 сут с момента транскрипции составлял 2,0 и 5,0% в 1-е и 2-е сутки соответственно относительно значений группы неспецифического контроля. На 3-и сутки с момента трансфекции процентный уровень транскриптов гена *NAA10* достигал схожих значений с клетками, обработанными siL2. миРНК *PRPS1.2* индуцировала достоверное снижение процентного уровня экспрессии целевого гена на 2-е и 3-и сутки до 12,0 и 1,3% соответственно. Наряду с низким токсическим эффектом, неотъемлемым условием применения миРНК является подавление экспрессии целевого гена в течение необходимого промежутка времени. На данном этапе исследования было выявлено, что при использовании указанных миРНК отмечается стабильное снижение уровня транскриптов указанных генов. Результаты представлены на **рис. 1**.

Проведенная оценка выживаемости клеток и уровня динамики транскриптов целевых генов дает понять, что используемые миРНК не вызывают чрезмерного цитоцидного эффекта на исследуемой клеточной линии. Полученные результаты позволяют использовать миРНК *NXF1.1*, *PRPS1.2* и *NAA10.1* для дальнейшей оценки профилактического эффекта в отношении разных генетических вариантов вируса гриппа А.

Оценка противовирусного эффекта используемых миРНК

При оценке противовирусного эффекта используемых миРНК на 1-е сутки с момента трансфекции было установлено, что липофекция миРНК *NXF1.1* приводит к снижению вирусного титра штаммов A/California/7/09 (H1N1), A/Brisbane/59/07 (H1N1) и A/WSN/1933 (H1N1) на 3,5, 2,3 и 1,6 lg ТЦД$_{50}$/мл соответственно относительно уровня вирусного титра в клетках, обработанных неспецифической миРНК. Количество вРНК при использовании данной миРНК снижалось в 1088,0, 11,2 и 33,4 раза соответственно по сравнению с группой неспецифического контроля. На 2-е сутки использования миРНК *NXF1.1* показатель вирусной активности для указанной миРНК снижался на 3,2, 3,2 и 3,0 lg ТЦД$_{50}$/мл, а количество вРНК – в 633,4, 6,4 и 25,2 раза соответственно указанным штаммам относительно неспецифической контрольной группы. Далее, на 3-и сутки, показатель вирусного титра снижался на 2,2 и 2,0 lg ТЦД$_{50}$/мл в клетках, зараженных штаммами A/Brisbane/59/07 и A/WSN/1933 (H1N1), а вРНК – в 8,3 и 30,2 раза соответственно.

Трансфекция миРНК *PRPS1.2* приводила к снижению вирусной репродукции штаммов A/California/7/09 (H1N1), A/Brisbane/59/07 (H1N1) и A/WSN/1933 (H1N1) на 1-е сутки на 2,3, 2,1 и 2,1 lg ТЦД$_{50}$/мл, а вРНК – в 2917,0, 10,8 и 33,4 раза соответственно. На 2-е сутки с момента трансфекции уровень вирусного титра снижался на 3,2, 0,7 и 1,2 lg ТЦД$_{50}$/мл, а количество вРНК – в 5059,4, 25,2 и 17,4 раза соответственно. Спустя 72 ч с момента трансфекции уровень вирусной активности был снижен на 2,2, 1,4 и 2,0 lg ТЦД$_{50}$/мл соответственно.

Использование миРНК *NAA10.1* на 1-е сутки с момента трансфекции индуцировало снижение вирусного титра штаммов A/California/7/09 (H1N1), A/Brisbane/59/07 (H1N1) и A/WSN/1933 (H1N1) на 1,6, 2,1 и 2,3 lg ТЦД$_{50}$/мл соответственно по отношению к группе неспецифического контроля. Уровень вРНК в данном случае снижался в 141,3, 12,1, 16,6 раза соответственно. На 2-е сутки с момента трансфекции показатель вирусного титра снизился на 1,2 и 2,3 lg ТЦД$_{50}$/мл соответственно в культурах кле-

Таблица 2. Влияние противовирусного эффекта миРНК, направленных к генам *NXF1*, *PRPS1* и *NAA10,* на динамику количества вРНК вируса гриппа A/California/7/09 (H1N1), A/Brisbane/59/07 и A/WSN/1933 (H1N1)

Table 2. Antiviral effect of siRNAs directed to the *NXF1*, *PRPS1* and *NAA10* genes on the dynamics of the amount of vRNA of the influenza virus A/California/7/09 (H1N1), A/Brisbane/59/07 and A/WSN/1933 (H1N1)

Ген Gene	миРНК siRNA	Показатель снижения вРНК вируса гриппа А (кратность по отношению к siL2) при мн.з. 0,01 Influenza A virus vRNA reduction rate (multiplicity relative to siL2) at 0.01 MOI		
		1-е сутки 1st day	2-е сутки 2nd day	3-и сутки 3rd day
		A/California/7/09 (H1N1)		
NXF1	*NXF1.1*	**1088,0**	**633,4**	423,9
PRPS1	*PRPS1.2*	**2917,1**	**5059,4**	**1771,1**
NAA10	*NAA10.1*	**8,6**	**455,1**	**141,3**
	siL2	21 012 866	19 581 834 721	24 581 834 721
		A/Brisbane/59/07		
NXF1	*NXF1.1*	**11,2**	**6,4**	**8,3**
PRPS1	*PRPS1.2*	**10,8**	**25,2**	**15,5**
NAA10	*NAA10.1*	**12,1**	**18,6**	**6,1**
	siL2	195 184	1 837 130	23 156 335
		A/WSN/1933 (H1N1)		
NXF1	*NXF1.1*	**33,4**	**33,6**	**30,2**
PRPS1	*PRPS1.2*	**10,4**	**17,4**	**40,3**
NAA10	*NAA10.1*	**16,6**	**29,2**	**27,0**
	siL2	371 038	2 647 184	41 839 472

Примечание. Расчет результатов проводился относительно клеток с неспецифической миРНК L2. Данные для неспецифического контроля siL2 даны в значении количество единиц вРНК/мл. Жирным шрифтом выделены значения, для которых $p < 0,05$.

Note. The results were calculated relative to cells with nonspecific siRNA L2. Data for the nonspecific siL2 control are given as the number of vRNA units/mL. Values for which $p < 0.05$ are shown in bold.

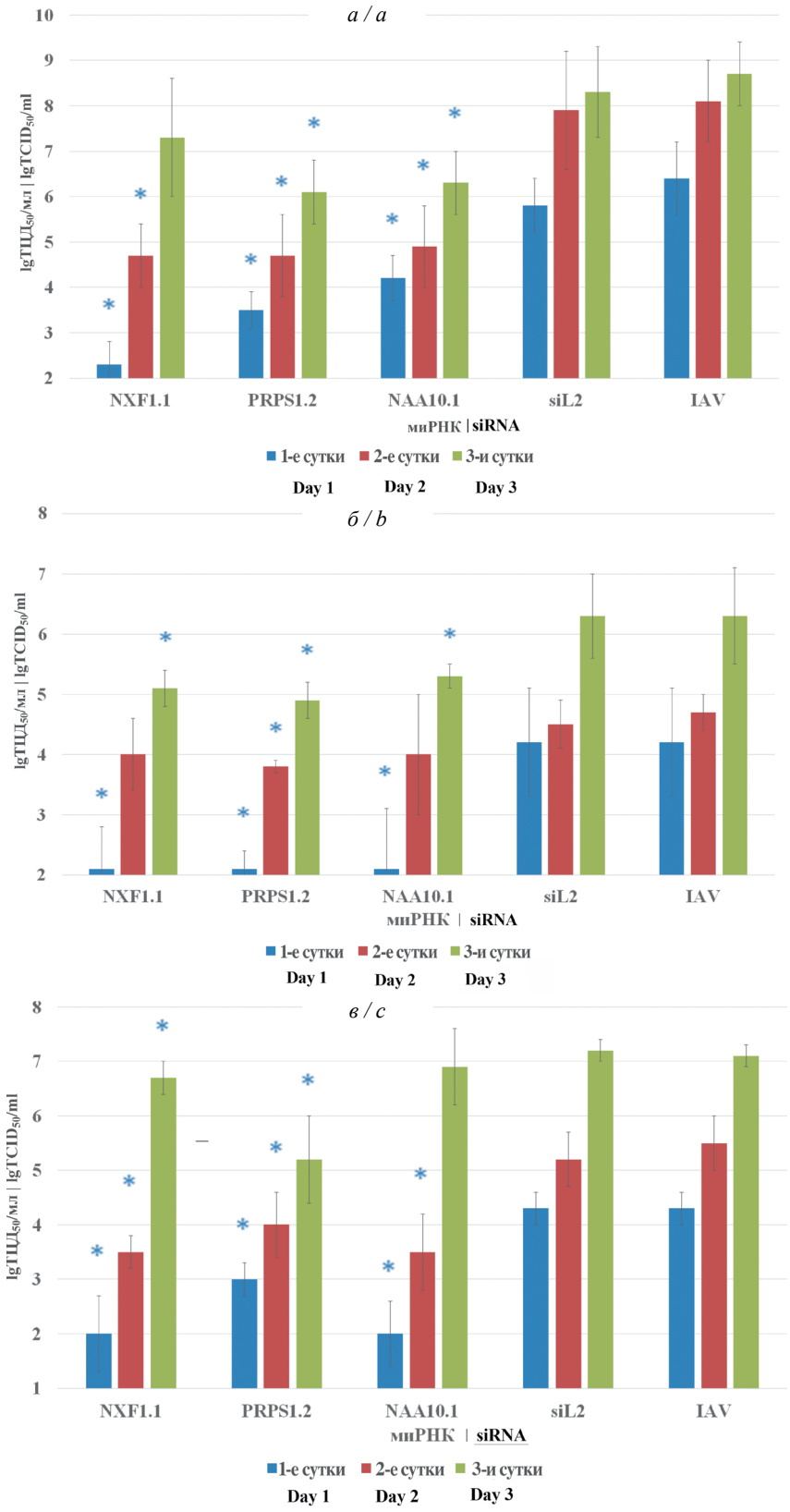

Рис. 2. Противовирусный эффект миРНК, специфичных к клеточным генам *NXF1*, *PRPS1* и *NAA10*.

а – A/California/7/09 (H1N1); *б* – A/Brisbane/59/07 (H1N1); *в* – A/WSN/1933 (H1N1). По оси абсцисс – миРНК и их одноименные целевые клеточные гены; по оси ординат – показатель вирусного титра lg ТЦД$_{50}$мл относительно вирусного и неспецифического контроля. * – $p < 0,05$ относительно неспецифического контроля siL2.

Fig. 2. Antiviral effect of siRNAs specific to the *NXF1, PRPS1* and *NAA10* cell genes.

a – A/California/7/09 (H1N1); *b* – A/Brisbane/59/07 (H1N1); *c* – A/WSN/1933 (H1N1); on the X-axis – siRNA and their target cellular genes of the same name; on the Y-axis – the viral titer log10 TCID$_{50}$/mL relative to the viral and nonspecific control). * – $p < 0.05$ relative to the nonspecific control siL2.

ток, зараженных штаммами A/Brisbane/59/07 (H1N1) и A/WSN/1933 (H1N1), а количество вРНК – в 455,1, 18,6 и 29,2 раза соответственно для штаммов A/California/7/09 (H1N1), A/Brisbane/59/07 (H1N1) и A/WSN/1933 (H1N1). На 3-и сутки после липофекции *NAA10.1* уровень вРНК снизился в 141,3, 6,1 и 27,0 раза соответственно. Полученные данные представлены на **рис. 2** и в **табл. 2**.

Обсуждение

С момента своего открытия механизм РНК-интерференции сразу стал использоваться как один из инструментов, позволяющих регулировать вирусную репродукцию на моделях *in vitro* и *in vivo*. Более того, классическим подходом при проектировании средств, базируемых на механизме РНК-интерференции, являлось использование участков вирусного генома в качестве мишеней, что отражено в одной из ранних работ Q. Ge и соавт. В этом исследовании авторы заражали мышей вирусом гриппа A/PR/8/34 (H1N1) и интраназально инокулировали миРНК к вирусному гену *NP,* что вызывало снижение репродукции в 60 раз [34]. Результаты исследования H.Y. Sui и соавт. показывают, что при использовании миРНК, направленных к консервативной последовательности гена, экспрессирующего вирусный белок M2, наблюдается ингибирование репродукции высоковирулентного A/Hong Kong/486/97 (H5N1) в 3 раза [35]. В работе J. Piasecka и соавт. был рассмотрен противовирусный эффект при миРНК-опосредованном ингибировании образования белка NP вирусов гриппа A/California/04/2009 (H1N1) и A/PR/8/34 (H1N1), во время которого отмечалось снижение вирусной репродукции до 85% по сравнению с контрольной группой [36].

В то же время вирусы гриппа А имеют высокую склонность к мутационной изменчивости в результате замен, делеций, инсерций участков нуклеотидных последовательностей либо реассортаций, что приводит к появлению лекарственной резистентности [23]. Исходя из этого, разработка новых профилактических и терапевтических подходов с использованием миРНК, таргетированных к клеточным мишеням, обладает рядом преимуществ: подобные средства способны обладать как профилактическим, так и терапевтическим потенциалом; возможно осуществить дизайн и синтез препарата на основе миРНК в течение нескольких часов; препараты миРНК можно применять в комплексе с иными противовирусными препаратами для синергии их эффекта; миРНК, таргетированные к клеточным генам, транскрибирующим белковые продукты, ключевые для процесса вирусной репродукции, могут быть направлены по отношению к разным таксономическим группам вирусов [24]. Исходя их этих критериев, важно вести поиск клеточных генов-мишеней, нокдаун которых будет приводить к подавлению репродукции вирусов близко- или дальнородственных таксономических групп. В настоящем исследовании оценивали противовирусный эффект профилактической трансфекции миРНК, нацеленных на клеточные гены *NXF1*, *PRPS1* и *NAA10.* Результаты исследования свидетельствуют о том, что процессы ядерного импорта и экспорта, фосфорибозилирование рибозы-5-фосфата до 5-фосфорибозил-1-пирофосфата, а также посттрансляционная модификация белков могут играть важную роль в репродукции вируса гриппа [37–39]. Ингибирование трансляции рассматриваемых генов приводит к снижению вирусной репродукции по результатам использования таких методов, как титрование по ЦПД и ОТ-ПЦР. Было показано, что наряду со снижением показателя вирусного титра, начиная с момента липофекции исследуемых миРНК, отмечалось и снижение количества вРНК в течение 3 сут. Наиболее эффективное снижение вирусной репродукции наблюдалось при подавлении гена *NXF1* в 1-е сутки с момента трансфекции всех специфически ингибирующих миРНК: снижение вирусного титра на 2,0–3,2 lg ТЦД$_{50}$/мл и количества вРНК в 11,2–1088,0 раза. Временное нарушение репродукции вируса гриппа в результате миРНК-опосредованной блокировки ядерного импорта и экспорта в результате сайленсинга гена *NXF1* приводило к более выраженному противовирусному эффекту, по сравнению с иными исследуемыми в настоящем исследовании клеточными генами. Подобный результат может быть опосредован тем, что в ходе своей репродукции вирусы гриппа осуществляют часть репликативного цикла в нуклеоплазме, транслоцируясь через ядерно-поровый комплекс в мембране ядра, а рибозилирование и посттрансляционная модификация белков могут осуществляться иными путями [40–42].

Параллельно с этим, в ряде исследований отмечается значимость гена/белка *NXF1* в репродуктивном цикле иных вирусов. Так, в работе M. Mei и соавт. отмечается ключевое значение NXF1 в ядерном экспорте мРНК для SARS-CoV-2, однако структурно-управляемый мутагенез кислотного участка (D33, E36, E37 и E41) на поверхности N-концевого домена Nsp1, опосредующего взаимодействие с NXF1, приводил к блокировке ядерного экспорта [43]. Схожий дефект связывания NS1 вируса гриппа А с осью NXF1•NXT1 приводит к высвобождению мРНК, кодирующих экспрессию ряда иммунных факторов, из ядра, и как следствие, к снижению вирусной активности, что представлено в работе K. Zhang и соавт. [44]. Не менее важной представляется роль NXF1 в жизненном цикле вируса Эбола, показанная в исследовании L. Wendt и соавт., где авторы проводили реакцию коиммунопреципитации и двойного иммунофлуоресцентного анализа с целью охарактеризовать взаимодействие NXF1 с вирусными белками и вРНК. Было выявлено, что вирусный белок NP взаимодействует с РНК-связывающим доменом NXF1 и конкурирует с РНК за это взаимодействие. Также в работе использовалась минигеномная система, при которой наблюдался нокдаун гена *NXF1*. На фоне того, что уровни мРНК в клетках с дисфункцией NXF1 были сопоставимы с контрольными клетками, авторы предположили, что NXF1 важен для ядерного экспорта мРНК к рибосомам для эффективной трансляции мРНК [45]. Несплайсированная РНК ВИЧ-1 используется для последующей трансляции вирусных белков, однако перед этим она должна быть транслоцирована из нуклеоплазмы в цитоплазму. В работе J. Chen и соавт. с использованием гибридизации *in situ* было установлено, что для ядерного экспорта, используемого ВИЧ-1, задействуется NXF1 [46].

Наряду с транскрипцией и трансляцией, транслокация мРНК через ядерный поровый комплекс (NPC), структурным компонентом которого является NXF1,

представляется важным регуляторным этапом экспрессии генов ряда вирусных семейств [47]. Основываясь на результатах, полученных в исследовании, а также рассмотренных выше литературных источников, можно сделать вывод, что белковый продукт экспрессии гена *NXF1* играет важную роль в репродукции вирусов, относящихся к разным таксономическим группам. Помимо гена *NXF1,* иные гены, образующие NPC, также являются мишенями, сайленсинг которых способен приводить к снижению вирусной репродукции. Так, в нашем раннем исследовании была показана взаимосвязь между снижением вирусной активности гриппа А и ингибированием экспрессии генов *Nup98* и *Nup205,* также кодирующих образование белков-нуклеопоринов NPC [48]. Исходя из этого, миРНК-опосредованное нарушение функциональной активности некоторых компонентов NPC может рассматриваться как один из перспективных вариантов разработки противовирусных препаратов, направленных на широкий спектр вирусных инфекций.

Полученные в ходе исследования результаты ясно демонстрируют, что профилактическая схема использования миРНК снижает последующую вирусную репродукцию. Имеющиеся данные согласуются с концепцией того, что профилактическая блокировка факторов клетки-хозяина, важных для вирусной репродукции, посредством миРНК, способно нарушать инфекционный процесс [49]. В тот же момент важно понимать, что подобная схема введения нуждается в точном выборе времени введения профилактического препарата. Ввиду этого, необходимо также проводить исследования, целью которых будет оптимизация и подбор оптимальных условий и времени для введения профилактического препарата.

Заключение

Полученные данные подтверждают, что гены, кодирующие экспрессию белков, образующих ядерно-поровый комплекс, являются перспективными мишенями для перспективных противовирусных миРНК, «нокдаун» их экспрессии приводит к снижению репродукции вирусов гриппа, а создание противовирусных препаратов на основе РНК-интерференции представляет из себя перспективный вектор направления разработки противогриппозных препаратов на основе механизма РНК-интерференции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Purcell R., Giles M.L., Crawford N.W., Buttery J. Systematic review of avian influenza virus infection and outcomes during pregnancy. *Emerg. Infect. Dis*. 2025; 31(1): 50–6. https://doi.org/10.3201/eid3101.241343
2. Bin N.R., Prescott S.L., Horio N., Wang Y., Chiu I.M., Liberles S.D. An airway-to-brain sensory pathway mediates influenza-induced sickness. *Nature*. 2023; 615(7953): 660–7. https://doi.org/10.1038/s41586-023-05796-0
3. Kenney A.D., Aron S.L., Gilbert C., Kumar N., Chen P., Eddy A., et al. Influenza virus replication in cardiomyocytes drives heart dysfunction and fibrosis. *Sci. Adv*. 2022; 8(19): eabm5371. https://doi.org/10.1126/sciadv.abm5371
4. Conrad A., Valour F., Vanhems P. Burden of influenza in the elderly: a narrative review. *Curr. Opin. Infect. Dis*. 2023; 36(4): 296–302. https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000931
5. Watanabe T. Renal complications of seasonal and pandemic influenza A virus infections. *Eur. J. Pediatr*. 2013; 172(1): 15–22. https://doi.org/10.1007/s00431-012-1854-x
6. van de Veerdonk F.L., Wauters J., Verweij P.E. Invasive aspergillus tracheobronchitis emerging as a highly lethal complication of severe influenza. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2020; 202(5): 646–8. https://doi.org/10.1164/rccm.202005-1883ED
7. Feys S., Cardinali-Benigni M., Lauwers H.M., Jacobs C., Stevaert A., Gonçalves S.M., et al. Profiling bacteria in the lungs of patients with severe influenza versus COVID-19 with or without aspergillosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2024; 210(10): 1230–42. https://doi.org/10.1164/rccm.202401-0145OC
8. Białka S., Zieliński M., Latos M., Skurzyńska M., Żak M., Palaczyński P., et al. Severe bacterial superinfection of influenza pneumonia in immunocompetent young patients: case reports. *J. Clin. Med*. 2024; 13(19): 5665. https://doi.org/10.3390/jcm13195665
9. Pleguezuelos O., James E., Fernandez A., Lopes V., Rosas L.A., Cervantes-Medina A., et al. Efficacy of FLU-v, a broad-spectrum influenza vaccine, in a randomized phase IIb human influenza challenge study. *NPJ Vaccines*. 2020; 5(1): 22. https://doi.org/10.1038/s41541-020-0174-9
10. Isakova-Sivak I., Rudenko L. Next-generation influenza vaccines based on mRNA technology. *Lancet Infect. Dis*. 2025; 25(1): 2–3. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(24)00562-0
11. Hodgson D., Sánchez-Ovando S., Carolan L., Liu Y., Hadiprodjo A.J., Fox A., et al. Quantifying the impact of pre-vaccination titre and vaccination history on influenza vaccine immunogenicity. *Vaccine*. 2025; 44: 126579. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.126579
12. Gaitonde D.Y., Moore F.C., Morgan M.K. Influenza: diagnosis and treatment. *Am. Fam. Physician*. 2019; 100(12): 751–8.
13. Li Y., Huo S., Yin Z., Tian Z., Huang F., Liu P., et al. The current state of research on influenza antiviral drug development: drugs in clinical trial and licensed drugs. *mBio*. 2023; 14(5): e0127323. https://doi.org/10.1128/mbio.01273-23
14. Wang J., Li Y. Current advances in antiviral RNA interference in mammals. *FEBS J*. 2024; 291(2): 208–16. https://doi.org/10.1111/febs.16728
15. Traber G.M., Yu A.M. RNAi-based therapeutics and novel RNA bioengineering technologies. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2023; 384(1): 133–54. https://doi.org/10.1124/jpet.122.001234
16. Qureshi A., Tantray V.G., Kirmani A.R., Ahangar A.G. A review on current status of antiviral siRNA. *Rev. Med. Virol*. 2018; 28(4): e1976. https://doi.org/10.1002/rmv.1976
17. Chokwassanasakulkit T., Oti V.B., Idris A., McMillan N.A. SiRNAs as antiviral drugs – Current status, therapeutic potential and challenges. *Antiviral. Res*. 2024; 232: 106024. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2024.106024
18. Wang L., Dai X., Song H., Yuan P., Yang Z., Dong W., et al. Inhibition of porcine transmissible gastroenteritis virus infection in porcine kidney cells using short hairpin RNAs targeting the membrane gene. *Virus Genes*. 2017; 53(2): 226–32. https://doi.org/10.1007/s11262-016-1409-8
19. Lambeth L.S., Zhao Y., Smith L.P., Kgosana L., Nair V. Targeting Marek's disease virus by RNA interference delivered from a herpesvirus vaccine. *Vaccine*. 2009; 27(2): 298–306. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.10.023
20. Chen W., Liu M., Jiao Y., Yan W., Wei X., Chen J., et al. Adenovirus-mediated RNA interference against foot-and-mouth disease virus infection both in vitro and in vivo. *J. Virol*. 2006; 80(7): 3559–66. https://doi.org/10.1128/JVI.80.7.3559-3566.2006
21. Keene K.M., Foy B.D., Sanchez-Vargas I., Beaty B.J., Blair C.D., Olson K.E. RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaviridae) infection of Anopheles gambiae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101(49): 17240–5. https://doi.org/10.1073/pnas.0406983101
22. Ahmed F., Kleffmann T., Husain M. Acetylation, methylation and allysine modification profile of viral and host proteins during influenza A virus infection. *Viruses*. 2021; 13(7): 1415. https://doi.org/10.3390/v13071415
23. Izumi H. Conformational variability prediction of influenza virus hemagglutinins with amino acid mutations using supersecondary structure code. *Methods. Mol. Biol*. 2025; 2870: 63–78. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4213-9_5
24. Lesch M., Luckner M., Meyer M., Weege F., Gravenstein I., Raftery M., et al. RNAi-based small molecule repositioning reveals

clinically approved urea-based kinase inhibitors as broadly active antivirals. *PLoS Pathog*. 2019; 15(3): e1007601. https://doi.org/101371/journal.ppat.1007601
25. Li X., Berg N.K., Mills T., Zhang K., Eltzschig H.K., Yuan X. Adenosine at the interphase of hypoxia and inflammation in lung injury. *Front. Immunol*. 2021; 11: 604944. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604944
26. Read E.K., Digard P. Individual influenza A virus mRNAs show differential dependence on cellular NXF1/TAP for their nuclear export. *J. Gen. Virol*. 2010; 91(Pt. 5): 1290–301. https://doi.org/10.1099/vir.0.018564-0
27. Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol*. 2016; 5(2): 85–6. https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85
28. Пашков Е.А., Самойликов Р.В., Пряников Г.А., Быков А.С., Пашков Е.П., Поддубиков А.В. и др. Иммуномодулирующий эффект комплексов миРНК in vitro при гриппозной инфекции. *Российский иммунологический журнал*. 2023; 26(4): 457–62. https://doi.org/10.46235/1028-7221-13984-IVI https://elibrary.ru/byxobk
29. Estrin M.A., Hussein I.T.M., Puryear W.B., Kuan A.C., Artim S.C., Runstadler J.A. Host-directed combinatorial RNAi improves inhibition of diverse strains of influenza A virus in human respiratory epithelial cells. *PLoS One*. 2018; 13(5): e0197246. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197246
30. Файзулоев Е.Б. *Изучение противовирусной активности антисмысловых РНК и рибозимов в отношении инфекции, вызываемой вирусом алеутской болезни норок:* Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М.; 2002.
31. Lee H.K., Loh T.P., Lee C.K., Tang J.W., Chiu L., Koay E.S. A universal influenza A and B duplex real-time RT-PCR assay. *J. Med. Virol*. 2012; 84(10): 1646–51. https://doi.org/10.1002/jmv.23375
32. Bustin S.A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *J. Mol. Endocrinol*. 2005; 34(3): 597–601. https://doi.org/10.1677/jme.1.01755
33. Howard C.W., Zou G., Morrow S.A., Fridman S., Racosta J.M. Wilcoxon-Mann-Whitney odds ratio: A statistical measure for ordinal outcomes such as EDSS. *Mult. Scler. Relat. Disord*. 2022; 59: 103516. https://doi.org/10.1016/j.msard.2022.103516
34. Ge Q., Filip L., Bai A., Nguyen T., Eisen H.N., Chen J. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101(23): 8676–81. https://doi.org/10.1073/pnas.0402486101
35. Sui H.Y., Zhao G.Y., Huang J.D., Jin D.Y., Yuen K.Y., Zheng B.J. Small interfering RNA targeting M2 gene induces effective and long-term inhibition of influenza A virus replication. *PLoS One*. 2009; 4(5): 5671. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005671
36. Piasecka J., Lenartowicz E., Soszynska-Jozwiak M., Szutkowska B., Kierzek R., Kierzek E. RNA secondary structure motifs of the influenza A virus as targets for siRNA-mediated RNA interference. *Mol. Ther. Nucleic. Acids*. 2020; 19: 627–42. https://doi.org/10.1016/j/omtn.2019.12.018
37. Zhou Y., Liu Y., Gupta S., Paramo M.I., Hou Y., Mao C., et al. A comprehensive SARS-CoV-2-human protein-protein interactome reveals COVID-19 pathobiology and potential host therapeutic targets. *Nat. Biotechnol*. 2023; 41(1): 128–39. https://doi.org/10.1038/s41587-022-01474-0
38. Hu J., Zhang L., Liu X. Role of post-translational modifications in influenza A virus life cycle and host innate immune response. *Front. Microbiol*. 2020; 11: 517461. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.517461
39. Zhang K., Cagatay T., Xie D., Angelos A.E., Cornelius S., Aksenova V., et al. Cellular NS1-BP protein interacts with the mRNA export receptor NXF1 to mediate nuclear export of influenza virus M mRNAs. *J. Biol. Chem*. 2024; 300(11): 107871. https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107871
40. Esparza M., Bhat P., Fontoura B.M. Viral-host interactions during splicing and nuclear export of influenza virus mRNAs. *Curr. Opin. Virol*. 2022; 55: 101254. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2022.101254
41. Dawson A.R., Wilson G.M., Coon J.J., Mehle A. Post-Translation Regulation of Influenza Virus Replication. *Annu. Rev. Virol*. 2020; 7(1): 167–87. https://doi.org/10.1146/annurev-virology-010320-070410
42. Husain M. Influenza A virus and acetylation: the picture is becoming clearer. *Viruses*. 2024; 16(1): 131. https://doi.org/10.3390/v16010131
43. Mei M., Cupic A., Miorin L., Ye C., Cagatay T., Zhang K., et al. Inhibition of mRNA nuclear export promotes SARS-CoV-2 pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2024; 121(22): e2314166121. https://doi.org/10.1073/pnas.2314166121
44. Zhang K., Xie Y., Muñoz-Moreno R., Wang J., Zhang L., Esparza M., et al. Structural basis for influenza virus NS1 protein block of mRNA nuclear export. *Nat. Microbiol*. 2019; 4(10): 1671–9. https://doi.org/10.1038/s41564-019-0482-x
45. Wendt L., Brandt J., Bodmer B.S., Reiche S., Schmidt M.L., Traeger S., et al. The Ebola virus nucleoprotein recruits the nuclear RNA export factor NXF1 into inclusion bodies to facilitate viral protein expression. *Cells*. 2020; 9(1): 187. https://doi.org/10.3390/cells9010187
46. Chen J., Umunnakwe C., Sun D.Q., Nikolaitchik O.A., Pathak V.K., Berkhout B., et al. Impact of nuclear export pathway on cytoplasmic HIV-1 RNA transport mechanism and distribution. *mBio*. 2020; 11(6): e01578–20. https://doi.org/10.1128/mBio.01578-20
47. Guo J., Zhu Y., Ma X., Shang G., Liu B., Zhang K. Virus infection and mRNA nuclear export. *Int. J. Mol. Sci*. 2023; 24(16): 12593. https://doi.org/10.3390/ijms241612593
48. Пак А.В., Пашков Е.А., Абрамова Н.Д., Поддубиков А.В., Нагиева Ф.Г., Богданова Е.А. и др. Действие противовирусных миРНК на выработку цитокинов in vitro. *Тонкие химические технологии*. 2022; 17(5): 384–93. https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-5-384-393 https://elibrary.ru/meflst
49. Banerjee A., Mukherjee S., Maji B.K. Manipulation of genes could inhibit SARS-CoV-2 infection that causes COVID-19 pandemics. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2021; 246(14): 1643–9. https://doi.org/10.1177/15353702211008106

REFERENCES

1. Purcell R., Giles M.L., Crawford N.W., Buttery J. Systematic review of avian influenza virus infection and outcomes during pregnancy. *Emerg. Infect. Dis*. 2025; 31(1): 50–6. http://doi.org/10.3201/eid3101.241343
2. Bin N.R., Prescott S.L., Horio N., Wang Y., Chiu I.M., Liberles S.D. An airway-to-brain sensory pathway mediates influenza-induced sickness. *Nature*. 2023; 615(7953): 660–7. http://doi.org/10.1038/s41586-023-05796-0
3. Kenney A.D., Aron S.L., Gilbert C., Kumar N., Chen P., Eddy A., et al. Influenza virus replication in cardiomyocytes drives heart dysfunction and fibrosis. *Sci. Adv*. 2022; 8(19): eabm5371. http://doi.org/10.1126/sciadv.abm5371
4. Conrad A., Valour F., Vanhems P. Burden of influenza in the elderly: a narrative review. *Curr. Opin. Infect. Dis*. 2023; 36(4): 296–302. http://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000931
5. Watanabe T. Renal complications of seasonal and pandemic influenza A virus infections. *Eur. J. Pediatr*. 2013; 172(1): 15–22. http://doi.org/10.1007/s00431-012-1854-x
6. van de Veerdonk F.L., Wauters J., Verweij P.E. Invasive aspergillus tracheobronchitis emerging as a highly lethal complication of severe influenza. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2020; 202(5): 646–8. http://doi.org/10.1164/rccm.202005-1883ED
7. Feys S., Cardinali-Benigni M., Lauwers H.M., Jacobs C., Stevaert A., Gonçalves S.M., et al. Profiling bacteria in the lungs of patients with severe influenza versus COVID-19 with or without aspergillosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2024; 210(10): 1230–42. http://doi.org/10.1164/rccm.202401-0145OC
8. Białka S., Zieliński M., Latos M., Skurzyńska M., Żak M., Palaczyński P., et al. Severe bacterial superinfection of influenza pneumonia in immunocompetent young patients: case reports. *J. Clin. Med*. 2024; 13(19): 5665. http://doi.org/10.3390/jcm13195665
9. Pleguezuelos O., James E., Fernandez A., Lopes V., Rosas L.A., Cervantes-Medina A., et al. Efficacy of FLU-v, a broad-spectrum influenza vaccine, in a randomized phase IIb human influenza challenge study. *NPJ Vaccines*. 2020; 5(1): 22. http://doi.org/10.1038/s41541-020-0174-9
10. Isakova-Sivak I., Rudenko L. Next-generation influenza vaccines based on mRNA technology. *Lancet Infect. Dis*. 2025; 25(1): 2–3. http://doi.org/10.1016/S1473-3099(24)00562-0
11. Hodgson D., Sánchez-Ovando S., Carolan L., Liu Y., Hadiprodjo A.J., Fox A., et al. Quantifying the impact of pre-vaccination titre and vac-

cination history on influenza vaccine immunogenicity. *Vaccine*. 2025; 44: 126579. http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.126579
12. Gaitonde D.Y., Moore F.C., Morgan M.K. Influenza: diagnosis and treatment. *Am. Fam. Physician*. 2019; 100(12): 751–8.
13. Li Y., Huo S., Yin Z., Tian Z., Huang F., Liu P., et al. The current state of research on influenza antiviral drug development: drugs in clinical trial and licensed drugs. *mBio*. 2023; 14(5): e0127323. http://doi.org/10.1128/mbio.01273-23
14. Wang J., Li Y. Current advances in antiviral RNA interference in mammals. *FEBS J*. 2024; 291(2): 208–16. http://doi.org/10.1111/febs.16728
15. Traber G.M., Yu A.M. RNAi-based therapeutics and novel RNA bioengineering technologies. *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2023; 384(1): 133–54. http://doi.org/10.1124/jpet.122.001234
16. Qureshi A., Tantray V.G., Kirmani A.R., Ahangar A.G. A review on current status of antiviral siRNA. *Rev. Med. Virol*. 2018; 28(4): e1976. http://doi.org/10.1002/rmv.1976
17. Chokwassanasakulkit T., Oti V.B., Idris A., McMillan N.A. SiRNAs as antiviral drugs – Current status, therapeutic potential and challenges. *Antiviral. Res*. 2024; 232: 106024. http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2024.106024
18. Wang L., Dai X., Song H., Yuan P., Yang Z., Dong W., et al. Inhibition of porcine transmissible gastroenteritis virus infection in porcine kidney cells using short hairpin RNAs targeting the membrane gene. *Virus Genes*. 2017; 53(2): 226–32. http://doi.org/10.1007/s11262-016-1409-8
19. Lambeth L.S., Zhao Y., Smith L.P., Kgosana L., Nair V. Targeting Marek's disease virus by RNA interference delivered from a herpesvirus vaccine. *Vaccine*. 2009; 27(2): 298–306. http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.10.023
20. Chen W., Liu M., Jiao Y., Yan W., Wei X., Chen J., et al. Adenovirus-mediated RNA interference against foot-and-mouth disease virus infection both in vitro and in vivo. *J. Virol*. 2006; 80(7): 3559–66. http://doi.org/10.1128/JVI.80.7.3559-3566.2006
21. Keene K.M., Foy B.D., Sanchez-Vargas I., Beaty B.J., Blair C.D., Olson K.E. RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaviridae) infection of Anopheles gambiae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101(49): 17240–5. http://doi.org/10.1073/pnas.0406983101
22. Ahmed F., Kleffmann T., Husain M. Acetylation, methylation and allysine modification profile of viral and host proteins during influenza A virus infection. *Viruses*. 2021; 13(7): 1415. http://doi.org/10.3390/v13071415
23. Izumi H. Conformational variability prediction of influenza virus hemagglutinins with amino acid mutations using supersecondary structure code. *Methods. Mol. Biol*. 2025; 2870: 63–78. http://doi.org/10.1007/978-1-0716-4213-9_5
24. Lesch M., Luckner M., Meyer M., Weege F., Gravenstein I., Raftery M., et al. RNAi-based small molecule repositioning reveals clinically approved urea-based kinase inhibitors as broadly active antivirals. *PLoS Pathog*. 2019; 15(3): e1007601. http://doi.org/101371/journal.ppat.1007601
25. Li X., Berg N.K., Mills T., Zhang K., Eltzschig H.K., Yuan X. Adenosine at the interphase of hypoxia and inflammation in lung injury. *Front. Immunol*. 2021; 11: 604944. http://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604944
26. Read E.K., Digard P. Individual influenza A virus mRNAs show differential dependence on cellular NXF1/TAP for their nuclear export. *J. Gen. Virol*. 2010; 91(Pt. 5): 1290–301. http://doi.org/10.1099/vir.0.018564-0
27. Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol*. 2016; 5(2): 85–6. http://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85
28. Pashkov E.A., Samoilikov R.V., Pryanikov G.A., Bykov A.S., Pashkov E.P., Poddubikov A.V., et al. In vitro immunomodulatory effect of siRNA complexes in the influenza infection. *Russian Journal of Immunology*. 2023; 26(4): 457–62. http://doi.org/10.46235/1028-7221-13984-IVI https://elibrary.ru/byxobk (in Russian)
29. Estrin M.A., Hussein I.T.M., Puryear W.B., Kuan A.C., Artim S.C., Runstadler J.A. Host-directed combinatorial RNAi improves inhibition of diverse strains of influenza A virus in human respiratory epithelial cells. *PLoS One*. 2018; 13(5): e0197246. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0197246
30. Faizuloev E.B. *Study of antiviral activity of antisense RNAs and ribozymes in relation to infection caused by the Aleutian mink disease virus:* Diss. Moscow; 2002. (in Russian)
31. Lee H.K., Loh T.P., Lee C.K., Tang J.W., Chiu L., Koay E.S. A universal influenza A and B duplex real-time RT-PCR assay. *J. Med. Virol*. 2012; 84(10): 1646–51. http://doi.org/10.1002/jmv.23375
32. Bustin S.A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective. *J. Mol. Endocrinol*. 2005; 34(3): 597–601. http://doi.org/10.1677/jme.1.01755
33. Howard C.W., Zou G., Morrow S.A., Fridman S., Racosta J.M. Wilcoxon-Mann-Whitney odds ratio: A statistical measure for ordinal outcomes such as EDSS. *Mult. Scler. Relat. Disord*. 2022; 59: 103516. http://doi.org/10.1016/j.msard.2022.103516
34. Ge Q., Filip L., Bai A., Nguyen T., Eisen H.N., Chen J. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101(23): 8676–81. http://doi.org/10.1073/pnas.0402486101
35. Sui H.Y., Zhao G.Y., Huang J.D., Jin D.Y., Yuen K.Y., Zheng B.J. Small interfering RNA targeting M2 gene induces effective and long-term inhibition of influenza A virus replication. *PLoS One*. 2009; 4(5): 5671. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0005671
36. Piasecka J., Lenartowicz E., Soszynska-Jozwiak M., Szutkowska B., Kierzek R., Kierzek E. RNA secondary structure motifs of the influenza A virus as targets for siRNA-mediated RNA interference. *Mol. Ther. Nucleic. Acids*. 2020; 19: 627–42. http://doi.org/10.1016/j/omtn.2019.12.018
37. Zhou Y., Liu Y., Gupta S., Paramo M.I., Hou Y., Mao C., et al. A comprehensive SARS-CoV-2-human protein-protein interactome reveals COVID-19 pathobiology and potential host therapeutic targets. *Nat. Biotechnol*. 2023; 41(1): 128–39. http://doi.org/10.1038/s41587-022-01474-0
38. Hu J., Zhang L., Liu X. Role of post-translational modifications in influenza A virus life cycle and host innate immune response. *Front. Microbiol*. 2020; 11: 517461. http://doi.org/10.3389/fmicb.2020.517461
39. Zhang K., Cagatay T., Xie D., Angelos A.E., Cornelius S., Aksenova V., et al. Cellular NS1-BP protein interacts with the mRNA export receptor NXF1 to mediate nuclear export of influenza virus M mRNAs. *J. Biol. Chem*. 2024; 300(11): 107871. http://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107871
40. Esparza M., Bhat P., Fontoura B.M. Viral-host interactions during splicing and nuclear export of influenza virus mRNAs. *Curr. Opin. Virol*. 2022; 55: 101254. http://doi.org/10.1016/j.coviro.2022.101254
41. Dawson A.R., Wilson G.M., Coon J.J., Mehle A. Post-Translation Regulation of Influenza Virus Replication. *Annu. Rev. Virol*. 2020; 7(1): 167–87. http://doi.org/10.1146/annurev-virology-010320-070410
42. Husain M. Influenza A virus and acetylation: the picture is becoming clearer. *Viruses*. 2024; 16(1): 131. http://doi.org/10.3390/v16010131
43. Mei M., Cupic A., Miorin L., Ye C., Cagatay T., Zhang K., et al. Inhibition of mRNA nuclear export promotes SARS-CoV-2 pathogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2024; 121(22): e2314166121. http://doi.org/10.1073/pnas.2314166121
44. Zhang K., Xie Y., Muñoz-Moreno R., Wang J., Zhang L., Esparza M., et al. Structural basis for influenza virus NS1 protein block of mRNA nuclear export. *Nat. Microbiol*. 2019; 4(10): 1671–9. http://doi.org/10.1038/s41564-019-0482-x
45. Wendt L., Brandt J., Bodmer B.S., Reiche S., Schmidt M.L., Traeger S., et al. The Ebola virus nucleoprotein recruits the nuclear RNA export factor NXF1 into inclusion bodies to facilitate viral protein expression. *Cells*. 2020; 9(1): 187. http://doi.org/10.3390/cells9010187
46. Chen J., Umunnakwe C., Sun D.Q., Nikolaitchik O.A., Pathak V.K., Berkhout B., et al. Impact of nuclear export pathway on cytoplasmic HIV-1 RNA transport mechanism and distribution. *mBio*. 2020; 11(6): e01578–20. http://doi.org/10.1128/mBio.01578-20
47. Guo J., Zhu Y., Ma X., Shang G., Liu B., Zhang K. Virus infection and mRNA nuclear export. *Int. J. Mol. Sci*. 2023; 24(16): 12593. http://doi.org/10.3390/ijms241612593
48. Pak A.V., Pashkov E.A., Abramova N.D., Poddubikov A.V., Nagieva F.G., Bogdanova E.A., et al. Effect of antiviral siRNAs on the production of cytokines in vitro. *Tonkie khimicheskie tekhnologii*. 2022; 17(5): 384–93. https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-5-384-393 https://elibrary.ru/meflst (in Russian)
49. Banerjee A., Mukherjee S., Maji B.K. Manipulation of genes could inhibit SARS-CoV-2 infection that causes COVID-19 pandemics. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2021; 246(14): 1643–9. http://doi.org/10.1177/15353702211008106

Информация об авторах:

Пашков Евгений Алексеевич✉ – канд. мед. наук, ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет); младший научный сотрудник лаборатории прикладной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия. E-mail: pashckov.j@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-5682-4581

Шиквин Дмитрий Андреевич – студент кафедры биотехнологии и промышленной фармации Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова РТУ МИРЭА, Москва, Россия. E-mail: carrypool@gmail.com; https://orcid.org/0009-0005-9874-2081

Пашков Георгий Алексеевич – студент клинического института детского здоровья им. Н.Ф. Филатова ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия. E-mail: georgp2004@mail.ru; https://orcid.org/0000-0003-0392-9969

Пашков Евгений Петрович – д-р мед. наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия. E-mail: 9153183256@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-4963-5053

Быков Анатолий Сергеевич – д-р мед. наук, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия. E-mail: drbykov@bk.ru; https://orcid.org/0000-0002-8099-6201

Нагиева Фирая Галиевна – д-р мед. наук, доцент, заведующая лабораторией гибридных клеточных культур ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия. E-mail: fgn42@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0001-8204-4899

Богданова Екатерина Александровна – канд. мед. наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия. E-mail: bogdekaterin@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-5620-1843

Свитич Оксана Анатольевна – чл.-корр. РАН, д-р мед. наук, директор ФГБНУ НИИВС им И.И. Мечникова, заведующая лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, профессор кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия. E-mail: svitichoa@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0003-1757-8389

Зверев Виталий Васильевич – академик РАН, д-р биол. наук, научный руководитель ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия. E-mail: vitalyzverev@outlook.com; https://orcid.org/0000-0002-0017-1892

Участие авторов: Пашков Е.А., Шиквин Д.А., Пашков Г.А., Нагиева Ф.Г., Свитич О.А. – выполнение экспериментов; Пашков Е.А., Быков А.С., Пашков Е.П. – написание текста, заключение; Нагиева Ф.Г., Богданова Е.А., Зверев В.В. – научное редактирование; Пашков Е.П., Свитич О.А., Зверев В.В. – резюме, общая редакция.

Поступила 05.01.2025
Принята в печать 24.02.2025
Опубликована 28.02.2025

Information about the authors:

Evgenij A. Pashkov✉ – Ph. D., assistant of microbiology, virology and immunology department of Sechenov University, Moscow, Russia; junior researcher laboratory of virology applied of I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia. E-mail: pashckov.j@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-5682-4581

Dmitry A. Shikvin – student of the Department of Biotechnology and Industrial Pharmacy of the Institute of Fine Chemical Technologies named after M.V. Lomonosov RTU MIREA Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «MIREA – Russian Technological University», Moscow, Russia. E-mail: carrypool@gmail.com; https://orcid.org/0009-0005-9874-2081

George A. Pashkov – student of the Institute of Children Health, Sechenov University, Moscow, Russia. E-mail: georgp2004@mail.ru; https://orcid.org/0000-0003-0392-9969

Evgenij P. Pashkov – MD, Professor of Microbiology, Virology and Immunology department of Sechenov University, Moscow, Russia. E-mail: 9153183256@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-4963-5053

Anatoly S. Bykov – MD, Professor of Microbiology, Virology and Immunology department of Sechenov University, Moscow, Russia. E-mail: drbykov@bk.ru; https://orcid.org/0000-0002-8099-6201

Firaya G. Nagieva – MD, private-docent, The Head of laboratory of hybrid cell cultures of I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia. E-mail: fgn42@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0001-8204-4899

Ekaterina A. Bogdanova – Ph. D., private-docent of Microbiology, Virology and Immunology department of Sechenov University, Moscow, Russia. E-mail: bogdekaterin@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-5620-1843

Oxana A. Svitich – Corresponding member of RAS, MD, The head of I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia; Professor of Microbiology, Virology and Immunology department of Sechenov University, Moscow, Russia. E-mail: svitichoa@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0003-1757-8389

Vitaliy V. Zverev – Academician of RAS, Doctor of Biological Sciences, Scientific Adviser of I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia; Professor, The Leader of Microbiology, Virology and Immunology department of Sechenov University, Moscow, Russia . E-mail: vitalyzverev@outlook.com; https://orcid.org/0000-0002-0017-1892

Contribution: Pashkov E.A., Shikvin D.A., Pashkov G.A., Nagieva F.G., Svitich O.A. – performing experiments; Pashkov E.A., Bykov A.S., Pashkov E.P. – writing the text, conclusion; Nagieva F.G., Bogdanova E.A., Zverev V.V. – scientific editing; Pashkov E.P., Svitich O.A., Zverev V.V. – summary, general edition.

Received 05 January 2025
Accepted 24 February 2025
Published 28 February 2025

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-290
© ПАЛЬЯНОВА Н.В., АДАМЕНКО Л.С., КУРСКАЯ О.Г., САРОЯН Т.А., СОЛОМАТИНА М.В., СОБОЛЕВ И.А., ШЕСТОПАЛОВ А.М., 2025

Суммарные антитела и нейтрализующая способность сывороток реконвалесцентов по отношению к трем разным штаммам SARS-CoV-2

Пальянова Н.В.✉, Адаменко Л.С., Курская О.Г., Сароян Т.А., Соломатина М.В., Соболев И.А., Шестопалов А.М.

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», 630117, г. Новосибирск, Россия

Резюме
Цель исследования. Оценить уровень гуморального иммунитета реконвалесцентов против SARS-CoV-2.
Материалы и методы. В исследовании участвовали 259 человек в возрасте от 18 лет до 81 года, отобранных случайным образом в ФГБНУ «ФИЦ ФТМ» и в ФГБУН «Институт неорганической химии им. А.В. Николаева» СО РАН. У участников определяли количество антител методом иммуноферментного анализа. Титры нейтрализующих антител выявляли с помощью реакции микронейтрализации с использованием 3 штаммов SARS-CoV-2. NGS-секвенирование проводили с использованием платформы Illumina MiSeq, филогенетический анализ – с помощью ресурса NextClade.
Результаты. Среднее количество антител у реконвалесцентов составило 133,42 ± 7,20 BAU/мл. Количество антител не зависело от пола и возраста пациентов, а также от времени, прошедшего после перенесенного COVID-19. Изучаемые штаммы SARS-CoV-2 были отсеквенированы и задепонированы в международную базу данных GISAID, проведен генетический анализ: EPI_ISL_19424272 филогенетически относится к кладе B1.1, EPI_ISL_19424271 относится к кладе B.1.1.397, EPI_ISL_19424270 относится к варианту Дельта B.1.617.2.122. Не было выявлено достоверных различий в нейтрализующей способности сывороток реконвалесцентов (переболевших за 2–3 мес до исследования) для первых двух вариантов SARS-CoV-2 (циркулировавших на момент болезни участников исследования) и она была значительно снижена для варианта, относящегося к кладе Дельта, появившегося в новосибирском регионе позже (1/2 сывороток не показала нейтрализацию).
Выводы. Нейтрализующая способность сывороток реконвалесцентов имеет наибольшую активность в отношении тех вариантов вируса, которым переболел пациент, в то время как против нового варианта она оказывается сниженной или отсутствует. Циркуляция SARS-CoV-2 продолжается, и иммунитет, выработанный к первоначальным вариантам вируса, может оказаться недостаточно эффективным против вновь возникающих штаммов вследствие появления у вируса мутаций, позволяющих избегать выработанных ранее антител.

Ключевые слова: *SARS-CoV-2; антитела; сыворотка; нейтрализация; штаммы; NGS-секвенирование*

Для цитирования: Пальянова Н.В., Адаменко Л.С., Курская О.Г., Сароян Т.А., Соломатина М.В., Соболев И.А., Шестопалов А.М. Суммарные антитела и нейтрализующая способность сывороток реконвалесцентов по отношению к трем разным штаммам SARS-CoV-2. *Вопросы вирусологии*. 2025; 70(1): 78–86. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-290 EDN: https://elibrary.ru/qcllgf

Финансирование. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ, проект № 23-64-00005 (сбор материалов и секвенирование). Генетический и статистический анализы выполнены в соответствии с государственным заданием Министерства науки и высшего образования России для НИИ Вирусологии ФИЦ ФТМ (FGMU-2025-0009).
Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.
Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике при ФИЦ ФТМ (протокол № 8 от 11.03.2020).

ORIGINAL STUDY ARTICLE
DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-290

Total antibodies and neutralizing ability of convalescent sera against three different strains of SARS-CoV-2

Natalia V. Palyanova✉, Lubov S. Adamenko, Olga G. Kurskaya, Tereza A. Saroyan, Mariya V. Solomatina, Ivan A. Sobolev, Alexander M. Shestopalov

Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, 630117, Novosibirsk, Russia

Abstract
The aim of the study was to assess the level of humoral immunity to SARS-CoV-2 in COVID-19 convalescents.
Materials and methods. We used ELISA for antibody quantitation, microneutralization test using three SARS-CoV-2 strains for neutralizing activity measurement, Illumina MiSeq platform for NGS sequencing and NextClade resource for phylogenetic analysis.
Results. The mean concentration of antibody in convalescents was 133.42 ± 7.2 BAU/mL and the value depended on neither the gender and age of the patients, nor on the time elapsed since COVID-19 infection. The studied SARS-CoV-2 strains were sequenced and deposited in the international GISAID database. According to genetic analysis: EPI_ISL_19424272 phylogenetically belongs to the B1.1 clade, EPI_ISL_19424271 – to B.1.1.397 clade, EPI_ISL_19424270 – to Delta B.1.617.2.122. There were no significant differences in the neutralizing ability of convalescent sera (those who had been ill 2–3 months before the study) for the first two variants of SARS-CoV-2 and it was significantly reduced for the Delta variant, which appeared in the Novosibirsk region later.
Conclusions. The neutralizing activity of convalescent sera was the highest against those variants of the virus that the patient had recovered from, while was reduced or absent against the new variant. The antibody developed to the original variants of the SARS-CoV-2 may not be effective enough against newly emerging strains due to the emergence of mutations in the virus that allow it to evade previously developed humoral immune response.

Keywords: *SARS-CoV-2; antibodies; serum; neutralization; strains; NGS sequencing*

For citation: Palyanova N.V., Adamenko L.S., Kurskaya O.G., Saroyan T.A., Solomatina M.V., Sobolev I.A., Shestopalov A.M. Total antibodies and neutralizing ability of convalescent sera against three different strains of SARS-CoV-2. *Problems of Virology* (*Voprosy Virusologii*). 2025; 70(1): 78–86 (In Russ.). DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-290 EDN: https://elibrary.ru/qcllgf

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation grant project No. 23-64-00005 (the collection of materials and sequencing), and genetic and stastictic analysis was carried out in accordance with the state assignment of the Ministry of Science and Higher Education of Russia FGMU-2025-0009.
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 Biomedical Ethics Committee at the Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine (protocol No. 8 of 03/11/2020).

Введение

В декабре 2019 г. в Китае началась вспышка заболеваемости новой коронавирусной инфекцией (COVID-19), которая в марте 2020 г. была признана Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) пандемией. В России заболеваемость начала расти с марта 2020 г., однако первая волна оказалась небольшой по сравнению с последующими волнами. К концу 2020 г. в Новосибирской области (население 2,8 млн человек), по официальным данным, переболело 27 885 человек[1]. Инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2, может протекать скрыто (бессимптомное течение) [1] либо вызывать широкий спектр симптомов COVID-19: от лихорадки, астении или миалгии до пневмонии, в наиболее тяжелых случаях развивается острый респираторный дистресс-синдром [2]. Диагностика COVID-19 основана на выявлении РНК SARS-CoV-2 с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-ПЦР). В начале пандемии в Новосибирской области тестированию подвергались все пациенты с симптомами ОРВИ, путешественники и лица из групп риска [3], однако бессимптомное течение оставалось скрытым как для пациента, так и для официальной статистики. Одним из способов установить истинное количество перенесших новую коронавирусную инфекцию является выявление антител к SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа (ИФА). К началу 2021 г. особенно актуальным стало измерение уровня специфических антител с целью принятия решения о вакцинации и контроля эффективности вакцин. Вакцинация на тот период еще только началась, и к концу декабря 2020 г. были вакцинированы всего 1280 жителей региона[2].

[1]Yandex DataLens. Коронавирус: дашборд. Доступно по адресу: https://datalens.yandex/7o7is1q6ikh23?tab=X1&state=512ef5d71481

[2]Правительство Новосибирской области. Вакцинация против коронавируса продолжается в Новосибирской области. Доступно по адресу: https://www.nso.ru/news/44654

Первоначально уровень защитных антител измеряли с помощью различных тест-систем от разных производителей и с разным уровнем надежности. Позже для количественных и качественных показателей были введены способы перерасчета в международных единицах BAU (binding antibody units) в соответствии со стандартами ВОЗ (WHO, NIBSC code 20/136). В настоящей работе использовали как качественный тест на антитела, так и количественный, рассчитанный в BAU/мл.

Наличие антител к SARS-CoV-2 само по себе еще не является основанием считать пациента или группу лиц защищенными от повторного заражения [4]. Необходимо убедиться в нейтрализующей способности этих антител и, как следствие, уровне защиты от инфицирования. Кроме того, уровень нейтрализации может оказаться различным для разных вариантов вируса.

Материалы и методы

Характеристика выборки

В исследовании участвовали 259 человек. Исследуемые были набраны случайным образом в ФГБНУ «ФИЦ ФТМ» и в ФГБУН «Институт неорганической химии им. А.В. Николаева» СО РАН. Все участники исследования были старше 18 лет и подписали информированные согласия на участие в проводимом исследовании. Проведение исследования было одобрено Комитетом по биомедицинской этике при ФИЦ ФТМ (протокол № 8 от 11.03.2020). Анкету участника согласились заполнить 77 человек. В анкету вошел вопрос о возрасте и дате выявления в мазках РНК SARS-CoV-2. К моменту начала исследования 63 респондента указали в анкете, что уже перенесли COVID-19 в разное время и 14 респондентов такую информацию не предоставили. К моменту окончания исследования никто из участников не был вакцинирован и не сообщал о повторном заболевании, однако нельзя утверждать, что в группе не было повторных заболеваний с бессимптомным течением, т.к. регулярного ПЦР-тестирования на наличие РНК SARS-CoV-2 не проводилось. Возраст респондентов, сообщивших свои данные, варьировал от 18 лет до 81 года с медианным значением 55 лет. Среди обследованных были 40% мужчин и 60% женщин.

Поскольку не все участники исследования сдавали кровь одинаковое количество раз, а также время от перенесенного COVID-19 до начала исследования отличалось, было сформировано несколько групп:

- группа лиц, которым проводили качественный анализ на антитела к SARS-CoV-2 (259 участника);
- группа лиц, которым проводили количественный анализ на антитела к SARS-CoV-2 (94 участника);
- группы лиц (7 групп), перенесших COVID-19 соответственно за 1, 2, 3, 4, 5, 6 и 7–9 мес до начала исследования (6, 23, 37, 38, 34, 17, 8 участников соответственно);
- группа динамического наблюдения за уровнем антител: перенесшие COVID-19 за 3 мес до начала исследования и сдавшие кровь 1 раз в месяц 4 мес подряд (8 участников);
- группа респондентов, указавших в анкете, что не болели COVID-19 (14 участников);
- группа нейтрализации: лица, у которых сыворотку крови проверяли не только на количество антител, но и на нейтрализующую способность по отношению к SARS-CoV-2 (30 участников).

Анализ сывороточных антител к SARS-CoV-2

Взятие крови осуществляли в условиях процедурного кабинета клиники ФГБНУ «ФИЦ ФТМ» 1 раз в месяц. Качественный анализ содержания антител к SARS-CoV-2 проводили ежемесячно с ноября 2020 г. по ноябрь 2021 г. с использованием наборов реагентов «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ» («Вектор-Бест», Россия). Каждый участник мог сдать кровь один или несколько раз. Всего за указанный период было проанализировано 596 образцов от 259 человек.

Для образцов сывороток, отобранных в январе, феврале, марте и апреле 2021 г. и предварительно охарактеризованных как серопозитивные к SARS-CoV-2 при помощи качественного теста на суммарные антитела, было проведено количественное измерение общего сывороточного IgM и IgG к SARS-CoV-2 методом ИФА с использованием наборов реагентов «SARS-CoV-2-АТ суммарные-ИФА-БЕСТ» («Вектор-Бест», Россия): всего 209 образцов от 94 человек.

Несмотря на появление международного стандарта, разные производители тест-систем указывают разные пороговые значения для определения положительного, отрицательного или сомнительного результата анализа. Так, в работе [5] образцы с уровнем менее 25,6 BAU/мл были отнесены к отрицательным, от 25,7 до 35,1 считались пограничными, с уровнем более 35,2 BAU/мл считались положительными, в то время как в тест-системе «Вектор-Бест» производитель рекомендует руководствоваться следующей градацией.

Градация для тест-системы «Вектор-Бест» (по данным производителя):

- от 0 до 10 BAU/мл – результат отрицательный, антитела отсутствуют;
- 11–79 BAU/мл – вируснейтрализующий эффект низкий (принятие решения о вакцинации);
- 80–149,9 BAU/мл – вируснейтрализующий эффект действует только в 50% случаев (контроль в динамике);
- более 150 BAU/мл – вируснейтрализующая активность ярко выражена в 100% случаев (достаточный уровень для защиты, вакцинация не требуется);
- 500 и выше – выработан максимальный уровень антител (вакцинация не требуется)

В настоящей работе ориентировались на градацию производителя набора «Вектор-Бест».

Получение и характеристики штаммов SARS-CoV-2 для нейтрализации

Были получены (изолированы) 3 разных штамма SARS-CoV-2 для нейтрализации сыворотками реконвалесцентов (**табл. 1**). Выбор вариантов соответство-

Таблица 1. Штаммы SARS-CoV-2, использованные для проверки нейтрализующей способности сывороток
Table 1. SARS-CoV-2 strains used to test the neutralizing ability of sera

Название Name	EPI_ISL_19424272	EPI_ISL_19424271	EPI_ISL_19424270
Клада Clade	B.1.1	B.1.1.397	B.1.617.2.122
Референсный вариант Reference variant	Ухань Wuhan	Ухань Wuhan	Дельта Delta
Циркулировал в СФО Circulated in the Siberian Federal District	С начала пандемии до мая 2021 г. From the beginning of the pandemic until May 2021	Январь 2021 г. – май 2021 г. January 2021 – May 2021	Июнь 2021 г. – январь 2022 г. June 2021 – January 2022
Условное обозначение в статье Conventional designation in the article	Ухань 1 Wuhan 1	Ухань 2 Wuhan 2	Дельта Delta

вал 3 первым волнам пандемии в Новосибирской области. Для данных штаммов SARS-CoV-2 было проведено секвенирование полных геномов и с помощью NextClade установлена их принадлежность к филогенетическим кладам[3]. Секвенирование было выполнено с использованием платформы Illumina MiSeq и соответствующих наборов реагентов (Illumina, США). Предварительно для последующего секвенирования была выполнена обратная транскрипция и амплификация геномов. При подготовке геномных библиотек для секвенирования SARS-CoV-2 использовали сет праймеров ARTIC v3[4]. Сборку полногеномных нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программного обеспечения bowtie. Сиквенсы SARS-CoV-2 депонировали в международную базу данных GISAID с именами (идентификаторами) EPI_ISL_19424270, EPI_ISL_19424271, EPI_ISL_19424272.

В предыдущей работе мы установили, какие варианты SARS-CoV-2 были распространены в Сибирском федеральном округе (СФО) в разные периоды пандемии [6], что позволило определить периоды циркуляции в Новосибирской области вариантов, генетически схожих со штаммами, полученным в настоящей работе (табл. 1).

Поскольку варианты вируса, относящиеся к кладе Дельта, появились в Новосибирской области только летом 2021 г., контактов пациентов с ними на момент сбора сывороток не было.

Нейтрализующая способность сывороток против трех вариантов SARS-CoV-2

Для анализа нейтрализующей способности были выбраны случайным образом 29 пациентов, имеющих антитела к SARS-CoV-2, и один участник, не болевший и не имеющий антител. У всех пациентов анализировали сыворотку, полученную в январе, феврале или марте.

Исследование сывороток крови в реакции нейтрализации (РН) проводили микрометодом в культуре клеток Vero, выращенной на 96-луночных планшетах фирмы TPP (Швейцария). Реакцию нейтрализации ставили с постоянной для каждого штамма дозой препарата – 100 ТЦД$_{50}$/мл. Сыворотки крови пациентов предварительно прогревали на водяной бане при температуре 56 °С в течение 30 мин, затем готовили 8 последовательных двукратных разведений, начиная с сыворотки без разведения. Для разведения сывороток использовали ФСБ (фосфатно-солевой буфер). В работе была приготовлена смесь разведений сыворотки и рабочего разведения вируса в равных объемах. Смесь инкубировали 1 ч при комнатной температуре, затем добавляли в лунки 96-луночного планшета с монослоем культуры клеток Vero и инкубировали в течение 4 сут при температуре 37 °С, 5% CO_2. Результаты титрования учитывали визуально путем микроскопического исследования клеточного монослоя на наличие цитопатического действия (ЦПД) на 4-е сутки после заражения. Титром сыворотки считали обратное значение ее последнего разведения, в котором признаков ЦПД не регистрировали. В РН были поставлены следующие контроли: контроль клеток (КК) – лунки, не инфицированные вирусом; отрицательный контроль сыворотки (К−) – сыворотка в разведении 1/10; контроль вируса (КВ) – лунки, инфицированные вирусом в двукратном разведении; контроль рабочей концентрации вируса – готовили два последовательных 10-кратных разведения рабочей концентрации вируса (кв/10, кв/100). Значения контрольных показателей учитывали следующим образом: КК – неповрежденный клеточный монослой, К−, КВ и кв/10 – полная дегенерация клеточного монослоя, кв/100 – ½ инфицированных лунок имеет признаки ЦПД.

Статистический анализ

Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения Statistica 10.0. Достоверность различий между группами оценивали с использованием критерия χ^2 и *t*-критерия Стьюдента. Доверительные интервалы для относительных вели-

[3]Nextclade. Доступно по адресу: https://clades.nextstrain.org/
[4]hCoV-2019/nCoV-2019 Version 3 Amplicon Set. Доступно по адресу: https://artic.network/resources/ncov/ncov-amplicon-v3.pdf

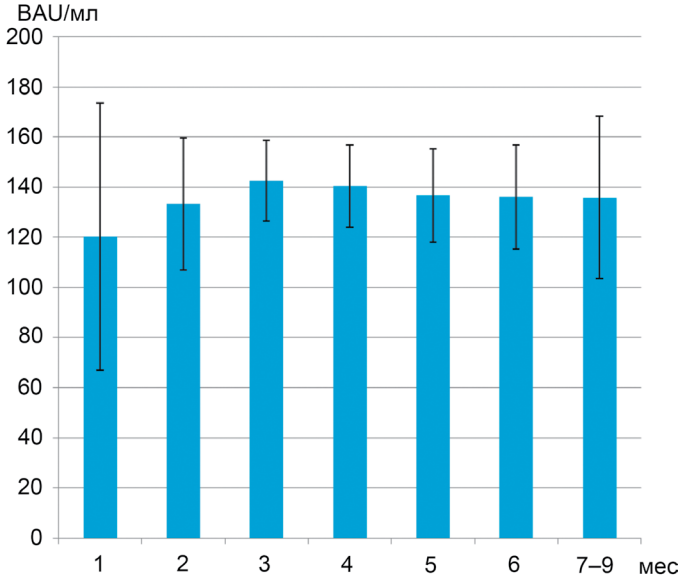

Рис. 1. Динамика количества антител.

Среднее количество суммарных антител через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7–9 мес после перенесенного COVID-19, количественный метод, BAU/мл (*N* = *6*, 23, 37, 38, 34, 17, 8).

Fig. 1. Dynamics of the number of antibodies.

Average number of total antibodies 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7–9 months after COVID-19, quantitative method, BAU/мл (*N* = *6*, 23, 37, 38, 34, 17, 8).

чин рассчитывали при помощи онлайн-калькулятора EPITOOLS[5].

Результаты

Качественный анализ на антитела к SARS-CoV-2

За ноябрь и декабрь 2020 г. было протестировано 69 образцов, из них 32 оказались положительными (33,3%; ДИ 95% 24,7–43,2%). За 10 мес 2021 г. было протестировано 537 образцов сыворотки, из них 434 оказались положительными (80,8%; ДИ 95% 77,3–83,9%). В течение всего периода наблюдения за 259 участниками исследования у 195 были выявлены антитела к SARS-CoV-2 (75,3%; ДИ 95% 69,7–80,2%).

Количественный анализ на антитела к SARS-CoV-2

В течение 4 мес (январь, февраль, март и апрель 2021 г.) для сывороток, предварительно показавших наличие антител при качественном анализе (всего 209 образцов от 94 человек), был проведен количественный анализ антител к SARS-CoV-2. Среди всех исследованных образцов крови минимальное количество суммарных антител к SARS-CoV-2 составляло 14 BAU/мл, максимальное – 190 BAU/мл, среднее – 133,42 ± 7,2 BAU/мл, медиана – 157,5 BAU/мл. Поскольку от момента заболевания до начала исследования для каждого пациента прошло разное количество времени, участников, имеющих сходное время от перенесенного заболевания, объединили в 7 групп: 1, 2 3, 4, 5, 6, 7–9 мес от заболевания. Число пациентов в каждой группе составляло: 6, 23, 37, 38, 34, 17, 8 человек соответственно (**рис. 1**).

Количество антител не зависело от пола и возраста пациентов, а также от времени, прошедшего после перенесенного COVID-19 (рис. 1). Разброс значений в 1-й группе оказался достаточно большим, а число участников – малым, получить уровень достоверности отличий этой группы от остальных не представлялось возможным. В среднем уровень антител сохранялся не менее 6 мес.

Не болевшие COVID-19 участники исследования

В группу контроля должны были войти не болевшие COVID-19 участники исследования. При измерении уровня антител в этой группе выяснилось, что только один человек из 14, отметивших, что не болели COVID-19, на самом деле не имел антител к SARS-CoV-2. Остальные имели положительный результат как при качественном, так и при количественном анализе, если руководствоваться таблицей производителя тест-системы (более 11 BAU/мл). Возможно, эти лица перенесли заболевание бессимптомно. Интересно, что, несмотря на бессимптомное течение, мы не можем утверждать, что у этой когорты иммунный ответ был менее выраженным, чем у переболевших с симптомами. Разброс уровня антител в этой группе был достаточно большим (**рис. 2**). Некоторые участники этой группы сдавали кровь несколько раз, что позволило рассчитать среднее количество антител за 4 мес наблюдения. Для остальных показан результат одного измерения.

Динамическое наблюдение за уровнем антител в течение 4 мес

Отследить динамику уровня антител за 4 мес удалось у 8 участников. Для корректного сравнения динамику наблюдали у самой многочисленной группы – переболевших за 3 мес до начала исследования и сдававших кровь каждый месяц на протяжении 4 мес. В этой группе наблюдалось три сценария: постепенное падение уровня антител, нарастание уровня антител и волнообразное поведение уровня антител. Разница между минимальным и максимальным уровнями антител в среднем достигала 28 ± 7,7 BOE/мл (**рис. 3**). Различие сценариев объясняется различной ситуацией, в которой могли находиться участники исследования. Так, падение уровня антител – естественный процесс, хотя и не слишком заметный на таком коротком промежутке времени. При повторном инфицировании происходит подъем количества антител, даже при бессимптомном протекании инфекции.

Анализ динамики уровня антител для участников, которым проводили забор крови не менее 2 раз, выявил закономерность: уровень антител у одного человека хотя и мог колебаться, но оставался относительно стабильным (стандартное отклонение 16,6 ± 3,5) на протяжении исследования. По-видимому, уровень антител является для каждого человека индивидуальным и меняется в небольших пределах при отсутствии дополнительного влияния (вакцинация, заболевание).

[5]Epitools – Calculate confidence limits for a sample proportion. Доступно по адресу: https://epitools.ausvet.com.au/ciproportion

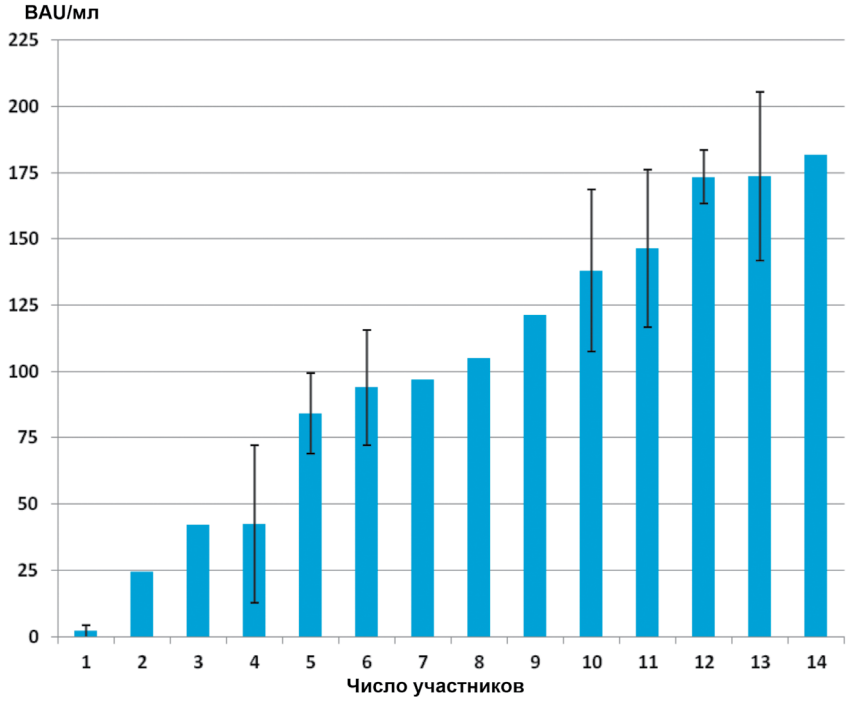

Рис. 2. Уровень суммарный IgM и IgG к SARS-CoV-2 у 14 участников исследования, не болевших COVID-19 (по данным анкетирования), BAU/мл.

При возможности (более 3 измерений уровня антител) были рассчитаны средние значения и погрешности измерений. Участник № 1 имел отрицательный результат, у остальных участников исследования – положительный результат.

Fig. 2. The level of total IgM and IgG antibodies to SARS-CoV-2 in 14 study participants who did not have COVID-19 (according to the questionnaire), BAU/mL.

Mean values and measurement errors were calculated when possible (more than three antibody concentration measurements). Participant No. 1 had a negative result, the rest of the study participants had a positive result.

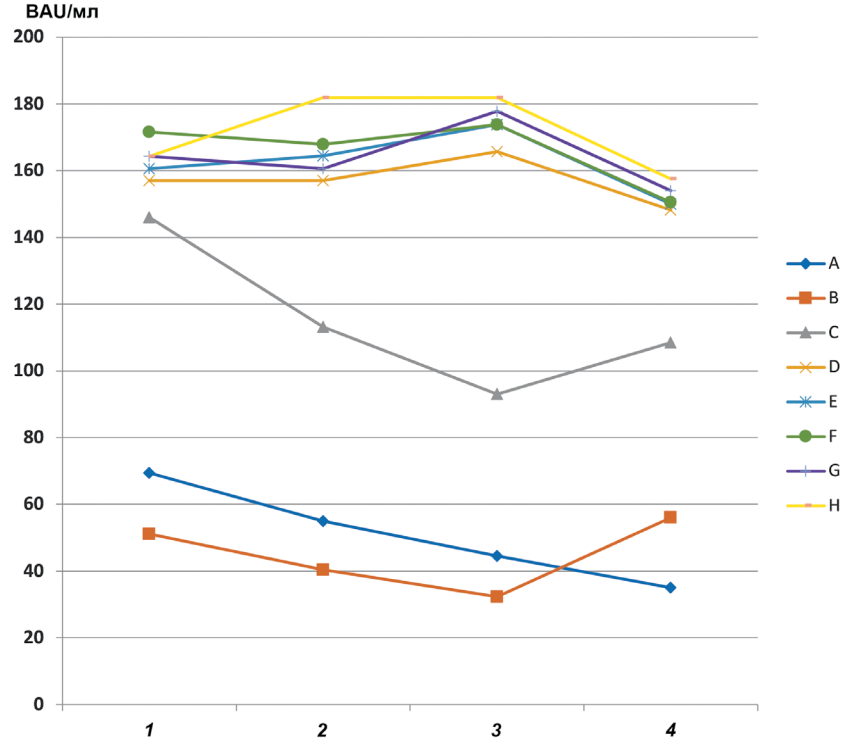

Рис. 3. Изменение количества антител в течение 4 мес.

Динамическое наблюдение за уровнем антител в течение 4 мес в группе лиц, переболевших COVID-19 за 3 мес до начала исследования, BAU/мл.

Fig. 3. Change in the concentration of antibodies over 4 months.

Dynamic changes in antibody levels within 4 months in the group that had COVID-19 3 months before the start of the study, BAU/mL.

Нейтрализующая активность антител

Для нейтрализации были выбраны 3 штамма вируса и протестированы на сыворотках крови, отобранных в январе, феврале и марте 2021 г. При сопоставлении времени циркуляции на территории СФО [6] и времени отбора сывороток крови выяснилось, что образцы, отобранные в начале 2021 г., были получены от лиц, которые могли иметь контакт с первыми двумя вариантами вируса, но не с третьим.

Все 30 сывороток крови были протестированы против 3 штаммов SARS-CoV-2. Для участника, не имевшего антител к SARS-CoV-2, нейтрализующей способности у сыворотки также не обнаружили ни для одного штамма (**табл. 2**).

Против штамма EPI_ISL_19424272 (Ухань 1) не показала нейтрализацию одна сыворотка из 29 серопозитивных, против EPI_ISL_19424271 (Ухань 2) – 3 сыворотки, против EPI_ISL_19424270 (Дельта) – ½ сывороток не показала нейтрализа-

Таблица 2. Нейтрализующая способность сывороток и количество антител к SARS-CoV-2 у 30 участников исследования
Table 2. Neutralizing ability of sera and the concentration of antibodies to SARS-CoV-2 in 30 study participants

№	Месяцев от болезни Months from illness	Возраст Age	Январь January 2021	Февраль February 2021	Март March 2021	Апрель April 2021	Ухань 1 Wuhan 1	Ухань 2 Wuhan 2	Дельта Delta
1	0	37	164,3	164,3	185,9	157,5	1 : 32	1 : 16	1 : 16
2	1	49	160,6	181,9	181,9	161	1 : 2	1 : 64	0
3	1	58	–	–	185,9	157,5	1 : 4	1 : 16	1 : 2
4	2	29	25,6	18,3	–	21	1 : 8	1 : 4	1 : 8
5	2	41	171,6	167,9	190	164,5	1 : 4	1 : 32	0
6	2	25	–	24,3	24,25	–	1 : 4	1 : 8	0
7	2	80	167,9	185,9	190	161	1 : 64	1 : 32	0
8	2	47	43,8	36	32,3	21	1 : 4	1 : 4	1 : 2
9	2	68	–	181,9	177,8	154	1 : 8	1 : 32	0
10	2	54	25,6	–	20,2	21	1 : 4	1 : 8	0
11	2	64	171,6	185,9	185,9	157,5	1 : 128	1 : 128	1 : 64
12	3	64	175,2	185,9	185,9	–	1 : 64	1 : 128	1 : 64
13	3	57	146	137,4	137,4	125	1 : 32	1 : 8	1 : 4
14	3	67	157	157	165,7	148,2	1 : 64	1 : 8	0
15	3	32	105,9	93	93	–	1 : 32	0	0
16	3	49	69,4	55	44,5	35	1 : 32	1 : 8	0
17	3	35	157	157	170	–	1 : 32	1 : 8	1 : 4
18	3	64	146	113,2	93	108,5	1 : 8	1 : 16	0
19	3	78	164,3	165,7	157,6	154	1 : 32	1 : 1,1	0
20	3	71	171,6	167,9	173,8	150,5	1 : 16	1 : 32	0
21	3	50	–	–	84,9	–	1 : 16	1 : 8	1 : 8
22	3	59	–	167,9	181,9	157,5	–	1 : 32	0
23	3	63	167,9	173,8	157,6	–	1 : 8	1 : 16	1 : 4
24	3	62	171,6	181,9	190	–	1 : 64	1 : 128	1 : 64
25	3	66	164,3	160,6	177,8	154	1 : 16	1 : 32	1 : 16
26	3	65	167,9	160,6	–	157,5	1 : 32	0	1 : 16
27	3	66	160,6	164,4	173,8	150,5	1 : 8	1 : 32	0
28	Не болел Hadn't COVID-19	36	0,0	4,0	4,0	0,0	0	0	0
29	Нет данных No data	57	–	–	121,25	–	1 : 2	1 : 2	0
30	Нет данных No data	31	105,9	84,9	72,8	73,5	1 : 16	1 : 4	1 : 8

Примечание. «–» – отсутствуют данные; «0» – отсутствует нейтрализация.

Note. «–» – no data; «0» – no neutralization.

цию. Для остальных был рассчитан среднегеометрический титр (**рис. 4**).

Как мы видим, нейтрализующая способность сывороток реконвалесцентов имеет наибольшую активность в отношении тех вариантов вируса, которыми переболел пациент, в то время как против нового варианта она оказывается сниженной или отсутствует вовсе. Также выяснилось, что уровень нейтрализации не зависит от количества антител и от того, переболел человек с симптомами или без. Группа пациентов, сыворотки которых не показали нейтрализацию, не отличалась от остальных участников исследования. Количество антител к SARS-CoV-2, тяжесть течения болезни и время, прошедшее после болезни, не влияли на уровень нейтрализации. Таким образом, количество антител не может служить надежным критерием защищенности человека от заболевания, т.к. эти антитела могли быть выработаны против более раннего варианта вируса.

Обсуждение

Механизмы развития иммунной реакции на SARS-CoV-2 еще до конца не изучены. Неясно, формируется или нет у переболевших стойкий иммунитет. Принятие решение о вакцинации должно основываться

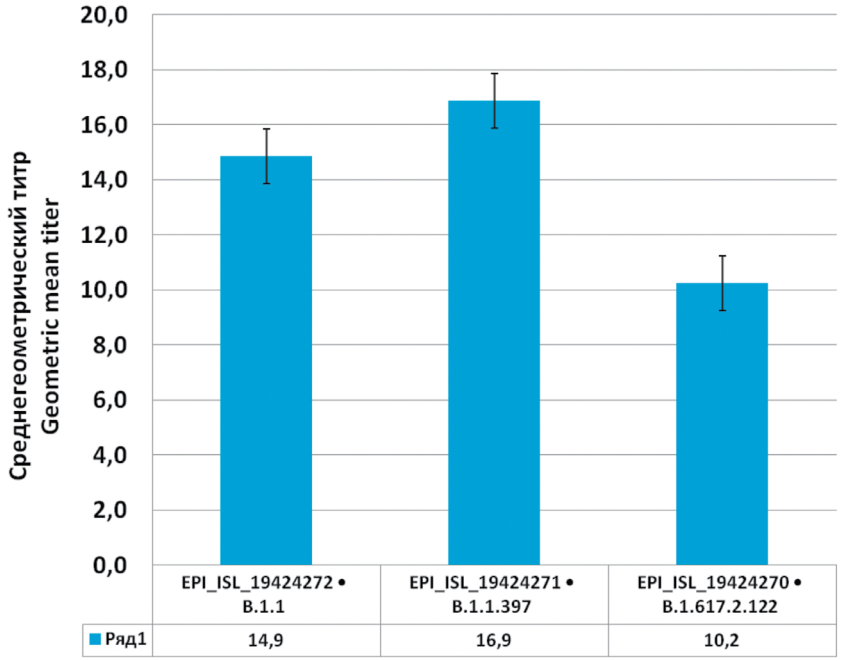

Рис. 4. Нейтрализующая способность сывороток реконвалесцентов против 3 штаммов SARS-CoV-2: EPI_ISL_19424272 (Ухань 1), EPI_ISL_19424271 (Ухань 2) и EPI_ISL_19424270 (Дельта).

Fig. 4. Neutralizing ability of convalescent serum against three strains of SARS-CoV-2: EPI_ISL_19424272 (Wuhan 1), EPI_ISL_19424271 (Wuhan 2) и EPI_ISL_19424270 (Delta).

не только на данных об эпидемиологической ситуации, но и на состоянии иммунитета прививающегося [7]. В настоящей работе изучали антительный компонент гуморального иммунитета реконвалесцентов. Полученные результаты согласуются с данными работы [5], где средний уровень антител составил 129,67 BAU/мл на 3-м месяце после инфицирования SARS-CoV-2. Мы также рассмотрели динамику изменения количества антител в течение 4 мес после перенесенного 3 мес назад COVID-19 и обнаружили, что хотя уровень антител значительно различается между пациентами, изменения для каждого пациента варьируются не так сильно. У большого числа пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, симптомы отсутствовали [1, 8], что не позволяет достаточно полно оценить заболеваемость и возможности распространения этой инфекции. Мы не обнаружили корреляции между бессимптомным течением заболевания и уровнем антител. Работы по нейтрализующей способности сывороток достаточно редки, т.к. необходимо использовать живой вирус. В основном в исследованиях представлены данные по формированию поствакцинального иммунитета [9]. В нашем случае все участники исследования не были вакцинированы, а варианты вируса были подобраны так, чтобы была возможность сравнить нейтрализацию циркулировавшего на момент сбора сывороток варианта и варианта Дельта, с которым участники исследования не встречались. Поскольку корреляции между количеством антител и титром нейтрализации обнаружено не было, не представляется возможным говорить о защитном гуморальном иммунитете, опираясь только на данные о количестве антител.

Заключение

При постоянно видоизменяющихся вариантах вируса SARS-CoV-2, информации о количестве заболевших и об уровне антител у пациента может оказаться недостаточно для принятия решения о вакцинации, т.к. новые варианты вируса могут эффективно избегать выработанного ранее иммунитета. Кроме того, иммунитет, выработанный против ранних вакцинных штаммов, может оказаться недостаточным для защиты от последующих вариантов SARS-CoV-2, как это уже происходит с вирусом гриппа.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балахонов С.В., Дубровина В.И., Чеснокова М.В., Войткова В.В., Пятидесятникова А.Б., Брюхова Д.Д. и др. Изучение гуморального иммунного ответа при лёгкой и бессимптомной формах проявления COVID-19. *Acta Biomedica Scientifica*. 2020; 5(5): 26–30. https://doi.org/10.29413/ABS.2020-5.5.3 https://elibrary.ru/mvlnmh
2. Machhi J., Herskovitz J., Senan A.M., Dutta D., Nath B., Oleynikov M.D., et al. The natural history, pathobiology, and clinical manifestations of SARS-CoV-2 infections. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2020; 15(3): 359–86. https://doi.org/10.1007/s11481-020-09944-5
3. Palyanova N., Sobolev I., Alekseev A., Glushenko A., Kazachkova E., Markhaev A., et al. Genomic and epidemiological features of COVID-19 in the Novosibirsk region during the beginning of the pandemic. *Viruses*. 2022; 14(9): 2036. https://doi.org/10.3390/v14092036
4. Новикова Е.А., Петрова А.Г., Москалева Е.В., Ваняркина А.С., Рычкова Л.В. Ретроспектива международных серологических исследований по формированию и динамике гуморального иммунного ответа к SARS-CoV-2: от 2020 к 2021. *Acta Biomedica Scientifica.* 2021; 6(2): 47–57. https://doi.org/10.29413/ABS.2021-6.2.5 https://elibrary.ru/sbnnav
5. Oktay Gültekin E., Gültekin O., Coskun A., Aksak T. Antibody response three months after SARS-CoV-2 infection. *J. Med. Virol.* 2022; 94(10): 4712–8. https://doi.org/10.1002/jmv.27909
6. Palyanova N.V., Sobolev I.A., Palyanov A.Y., Kurskaya O.G., Komissarov A.B., Danilenko D.M. et al. The development of the SARS-CoV-2 epidemic in different regions of Siberia in the 2020–2022 Period. *Viruses*. 2023; 15(10): 2014. https://doi.org/10.3390/v15102014
7. Tukhvatulin A.I., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyrshina A.V., et al. An open, non-randomised, phase 1/2 trial on the safety, tolerability, and immunogenicity of single-dose vaccine “Sputnik Light” for prevention of coronavirus infection in healthy adults. *Lancet Reg. Health Eur.* 2021; 11: 100241. https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2021.100241

8. Евсеева Г.П., Лазарева М.А., Власова М.А., Наговицына Е.Б., Супрун С.В., Телепнёва Р.С. и др. Оценка уровня иммунной прослойки к SARS-CoV-2 у детей в условиях новой коронавирусной инфекции COVID-19. *Бюллетень физиологии и патологии дыхания.* 2023; (88): 59–68. https://doi.org/10.36604/1998-5029-2023-88-59-68 https://elibrary.ru/lhyxot
9. Wang K., Long Q.X., Deng H.J., Hu J., Gao Q.Z., Zhang G.J., et al. Longitudinal dynamics of the neutralizing antibody response to SARS-CoV-2 infection. *Clin. Infect. Dis.* 2021; 73(3): e531–9. https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1143

REFERENCES

1. Balakhonov S.V., Dubrovina V.I., Chesnokova M.V., Voitkova V.V., Pyatidesyatnikova A.B., Bryukhova D.D., et al. Studying humoral immune response at mild and asymptomatic COVID-19 forms. *Acta Biomedica Scientifica.* 2020; 5(5): 26–30. https://doi.org/10.29413/ABS.2020-5.5.3 https://elibrary.ru/mvlnmh (in Russian)
2. Machhi J., Herskovitz J., Senan A.M., Dutta D., Nath B., Oleynikov M.D., et al. The natural history, pathobiology, and clinical manifestations of SARS-CoV-2 infections. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2020; 15(3): 359–86. https://doi.org/10.1007/s11481-020-09944-5
3. Palyanova N., Sobolev I., Alekseev A., Glushenko A., Kazachkova E., Markhaev A., et al. Genomic and epidemiological features of COVID-19 in the Novosibirsk region during the beginning of the pandemic. *Viruses*. 2022; 14(9): 2036. https://doi.org/10.3390/v14092036
4. Novikova E.A., Petrova A.G., Moskaleva E.V., Vanyarkina A.S., Rychkova L.V. Retrospective of international serological studies on the formation and dynamics of the humoral immune response to SARS-CoV-2: from 2020 to 2021. *Acta Biomedica Scientifica.* 2021; 6(2): 47–57. https://doi.org/10.29413/ABS.2021-6.2.5 https://elibrary.ru/sbnnav (in Russian)
5. Oktay Gültekin E., Gültekin O., Coskun A., Aksak T. Antibody response three months after SARS-CoV-2 infection. *J. Med. Virol.* 2022; 94(10): 4712–8. https://doi.org/10.1002/jmv.27909
6. Palyanova N.V., Sobolev I.A., Palyanov A.Y., Kurskaya O.G., Komissarov A.B., Danilenko D.M. et al. The development of the SARS-CoV-2 epidemic in different regions of Siberia in the 2020–2022 Period. *Viruses*. 2023; 15(10): 2014. https://doi.org/10.3390/v15102014
7. Tukhvatulin A.I., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyrshina A.V., et al. An open, non-randomised, phase 1/2 trial on the safety, tolerability, and immunogenicity of single-dose vaccine "Sputnik Light" for prevention of coronavirus infection in healthy adults. *Lancet Reg. Health Eur.* 2021; 11: 100241. https://doi.org/10.1016/j.lanepe.2021.100241
8. Evseeva G.P., Lazareva M.A., Vlasova M.A., Nagovitsyna E.B., Suprun S.V., Telepneva R.S. et al. Assessment of the level of immune layer to SARS-CoV-2 in children under conditions of novel coronavirus infection COVID-19. *Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya*. 2023; (88): 59–68. https://doi.org/10.36604/1998-5029-2023-88-59-68 https://elibrary.ru/lhyxot (in Russian)
9. Wang K., Long Q.X., Deng H.J., Hu J., Gao Q.Z., Zhang G.J., et al. Longitudinal dynamics of the neutralizing antibody response to SARS-CoV-2 infection. *Clin. Infect. Dis.* 2021; 73(3): e531–9. https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1143

Информация об авторах:

Пальянова Наталья Валерьевна✉ – младший научный сотрудник НИИ Вирусологии ФГБНУ «ФИЦ ФТМ», Новосибирск, Россия. E-mail: natalia.palyanova@gmail.com; https://orcid.org/0000-0002-1783-5798

Адаменко Любовь Сергеевна – младший научный сотрудник НИИ Вирусологии ФГБНУ «ФИЦ ФТМ», Новосибирск, Россия. E-mail: aminisib@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0001-6412-3622

Курская Ольга Григорьевна – канд. мед. наук, руководитель лаборатории респираторных вирусных инфекций, старший научный сотрудник НИИ Вирусологии ФГБНУ «ФИЦ ФТМ», Новосибирск, Россия. E-mail: kurskaya_og@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-1931-2026

Сароян Тереза Араевна – младший научный сотрудник НИИ Вирусологии ФГБНУ «ФИЦ ФТМ», Новосибирск, Россия. E-mail: 111.st.13@rambler.ru; https://orcid.org/0000-0001-8071-5425

Соломатина Мария Владимировна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник НИИ Вирусологии ФГБНУ «ФИЦ ФТМ», Новосибирск, Россия. E-mail: solomatina.mariyav@yandex.com; https://orcid.org/0000-0003-0736-0271

Соболев Иван Андреевич – канд. биол. наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией геномики и эволюции вирусов НИИ Вирусологии ФГБНУ «ФИЦ ФТМ», Новосибирск, Россия. E-mail: sobolev.riov@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-4561-6517

Шестопалов Александр Михайлович – д-р биол. наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, директор НИИ Вирусологии ФГБНУ «ФИЦ ФТМ», Новосибирск, Россия. E-mail: shestopalov2@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-9734-0620

Участие авторов: Пальянова Н.В. – написание текста, анализ данных, проведение экспериментов; Адаменко Л.С. – сбор данных и проведение экспериментов; Курская О.Г. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов; Сароян Т.А. – проведение экспериментов; Соломатина М.В. – проведение экспериментов; Соболев И.А. – анализ данных; Шестопалов А.М. – концепция и дизайн исследования.

Поступила 06.01.2025
Принята в печать 24.02.2025
Опубликована 28.02.2025

Information about the authors:

Natalia V. Palyanova✉ – junior researcher in Research Institute of Virology FRC FTM, Novosibirsk, Russia. E-mail: natalia.palyanova@gmail.com; https://orcid.org/0000-0002-1783-5798

Lubov S. Adamenko – junior researcher in Research Institute of Virology FRC FTM, Novosibirsk, Russia. E-mail: aminisib@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0001-6412-3622

Olga G. Kurskaya – Ph.D., Head of the Laboratory of Respiratory Viral Infections, Senior Researcher in Research Instityte of Virology FRC FTM, Novosibirsk, Russia. E-mail: kurskaya_og@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-1931-2026

Tereza A. Saroyan – junior researcher in Research Institute of Virology FRC FTM, Novosibirsk, Russia. E-mail: 111.st.13@rambler.ru; https://orcid.org/0000-0001-8071-5425

Mariya V. Solomatina – Ph.D., senior researcher in Research Institute of Virology FRC FTM, Novosibirsk, Russia. E-mail: solomatina.mariyav@yandex.com; https://orcid.org/0000-0003-0736-0271

Ivan A. Sobolev – Ph.D., Senior Researcher, Head of the Laboratory of Genomics and Virus Evolution in Research Institute of Virology FRC FTM, Novosibirsk, Russia. E-mail: sobolev.riov@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0002-4561-6517

Alexander M. Shestopalov – Ph.D., professor, Dr. of Sc., Honored Scientist of the Russian Federation, Director Research Institute of Virology FRC FTM, Novosibirsk, Russia. E-mail: shestopalov2@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-9734-0620

Contribution: Palyanova N.V. – writing text, analyzing data, conducting experiments; Adamenko L.S. – collecting data and conducting experiments; Kurskaya O.G. – concept and design of the study, conducting experiments; Saroyan T.A. – conducting experiments; Solomatina M.V. – conducting experiments; Sobolev I.A. – data analysis; Shestopalov A.M. – concept and design of the study.

Received 06 January 2025
Accepted 24 February 2025
Published 28 February 2025

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-292
© СЕМИЖОН П.А., СЧЕСЛЕНОК Е.П., ДУБКОВ Н.А., СУХОЦКАЯ Е.А., СТОЛБУНОВА К.А., ПОПОВ ИГ.В., ПОПОВ ИЛ.В., АЛЕКСЕЕВ А.Ю., КАБВЕ Э., ДАВИДЮК Ю.Н., 2025

Идентификация ортохантавирусов, впервые выявленных на территории Республики Беларусь

Семижон П.А.[1]✉, Счесленок Е.П.[1], Дубков Н.А.[1], Сухоцкая Е.А.[1], Столбунова К.А.[2], Попов Иг.В.[3], Попов Ил.В.[3], Алексеев А.Ю.[2], Кабве Э.[4], Давидюк Ю.Н.[4]

[1]ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» Министерства здравоохранения Республики Беларусь, 220099, г. Минск, Республика Беларусь;
[2]НИИ вирусологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», 630060, г. Новосибирск, Россия;
[3]ФГБОУ ВО «Донской государственный технический университет», 344003, г. Ростов-на-Дону, Россия;
[4]Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», 420008, г. Казань, Россия

Резюме
Актуальность. Мониторинг возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС) на территории Республики Беларусь является необходимым и актуальным, поскольку количество случаев ГЛПС у населения за последние годы увеличилось, а генетические характеристики возбудителей отсутствуют.
Цель исследования. Выявление ортохантавирусов, циркулирующих на территории Республики Беларусь, и определение их генетических характеристик.
Материалы и методы. Проведен скрининг зооматериала в объеме 613 образцов от мелких млекопитающих, отловленных на территории Республики Беларусь. Использовали метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с тест-системой «Белар-ГЛПС-ПЦР/РВ». Положительные образцы секвенировали методом Сэнгера. Сравнительный и филогенетический анализ проводили с использованием программ MegAlign из пакета Lasergene (DNASTAR, США) и MEGA 11.
Результаты. При первичном скрининге было обнаружено 32 ПЦР-положительных образца (5,2%), из которых 24 образца относились к вирусу Пуумала (PUUV) и 8 образцов – к вирусу Добрава-Белград (DOBV). Были секвенированы 3 нуклеотидные последовательности участка M-сегмента PUUV, 2 последовательности участка M-сегмента длиной 291 пара нуклеотидов (п.н.) и одна последовательность участка S-сегмента длиной 348 п.н. DOBV. Сравнительный анализ и филогения показали, что выявленные геноизоляты PUUV принадлежат к русской генетической линии, к той же сублинии, что и штаммы, распространенные в Московской и Курской областях. Выявленные геноизоляты DOBV продемонстрировали наиболее близкое родство к штаммам из центрального региона европейской части России.
Заключение. Результаты молекулярно-биологического анализа показали, что PUUV циркулирует на территории Республики Беларусь и распространен повсеместно. В то же время DOBV выявлен на территории четырех областей республики, что свидетельствует о расширении ареала данного возбудителя ГЛПС. В Республике Беларусь впервые получены нуклеотидные последовательности ортохантавирусов и проведен их молекулярно-генетический анализ.

Ключевые слова: *мониторинг; ортохантавирусы; ГЛПС; Пуумала; PUUV; Добрава-Белград; DOBV; грызуны; ПЦР; филогенетический анализ; Республика Беларусь*

Для цитирования: Семижон П.А., Счесленок Е.П., Дубков Н.А., Сухоцкая Е.А., Столбунова К.А., Попов Иг.В., Попов Ил.В., Алексеев А.Ю., Кабве Э., Давидюк Ю.Н. Идентификация ортохантавирусов, впервые выявленных на территории Республики Беларусь. *Вопросы вирусологии*. 2025; 70(1): 87–98. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-292 EDN: https://elibrary.ru/rzopww

Источник финансирования. Исследования проведены с использованием финансирования по Государственному заданию Республики Беларусь 02.25 «Разработать набор реагентов для идентификации антигенов возбудителей геморрагической лихорадки с почечным синдромом, циркулирующих на территории Республики Беларусь», подпрограмма «Геномные технологии и инфекционная безопасность», ГНТП «Научно-техническое обеспечение качества и доступности медицинских услуг», 2021–2025 гг. (рег. № НИР 20241066), а также государственного задания РФ № FGMU-2025-0009.
Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.
Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus author guidelines for animal use» (IAVES 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины» (Протокол № 31 от 10.12.2015).

ORIGINAL STUDY ARTICLE
DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-292

Identification of orthohantaviruses detected for the first time in the Republic of Belarus

Pavel A. Semizhon[1]✉, Elena P. Scheslenok[1], Nikita A. Dubkov[1], Elizaveta A. Sukhotskaya[1], Kristina A. Stolbunova[2], Igor V. Popov[3], Ilia V. Popov[3], Alexander Yu. Alekseev[2], Emmanuel Kabwe[4], Yuriy N. Davidyuk[4]

[1]Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health of the Ministry of Health of the Republic of Belarus, 220099, Minsk, Republic of Belarus;
[2]Research Institute of Virology, Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, 630060, Novosibirsk, Russia;
[3]Don State Technical University, 344003, Rostov-on-Don, Russia;
[4]Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, 420008, Kazan, Russia

Abstract
Introduction. Monitoring of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) pathogens in the Republic of Belarus is necessary and relevant, since the number of HFRS cases in the population has increased in recent years, and genetic characteristics of the pathogens remain unidentified.
Aim of the study. Identification of orthohantaviruses circulating in the territory of the Republic of Belarus and defining of their genetic characteristics.
Materials and methods. Screening of 613 samples from small mammals caught in the territory of the Republic of Belarus was carried out by the real time PCR method using the test system «Belar-GLPS-PCR/RV». Positive samples were sequenced by the Sanger method. Comparative and phylogenetic analysis was carried out using the MegAlign programs from the Lasergene package (DNASTAR, USA) and MEGA 11.
Results. The primary screening yielded 32 PCR-positive samples (5.2%), of which 24 belonged to Puumala virus (PUUV) and 8 to Dobrava-Belgrade virus (DOBV). Three nucleotide sequences of the M-segment region of PUUV, two sequences of the 291-base pair (bp) M-segment region and one sequence of the 348-bp S-segment region of DOBV were sequenced. Comparative and phylogenetic analysis showed that the identified PUUV sequences belong to the Russian genetic lineage, to the same sublineage as the strains common in the Moscow and Kursk regions. The identified DOBV ssequences demonstrated the closest relationship to the strains from the central region of the European part of Russia.
Conclusion. The results of molecular biological analysis showed that PUUV circulates in the territory of the Republic of Belarus and is widespread. At the same time, DOBV was detected in four regions of the republic, which indicates an expansion of the range of this HFRS pathogen. In the Republic of Belarus, nucleotide sequences of orthohantaviruses were obtained for the first time and their molecular genetic analysis was carried out.

Keywords: *monitoring; orthohantaviruses; HFRS; Puumala; PUUV; Dobrava-Belgrade; DOBV; rodents; PCR; phylogenetic analysis; Republic of Belarus*

For citation: Semizhon P.A., Scheslenok E.P., Dubkov N.A., Sukhotskaya E.A., Stolbunova K.A., Popov Ig.V., Popov Il.V., Alekseev A.Yu., Kabwe E., Davidyuk Yu.N. Identification of orthohantaviruses detected for the first time in the Republic of Belarus. *Problems of Virology* (*Voprosy Virusologii*). 2025; 70(1):87–98. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-292 EDN: https://elibrary.ru/rzopww

Funding. The studies were conducted using funding from the State Assignment of the Republic of Belarus 02.25 «Develop a set of reagents for the identification of antigens of pathogens causing hemorrhagic fever with renal syndrome circulating in the Republic of Belarus», subprogram «Genomic technologies and infection safety», State Scientific and Technical Program «Scientific and technical support for the quality and availability of medical services», 2021–2025 (Reg. No. R&D 20241066), as well as State Assignment of the Russian Federation No. FGMU-2025-0009.
Conflict of interest. The authors declare no apparent and potential conflicts of interest related to the publication of this article.
Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus author guidelines for animal use» (IAVES 23 July 2010). The research protocol was approved by the Biomedical Ethics Committee of the Federal State Budgetary Scientific Institution "Research Institute of Experimental and Clinical Medicine" (Protocol No. 31 dated 10 December 2015).

Введение

Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) – острая вирусная природно-очаговая зоонозная инфекция человека, характеризующаяся интоксикацией, лихорадкой, почечными и геморрагическими проявлениями [1]. ГЛПС занимает ведущее место в мире по числу регистрируемых случаев среди природно-очаговых инфекций. Возбудители ГЛПС относятся к отряду *Bunyavirales*, семейству *Hantaviridae* и принадлежат к роду *Orthohantavirus*. Наиболее значимыми, вызывающими у людей заболевания разной степени тяжести, являются 5 видов вирусов рода *Orthohantavirus* Старого Света – это вирусы Хантаан/HNTV (*Orthohantavirus hantanense*);

Добрава-Белград/DOBV (*Orthohantavirus dobravaense*); Сеул/SEOV (*Orthohantavirus seoulense*); Пуумала/PUUV (*Orthohantavirus puumalaense*) и Тула/TULV (*Orthohantavirus tulaense*) [2–5]. HNTV и SEOV наиболее характерны для азиатских стран, таких как Китай и Корея. DOBV и PUUV циркулируют в Скандинавских странах, на западе России, в Балканском регионе, а также в некоторых странах Центральной и Восточной Европы, включая Республику Беларусь (РБ). TULV долгое время считался непатогенным для человека, но в Европейской части России с 2015 г. фиксируются случаи ГЛПС, вызванные именно этим вирусом [5]. В 2015 г. во Франции и в 2019 г. в Германии были выявлены нуклеотидные последовательности (НП) TULV в сыворотке крови человека (номера в GenBank: KU297981 и MT993951).

К настоящему времени у людей выделяют две основные клинические формы хантавирусной инфекции: ГЛПС (возбудители HNTV; DOBV; SEOV; PUUV) и хантавирусный пульмональный синдром (возбудители – ортохантавирусы Нового Света Sin-Nombre; Black Creek; New York; Bayou; Andes; Laguna Negra).

В Европе DOBV является наиболее опасным для человека: он вызывает ГЛПС с летальностью до 12% [6, 7]. В соответствии с географическими ареалами его естественных хозяев, мышей рода *Apodemus*, DOBV образует ряд генетических линий [8]. Линия DOBV-Af, представленная исходным изолятом DOBV из Словении (Slo/Af), связанная с *A. flavicollis* (Af), ассоциирована с тяжелыми случаями ГЛПС в Балканском регионе. У *A. agrarius* (Aa) были обнаружены две линии хантавируса: линия DOBV-Aa, представленная изолятами клеточной культуры SK/Aa из Словакии, и линия Lipetsk/Aa из России, типичная для Центральной Европы и центрально-европейской части России [3, 9], где она ассоциирована с ГЛПС легкой/умеренной тяжести. Для DOBV-подобного вируса Сааремаа (SAAV), представленного изолятом клеточной культуры Saa/160V из Эстонии, Северо-Восточной Европы [10], до сих пор окончательно не выявлена связь с клиническими случаями заболевания. Случаи ГЛПС средней и тяжелой степени течения заболевания на территории Краснодарского края РФ были связаны с линией DOBV-Ap, представленной штаммом Sochi/Ap. Резервуаром этого штамма являлась кавказская лесная мышь *A. ponticus* (Ap) [11].

У PUUV в настоящее время различают 8 линий: центрально-европейскую (CE), датскую (DAN), южно-скандинавскую (S-SCA), северо-скандинавскую (N-SCA), финскую (FIN), латвийскую (LAT), альпийско-адриатическую (ALAD) и русскую (RUS) [4]. В Российской Федерации идентифицированы две генетические линии PUUV: RUS – на большинстве территорий европейской части России (ЕЧР), и FIN – на севере ЕЧР и в западной Сибири [12].

Возбудитель ГЛПС является оболочечным вирусом с геномом, представленным одноцепочечной «–»РНК, состоящей из 3 сегментов: малого (S), среднего (M) и большого (L). Каждый геномный сегмент имеет единственную открытую рамку считывания (ORF) и кодирует нуклеокапсидный белок (N-белок), предшественника гликопротеинов мембраны Gn и Gc и РНК-зависимую РНК-полимеразу соответственно [13].

Резервуаром вирусов семейства *Hantaviridae* в природной среде служат мышевидные грызуны, насекомоядные и представители отряда рукокрылых [14–16]. Природные очаги ГЛПС расположены чаще всего в определенных ландшафтно-географических зонах, таких как пойменные леса, овраги, луга, которые в значительной степени представлены на территории РБ. В РБ доминирующим видом грызунов – резервуаров хантавирусов является рыжая полевка [17]. Грызуны переносят инфицирование в виде латентного вирусоносительства. Возбудитель выделяется во внешнюю среду с калом, мочой, слюной. Передача возбудителя между грызунами осуществляется в основном воздушным или воздушно-пылевым путем [1].

Заболеваемость ГЛПС характеризуется выраженной сезонностью: с апреля по декабрь. По многолетним данным, в РБ пик заболеваемости приходится на сентябрь–ноябрь. С января по март заболеваемость прекращает фиксироваться, что связано с сокращением численности мышевидных грызунов в зимнее время. Помимо сезонных, существуют еще и годовые колебания заболеваемости, которые составляют 3–4 года. По данным ведомственной отчетности, по состоянию на апрель 2024 г. в РБ зарегистрировано 483 природных очага, из них: в Брестской области – 34 (7% от всех зарегистрированных), Витебской области – 298 (61,7% соответственно), Гомельской области – 59 (12,2%), Гродненской области – 8 (1,7%), Минской области – 42 (8,7%), Могилевской области – 42 (8,7%).

Особенностью ГЛПС является 100% восприимчивость человека независимо от пола и возраста, а также отсутствие контагиозности (больной не является источником инфекции и не опасен для окружающих). Люди заражаются при соприкосновении с объектами внешней среды, которые инфицированы грызунами. Заражение человека происходит преимущественно воздушно-пылевым путем при вдыхании. Инкубационный период продолжается от 4 до 49 сут.

Случаи заболевания ГЛПС в РБ ежегодно регистрируются с 1991 г. В течение первого десятилетия 1991–2001 гг. отмечались единичные случаи ГЛПС: всего 24 случая за весь период времени: 1991 г. – 3 случая; 1992 г. – 1; 1993 г. – 1; 1994 г. – 1; 1995 г. – 0; 1996 г. – 0; 1997 г. – 0; 1998 г. – 5 (из них один случай летальный); 1999 г. – 7; 2000 г. – 5 (из них один случай летальный); 2001 г. – 2. Однако в последующие годы в РБ регистрировался значительный рост заболеваемости ГЛПС: с 2009 г. по сентябрь 2016 г. выявлено 390 случаев инфекции, из них только в 2012 г. 59 случаев (показатель заболеваемости – 0,6 на 100 тыс. населения); значительный вклад в формирование среднереспубликанского показателя заболеваемости ГЛПС вносила Могилевская область, в которой в 2015 г. наблюдалось превышение республиканского уровня заболеваемости ГЛПС в 4,9

раза (показатели заболеваемости на 100 тыс. населения составили 3,55 для Могилевской области и 0,72 для РБ), что в целом свидетельствует об эпидемическом подъеме ГЛПС [18]. С 2018 по 2020 г. на территории РБ зафиксировано 274 случая заболевания ГЛПС, из которых 54,3% пришлось на 2019 г. – 1,58 на 100 тыс. населения республики (149 случаев заболевания) [17]. В Минске в 2020 г. зарегистрировано 5 случаев заболевания ГЛПС (0,25 на 100 тыс. населения); в 2021 г. – 6 случаев (0,29 на 100 тыс.); в 2022 г. – 7 случаев (0,35 на 100 тыс.) [19].

Таким образом, проведение мониторинга возбудителей ГЛПС на территориях РБ является необходимым и актуальным.

Цель работы – выявление ортохантавирусов, циркулирующих на территории РБ, и определение их генетических характеристик.

Материалы и методы

Для выявления вирусов – возбудителей ГЛПС был проведен отлов и идентификация мелких млекопитающих в природных и антропургических очагах на территориях Могилевской, Минской, Витебской, Гродненской, Гомельской и Брестской областей РБ за период с 2016 по 2020 г. (**рис. 1**). Всего было получено 613 проб биологического материала от представителей 9 видов отряда грызунов (*Rodentia*) и 2 видов отряда насекомоядных (*Eulipotyphla*). Видовой состав грызунов и количество обследованных особей составило: рыжая полевка (*Myodes glareolus*) – 93; желтогорлая мышь (*A. flavicollis*) – 146; лесная мышь (*A. sylvaticus*) – 39; полевка обыкновенная (*Microtus arvalis*) – 40; домовая мышь (*Mus musculus*) – 189; полевая мышь (*A. agrarius*) – 54; крыса серая (*Rattus norvegicus*) – 25; полевка-экономка (*M. oeconomus*) – 21; крыса черная (*R. rattus*) – 2. Видовой состав насекомоядных и количество обследованных особей составило: бурозубка обыкновенная (*Sorex araneus*) – 3; кутора обыкновенная (*Neomys fodiens*) – 1.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus author guidelines for animal use» (IAVES 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины» (Протокол № 31 от 10.12.2015).

В качестве материала для исследования использовали фрагменты легочной ткани грызунов и насекомоядных. В пробирку помещали фрагмент органа массой 20–30 мг, добавляли фосфатно-буферный физиологический раствор (PBS) в количестве 1 мл. Обработку содержимого пробирок проводили дезинтегратором модели Xenox D-54518 Niersbach в течение 30 с, после чего полученную взвесь центрифуги-

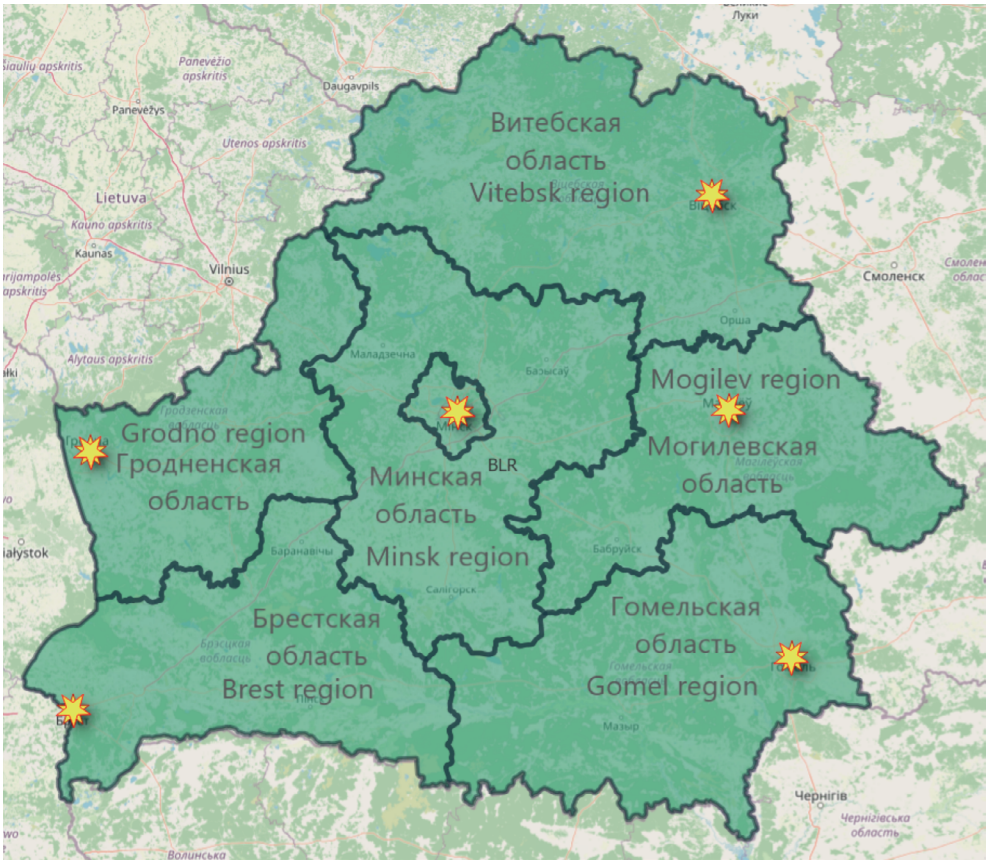

Рис. 1. Локализация точек отлова мелких млекопитающих на территории Республики Беларусь.

Fig. 1. Locations of small mammal capture points on the territory of the Republic of Belarus.

ровали при 1700 rcf (g) в течение 20 мин при температуре +4 °C. Надосадочную жидкость отбирали для экстракции РНК целевых вирусов.

Экстракцию общей РНК проводили с использованием набора реагентов «Рибо-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Вирусную комплементарную ДНК синтезировали с использованием обратной транскриптазы «Реверта-L» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Индикацию вируса в биологическом материале осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью тест-системы с детекцией результатов в реальном времени – «Белар-ГЛПС-ПЦР/РВ» (ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья» Минздрава Республики Беларусь, РБ). Реакцию, анализ и учет результатов проводили с использованием термоциклера IQ5 (Bio-Rad, США). Для регистрации накопления продуктов амплификации анализировали кривые накопления флуоресцентного сигнала по каналам FAM и ROX. Далее для идентификации фрагментов генов, обусловливающих видовую специфичность возбудителей ГЛПС, положительные образцы секвенировали по методу Сэнгера.

Для ПЦР-амплификации и секвенирования фрагментов генома положительных образцов участка M-сегмента PUUV и DOBV использовали праймеры, последовательности которых приведены ранее [20]. Для выявления участка S-сегмента DOBV были использованы праймеры Primer Dob-F: CGCGAAGCTTGCAACACTAGAGGAA и Primer Dob-R: GCGCCTCGAGAGCAGTTTGCCCAGT, разработанные нами на основе последовательностей из базы данных GenBank: AJ131673.1, AJ131672.1, EU188452.1, KC848500.1, AY961618.1, AJ616854.1, KC848499.1, GU904027.1, KC848501.1, AY533120.2, AY961615.1.

Для валидации специфичности, используемых в рамках исследования разработанной пары праймеров Dob-F и Dob-R, был проведен биоинформатический анализ методами *in silico* ПЦР. Так как область генома, кодирующая фрагмент нуклеокапсидного белка, к которому комплементарна эта пара праймеров, находится на S-сегменте генома хантавирусов [21–23], в анализ были включены 45 записей НП S-сегмента вирусов семейства *Hantaviridae* из базы данных RefSeq [24] и дополнительно 4 записи S-сегментов ортохантавирусов Добрава-Белград, в том числе штаммов вируса Куркино из базы данных GenBank [25] (дата обращения к базам данных: 28.01.2025). Для проведения *in silico* ПЦР использовали инструмент «primesearch» из программного обеспечения EMBOSS (версия 6.6.0) [26]. Максимальное количество несовпадений нуклеотидов было установлено равным 2. Результаты были визуализированы в виде тепловой карты с использованием пакета ggplot2 (версия 3.5.1) [27] для языка программирования R (версия 4.4.2).

Очистку продуктов ПЦР-амплификации проводили с использованием набора QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, США). Секвенирование очищенных продуктов проводили с использованием набора BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) на автоматическом анализаторе 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Выравнивание НП выполняли в программном обеспечении MEGA 11 с использованием алгоритма ClustalW [28].

Для сравнительного анализа и построения филогенетического дерева в качестве референсных были задействованы НП PUUV и DOBV, депонированные в базе данных GenBank NCBI.

Сравнительный анализ нуклеотидного и аминокислотного профиля был проведен в программе MegAlign из пакета Lasergene (DNASTAR, США).

Филогенетический анализ выполняли с помощью программы MEGA 11. Филогенетические деревья были рассчитаны по методу максимального правдоподобия с использованием моделей Tamura 3-parameter и Tamura-Nei для M- и S-сегментов соответственно. Индексы поддержки были рассчитаны для 1000 повторов. В качестве внешней группы для анализа последовательностей PUUV использовали TULV изолят «MarDNk29»; для анализа последовательностей DOBV – HNTV изолят «HV004».

Результаты

Вирусная РНК возбудителей ГЛПС была выявлена в 32 образцах, что составило 5,2% инфицированности особей. РНК PUUV была обнаружена у 24 особей из 32 ПЦР-положительных, что составило 3,9% инфицированности от общего количества анализируемых образцов и 75% среди положительных. РНК DOBV

Таблица. Результаты выявления вирусной РНК возбудителей ГЛПС в точках отлова на территории областей Республики Беларусь
Table. Results of detection of viral RNA of HFRS pathogens at capture points in regions of the Republic of Belarus

Область Region	Общее число образцов, шт. Total number of samples	Положительные образцы, шт. (% от общего числа) Positive samples, number (% of the total)	
		PUUV	DOBV
Минская | Minsk	221	9 (4,1)	2 (0,9)
Могилевская | Mogilev	225	6 (2,7)	4 (1,8)
Гродненская | Grodno	64	4 (6,3)	1 (1,6)
Гомельская | Gomel	50	2 (4)	1 (2)
Брестская | Brest	30	2 (6,7)	0
Витебская | Vitebsk	23	1 (4,4)	0
∑	613	24 (3,9)	8 (1,3)

была выявлена у 8 особей, процент зараженности которых составил 1,3% среди всех анализируемых и 25% среди положительных. РНК PUUV выявлена в легких грызунов из всех точек отлова (**таблица**).

Результаты анализа специфичности посредством проведения *in silico* ПЦР продемонстрировали, что используемая пара праймеров способна детектировать область генома, кодирующую фрагмент нуклеокапсидного белка хантавирусов, принадлежащих в основном роду *Ortohantavirus* (NC_038273.1), в том числе DOBV (в частности, к штаммам Куркино), которые послужили основой для дизайна праймеров [29] (AJ131673.1, AJ131672.1, KP878312.1, KP878313.1), а также родам *Actinovirus* (NC_055639.1) и *Mobatvirus* (NC_078483.1) (**рис. 2**). Таким образом, была валидирована возможность используемых в исследовании пары праймеров детектирования НП, кодирующих нуклеокапсидный белок хантавирусов, в основном DOBV.

В результате прямого секвенирования было получено 6 сиквенсов (PUUV – 3; DOBV – 3). Для идентификации обнаруженных ортохантавирусов проводили сравнительный анализ полученных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей (НП и АП соответственно).

В результате сравнительного анализа было установлено, что идентичность НП секвенированного участка генома длиной 325 пар нуклеотидов (п.н.) штаммов ортохантавируса из Могилевской области (Могилевский, Славгородский, Горецкий районы) между собой составила 99,4% и от 99,1 до 100% при сравнении АП. Сравнительный анализ НП выявленных и референсных штаммов продемонстрировал 79,1–91,4% идентичность с участком M-сегмента PUUV и 90,7–100% идентичность при сравнении соответствующих АП (**Приложение, табл. 1**). Таким образом, полученные НП были идентифицированы как фрагмент M-сегмента генома PUUV и депонированы в международную базу данных GenBank под номерами MH844481.1–MH844483.1.

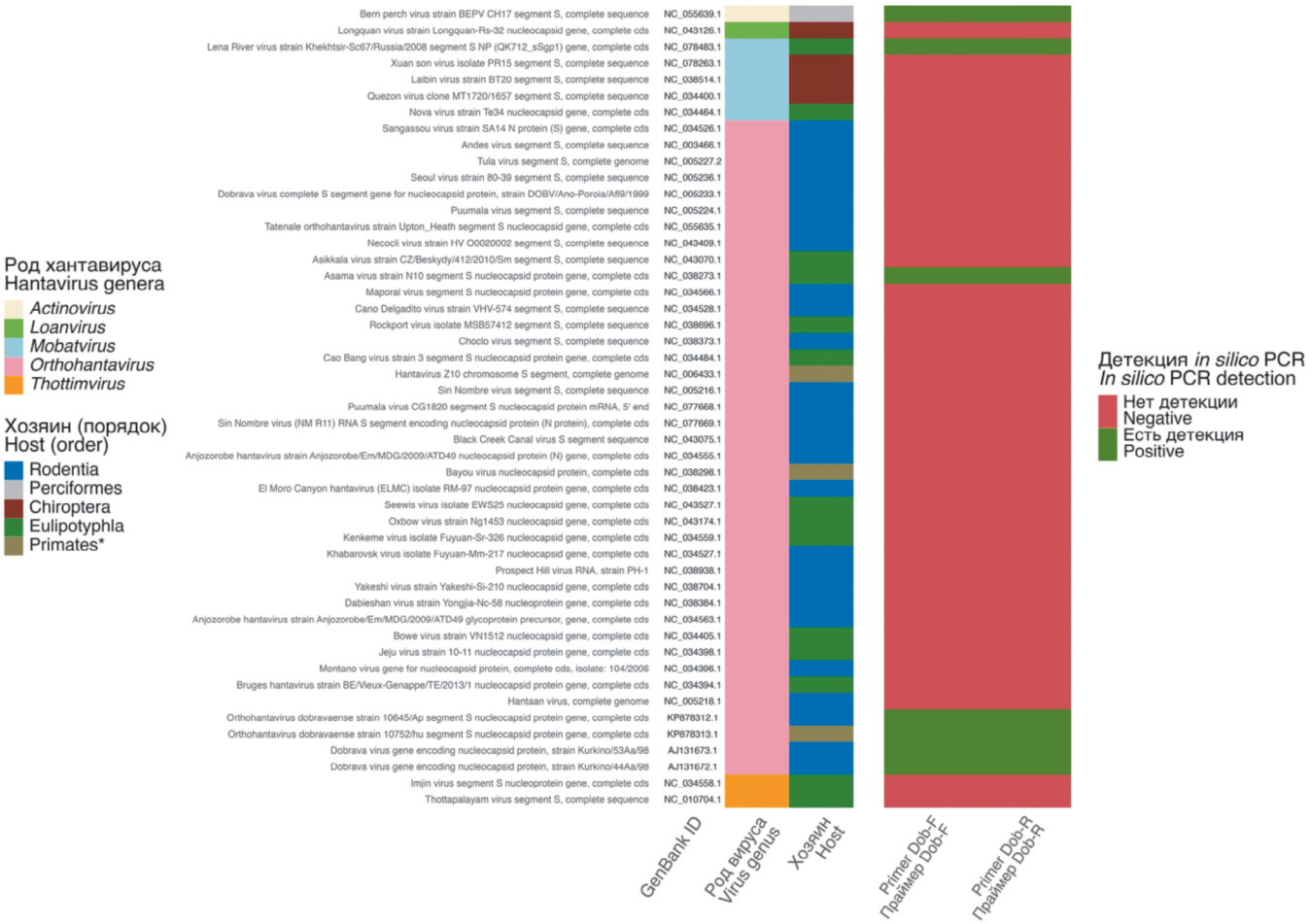

Рис. 2. Результаты анализа специфичности пары праймеров Dob-F и Dob-R посредством проведения *in silico* ПЦР с использованием записей нуклеотидных последовательностей S-сегментов геномов вирусов семейства *Hantaviridae* из баз данных RefSeq и GenBank.

*Отряд Primates представлен только человеком (*Homo sapiens*).

Fig. 2. Results of the specificity analysis of the primer pair Dob-F and Dob-R using *in silico* PCR based on S segment nucleotide sequences of viruses of family *Hantaviridae* from the RefSeq and GenBank databases.

*The order Primates is represented only by humans (*Homo sapiens*).

Анализ НП длиной 348 п.н. одного штамма (из Шкловского района Могилевской области) выявил 84,8–94,9 и 95,7–99,1% идентичность для НП и АП соответственно, при сравнении с референсными последовательностями S-сегмента DOBV (**Приложение, табл. 2**). В то же время НП длиной 291 п.н. двух штаммов (из Могилевского района Могилевской области и Пуховичского района Минской области) продемонстрировали 91,4 и 96,9% идентичность НП и АП соответственно при сравнении между собой, а также 82,5–90,7% идентичность при сравнении с референсными НП M-сегмента DOBV и 90,6–97,9% при сравнении соответствующих АП (**Приложение, табл. 3**). Таким образом, три полученных НП были идентифицированы как фрагменты генома DOBV.

Наибольшее значение идентичности анализируемых последовательностей PUUV из Могилевской области было выявлено при сравнении со штаммом «Puumala orthohantavirus isolate Klishino» (91,4% идентичность при сравнении НП и 98,1–99,1% при сравнении АП), обнаруженным в Курской области (Россия) в 2019 г. (Приложение, табл. 1). Анализ последовательности S-сегмента обнаруженного изолята DOBV_N_25_621 из Шкловского района Могилевской области показал его максимальное сходство с изолятом «Kurkino/53Aa/98» из России 1998 г. (94,0 и 99,1% идентичность для НП и АП соответственно) (Приложение, табл. 2). Наибольший процент идентичности НП S-сегмента анализируемых образцов DOBV_N_2141 и DOBV_N_2201 из Могилевского района Могилевской области и Пуховичского рай-

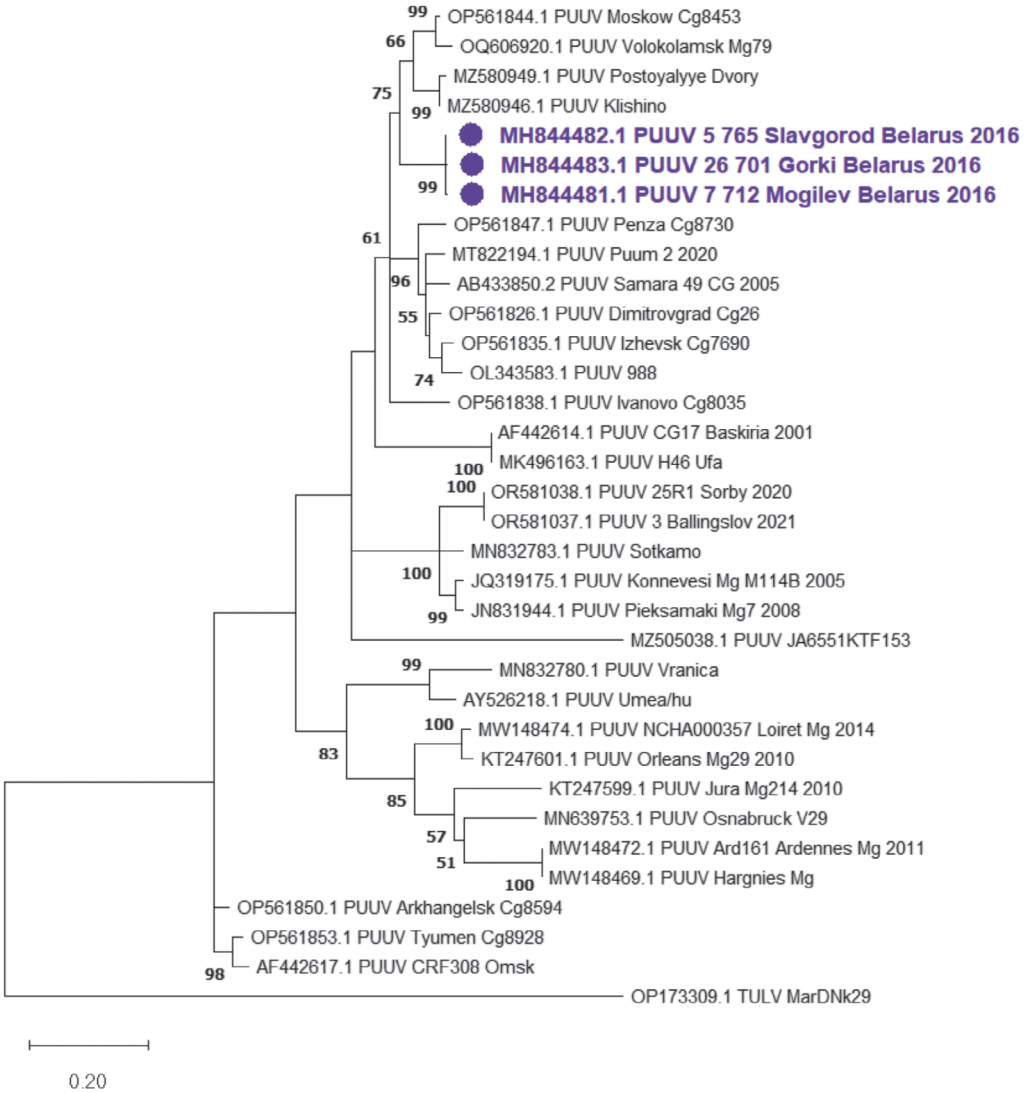

Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное для нуклеотидных последовательностей M-сегмента генома PUUV (позиции 1256–1580).

Фиолетовым цветом выделены последовательности выявленных штаммов PUUV.

Fig. 3. Phylogenetic tree constructed for the nucleotide sequences of the M-segment of the PUUV genome (positions 1256–1580).

The sequences of the identified PUUV strains are highlighted in purple.

она Минской области соответственно (89,3–90,7%) составил с изолятом вируса «Dobrava-Belgrade orthohantavirus isolate LT18/LK_11», выявленным в Литве в 2018 г. (Приложение, табл. 3).

По результатам филогенетического анализа установлено, что анализируемые изоляты PUUV группируются в отдельной субкладе, близкородственной к субкладе штаммов PUUV, циркулирующих в Курской и Московской областях, что может свидетельствовать об их принадлежности к одной сублинии в русской линии PUUV (**рис. 3**).

По результатам филогенетического анализа, проведенного для S-сегмента последовательности штамма DOBV_N_25_621, было выявлено его близкое родство к субкладе с изолятами «Kurkino/53Aa/98» и «Aa1854/Lipetsk-02» из России (**рис. 4**).

В результате филогенетического анализа, проведенного для M-сегмента последовательностей выявленных штаммов DOBV_N_2141 и DOBV_N_2201 из Могилевской и Минской областей соответственно, было установлено, что анализируемые последовательности группируются в отдельной субкладе на соседней ветке с субкладой, включающей изоляты «Dobrava-Belgrade orthohantavirus isolate LT18/LK_11» и «DOB/Saaremaa/160V» из Литвы и Эстонии соответственно (**рис. 5**).

Обсуждение

РБ относится к странам Европы, в которых ежегодно регистрируется значительное число заболеваний ГЛПС, вызываемого хантавирусами. Случаи заболевания ГЛПС в РБ ежегодно регистрируются с 1991 г., причем с 2009 г. в республике отмечается значительный рост заболеваемости. В 2012 г. было выявлено 59 случаев (показатель заболеваемости – 0,6 на 100 тыс. населения); значительный вклад в формирование среднереспубликанского показателя заболеваемости ГЛПС вносила Могилевская область, в которой в 2015 г. наблюдалось превышение республиканского уровня заболеваемости ГЛПС в 4,9 раза

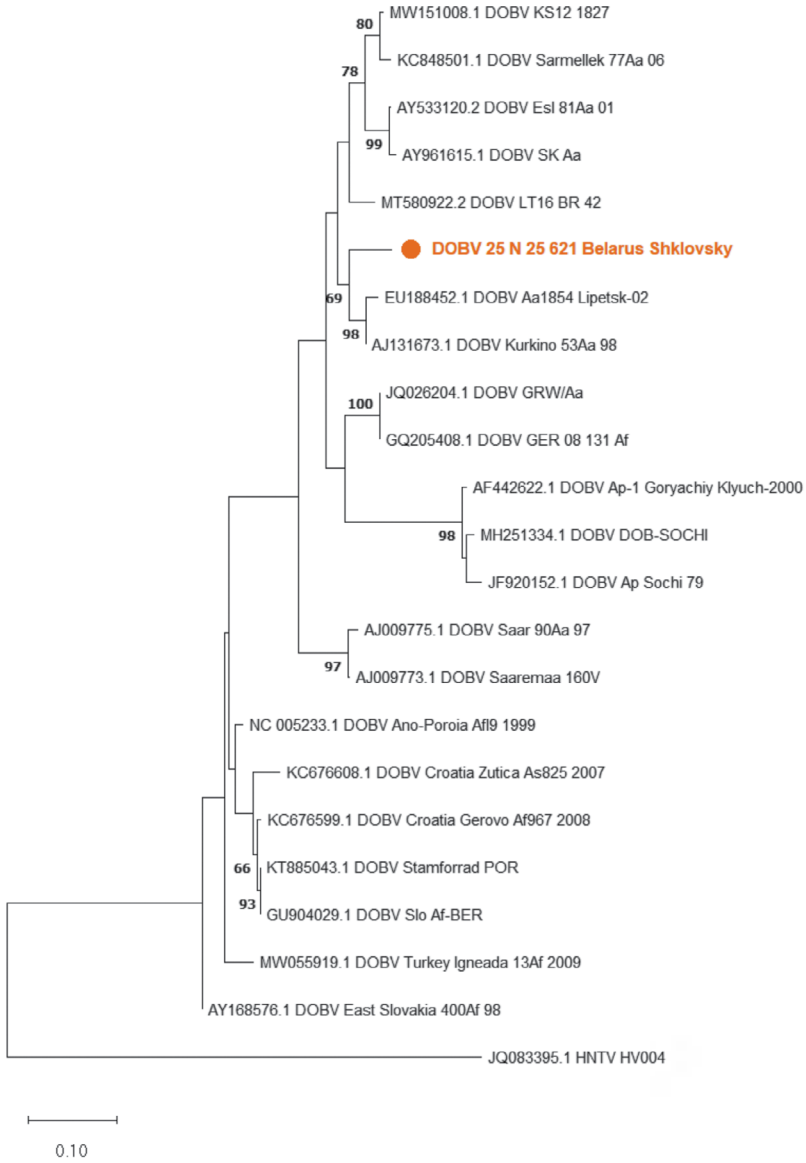

Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное для нуклеотидных последовательностей S-сегмента генома DOBV (позиции 4–351).

Оранжевым цветом выделена последовательность выявленного штамма DOBV из Могилевской области (Шкловский район).

Fig. 4. Phylogenetic tree constructed for the nucleotide sequences of the S-segment of the DOBV genome (positions 4–351).

The sequence of the DOBV strain identified from the Mogilev region (Shklov district) is highlighted in orange.

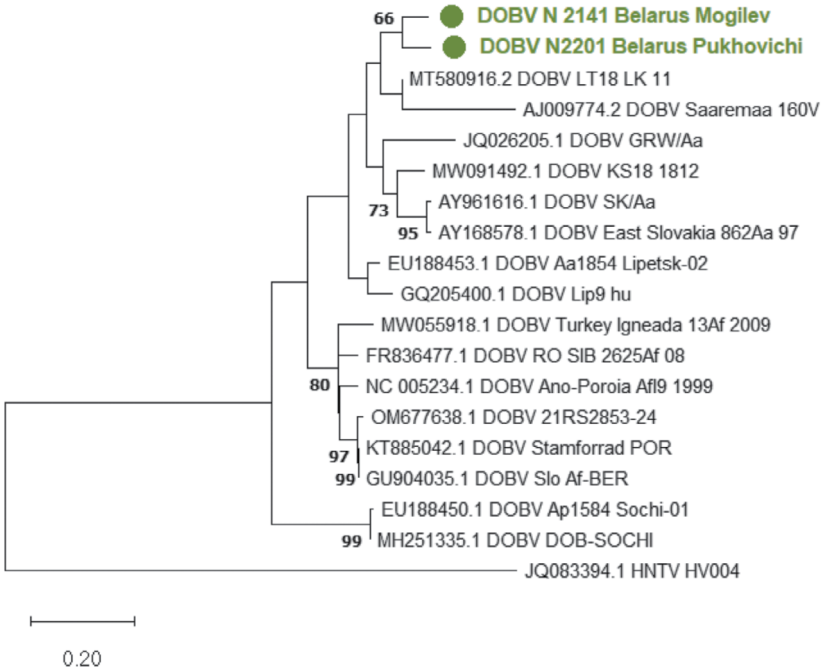

Рис. 5. Филогенетическое дерево, построенное для нуклеотидных последовательностей M-сегмента генома DOBV (позиции 1269–1559).

Зеленым цветом выделены последовательности штамма DOBV, выявленные в Могилевской (Могилевский район) и в Минской области (Пуховичский район).

Fig. 5. Phylogenetic tree constructed for the nucleotide sequences of the M-segment of the DOBV genome (positions 1269–1559).

The sequences of the DOBV strain identified in Mogilev (Mogilev district) and Minsk region (Pukhovichi district) are highlighted in green.

(показатели заболеваемости на 100 тыс. населения составили 3,55 для Могилевской области и 0,72 для республики), что в целом свидетельствует об эпидемическом подъеме ГЛПС. Источником заражения людей являются только грызуны – резервуарные хозяева патогенных хантавирусов, к которым на европейской территории относятся: рыжая полевка (вирус Пуумала) и полевая мышь (вирус Куркино). Таким образом, одной из актуальных задач для обеспечения профилактики и лечения ГЛПС является выявление циркуляции патогенов на территории и изучение их эволюции и особенностей строения геномов хантавирусов.

Вирус PUUV был выявлен на административных территориях всех областей республики, что вероятнее всего свидетельствует о его повсеместном распространении. Отмечается циркуляция вируса DOBV в Могилевской области, впервые выявленного в РБ и на территории данного региона в 2016 г. [30]. В настоящем исследовании вирус DOBV был впервые зарегистрирован на территориях Минской (Солигорский район), Гродненской (Островецкий район) и Гомельской (Жлобинский район) областей.

Результаты молекулярно-биологического анализа образцов из точек отлова, расположенных на территориях административных районов всех областей РБ, показали, что изоляты PUUV группируются в отдельной субкладе, близкородственной к субкладе вирусов, циркулирующих в Курской и Московской областях, что может свидетельствовать об их принадлежности к одной сублинии в русской линии PUUV. Вероятнее всего, это связано с генетической гомогенностью популяций вирусов, ассоциированных с определенной территорией и основным резервуаром вируса – рыжей полевкой.

В результате филогенетического анализа выявленных штаммов DOBV было установлено, что анализируемые последовательности группируются в отдельной субкладе с изолятами из России, Литвы и Эстонии, причем линия DOBV-Aa типична для Центральной Европы и центрально-европейской части России. Помимо этого, изоляты, выявленные в настоящем исследовании, имеют значительное генетическое подобие со штаммами, характерными для Эстонии, у которых отмечено значительное сходство с DOBV-подобным вирусом Сааремаа. Эти факты позволяют предположить, что выявленные штаммы, вероятнее всего, могут вызывать исключительно заболевания легкой/умеренной степени тяжести. Безусловно, антропогенное и техногенное воздействие на окружающую среду приводит к изменению биоценотической структуры очагов распространения инфекций и, как следствие, повышается участие грызунов в эпидемическом процессе. Однако на текущий момент на территории РБ не установлено тенденции к ухудшению эпидемиологической обстановки в отношении ГЛПС. При этом динамическое наблюдение за патогеном должно быть продолжено и усилено в целях контроля и предотвращения будущих угроз.

Заключение

Изучение структурно-функциональной организации геномов вирусов является важной фундаментальной и прикладной задачей современной генетики, особенно учитывая широкую распространенность заболеваний, вызываемых вирусами. Несмотря на то что случаи ГЛПС регулярно регистрируются среди населения на территории РБ, данные о генетических характеристиках ортохантавирусов с этой территории были впервые представлены авторами в настоящем исследовании.

Полученные данные свидетельствуют о коциркуляции двух видов ортохантавирусов – PUUV и DOBV –

на территории РБ. Соотношение выявленных видов патогенов указывает на более широкую циркуляцию PUUV, нежели DOBV. По данным проведенного исследования наиболее эпидемически значимым на территории РБ является PUUV, так же как и на территории Европейской части России, где около 98% случаев ГЛПС ассоциировано с этим вирусом [31].

Таким образом, в целях предотвращения возможного ухудшения эпидемиологической ситуации в отношении природно-очаговых инфекций, в частности ГЛПС, необходимо продолжать совершенствование молекулярно-генетического мониторинга в РБ и на прилегающих союзных территориях. Данные о генетических последовательностях вирусов играют важную роль в различных аспектах науки, медицины и здравоохранения. Эти последовательности представляют собой уникальную информацию о строении и функциональности вирусов, которая может быть использована на практике для разработки диагностических систем, лекарств и вакцин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Морозов В.Г., Ишмухаметов А.А., Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А. Клинические особенности геморрагической лихорадки с почечным синдромом в России. *Медицинский совет*. 2017; (5): 156–61. https://doi.org/10.21518/2079-701X-2017-5-156-161 https://elibrary.ru/yorunb
2. Яшина Л.Н., Сметанникова Н.А., Компанец Г.Г., Здановская Н.И., Иванов Л.И. Молекулярная эпидемиология патогенных хантавирусов на Дальнем Востоке России, 2015–2018 гг. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; (4): 102–8. https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-4-102-108 https://elibrary.ru/cnooaj
3. Klempa B, Tkachenko E.A., Dzagurova T.K., Yunicheva Y.V., Morozov V.G., Okulova N.M., et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by 2 lineages of Dobrava hantavirus, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(4): 617–25. https://doi.org/10.3201/eid1404.071310
4. Castel G., Chevenet F., Razzauti M., Murri S., Marianneau P., Cosson J.F., et al. Phylogeography of Puumala orthohantavirus in Europe. *Viruses*. 2019; 11(8): 679. https://doi.org/10.3390/v11080679
5. Schlegel M., Kindler E., Essbauer S.S., Wolf R., Thiel J., Groschup M.H., et al. Tula virus infections in the Eurasian water vole in Central Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012; 12(6): 503–13. https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0784
6. Avsic-Zupanc T., Petrovec M., Furlan P., Kaps R., Elgh F., Lundkvist A. Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Dolenjska region of Slovenia-a 10-year survey. *Clin. Infect. Dis*. 1999; 28(4): 860–5. https://doi.org/10.1086/515185
7. Papa A., Antoniadis A. Hantavirus infections in Greece-an update. *Eur. J. Epidemiol.* 2001; 17(2): 189–94. https://doi.org/10.1023/a:1017987104363
8. Kruger D.H., Klempa B. Dobrava-Belgrade virus. In: *Molecular Detection of Human Viral Pathogens*. Boca Raton: CRC Press; 2011: 631–6.
9. Klempa B., Stanko M., Labuda M., Ulrich R., Meisel H., Krüger D.H. Central European Dobrava hantavirus isolate from a striped field mouse (Apodemus agrarius). *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(6): 2756–63. https://doi.org/10.1128/JCM.43.6.2756-2763.2005
10. Nemirov K., Vapalahti O., Lundkvist A., Vasilenko V., Golovljova I., Plyusnina A., et al. Isolation and characterization of Dobrava hantavirus carried by the striped field mouse (Apodemus agrarius) in Estonia. *J. Gen. Virol.* 1999: 80(2): 371–9. https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-2-371
11. Ткаченко Е.А., Окулова Н.М., Юничева Ю.В., Морзунов С.П., Хайбулина С.Ф., Рябова Т.Е. и др. Эпизоотологические и вирусологические характеристики природного очага хантавирусной инфекции в субтропической зоне Краснодарского края. *Вопросы вирусологии*. 2005; 50(3): 14–9. https://elibrary.ru/hsghsn
12. Blinova E., Deviatkin A., Makenov M., Popova Y., Dzagurova T. Evolutionary Formation and Distribution of Puumala Virus Genome Variants, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2023; 29(7): 1420–4. https://doi.org/10.3201/eid2907.221731
13. Plyusnin A., Vapalahti O., Vaheri A. Hantaviruses: Genome structure, expression and evolution. *J. Gen. Virol.* 1996; 77(11): 2677–87. https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-11-2677
14. Туник Т.В., Арбатская Е.В., Ляпунов А.В., Хаснатинов М.А., Петрова И.В., Манзарова Э.Л. и др. О хантавирусах у людей и мелких млекопитающих в Прибайкалье. *Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра Сибирского отделения Российской академии медицинских наук*. 2014; (2): 71–6. https://elibrary.ru/sizjln
15. Яшина Л.Н., Абрамов С.А., Дупал Т.А., Якименко В.В., Танцев А.К., Малышев Б.С. и др. Хантавирусы в популяциях насекомоядных на территории Сибири. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; (4): 89–93. https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-4-89-93 https://elibrary.ru/yteidj
16. Ohlopkova O.V., Stolbunova K.A., Popov I.V., Popov I.V., Kabwe E., Davidyuk Y.N., et al. Detection of Brno loanvirus (Loanvirus brunaense) in common noctule bats (Nyctalus noctula) in Southern Russia. *Braz. J. Microbiol.* 2024. https://doi.org/10.1007/s42770-024-01587-5
17. Дороженкова Т.Е. Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом и ее эпидемиологическая характеристика в Республике Беларусь и городе Минске. *Medicus*. 2020; (3): 71–5. https://elibrary.ru/klhcld
18. Государственный доклад «О санитарно-эпидемиологической обстановке в Республике Беларусь в 2015 году». Минск; 2016.
19. Государственный доклад «Здоровье населения и окружающая среда г. Минска в 2022 году: достижение Целей устойчивого развития». Минск; 2023.
20. Lee H.W., Calisher C., Schmaljohn C. Manual of hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. Seoul; 1998.
21. Alfadhli A., Love Z., Arvidson B., Seeds J., Willey J., Barklis E. Hantavirus nucleocapsid protein oligomerization *J. Virol.* 2001; 75(4): 2019–23. https://doi.org/10.1128/JVI.75.4.2019-2023.2001
22. Severson W.E., Xu X., Jonsson C.B. Cis-acting signals in encapsidation of Hantaan virus S-segment viral genomic RNA by its N protein. *J. Virol.* 2001; 75(6): 2646–52. https://doi.org/10.1128/JVI.75.6.2646-2652.2001
23. Welke R.W., Sperber H.S., Bergmann R., Koikkarah A., Menke L., Sieben C., et al. Characterization of Hantavirus N protein intracellular dynamics and localization. *Viruses*. 2022; 14(3): 457. https://doi.org/ 45710.3390/v14030457
24. Pruitt K.D., Tatusova T., Maglott D.R. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33: D501–4. https://doi.org/10.1093/nar/gki025
25. Sayers E.W., Cavanaugh M., Clark K., Ostell J., Pruitt K.D., Karsch-Mizrachi I. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48(D1): D84–6. https://doi.org/10.1093/nar/gkz956
26. Rice P., Longden I., Bleasby A. EMBOSS: the European molecular biology open software suite. *Trends Genet.* 2000; 16(6): 276–7. https://doi.org/10.1016/s0168-9525(00)02024-2
27. Wickham H., Wickham H. *Data Analysis.* Springer; 2016: 189–201. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4_9
28. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis, version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021; 38(7): 3022–7. https://doi.org/10.1093/molbev/msab120
29. Счесленок Е.П., Семижон П.А., Касницкая Т.Н., Омельянович О.Г., Войтенко Н.Т., Чайка А.В. и др. Хантавирусы, циркулирующие на территории Республики Беларусь. В кн.: *Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика – 2017». Том 2*. М.; 2017: 350–1. https://elibrary.ru/zohxob
30. Счесленок Е.П., Фомина Е.Г., Семижон П.А., Григорьева Е.Е., Школина Т.В., Владыко А.С. и др. Получение и характеристика рекомбинантных полипептидов, представляющих антигензначимые участки нуклеокапсидных белков хантавирусов. *Здравоохранение (Минск)*. 2018; (4): 16–21. https://elibrary.ru/xtcsrv
31. Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Bernshtein A.D., Morozov V.G., Siniugina A.A., et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(12): 2325–8. https://doi.org/10.3201/eid2512.181649

REFERENCES

1. Morozov V.G., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Tkachenko E.A. Clinical manifestations of hemorrhagic fever with renal syndrome in Russia. *Meditsinskiy sovet.* 2017; (5): 156–61. https://doi.org/10.21518/2079-701X-2017-5-156-161 https://elibrary.ru/yorunb (in Russian)
2. Yashina L.N., Smetannikova N.A., Kompanets G.G., Zdanovskaya N.I., Ivanov L.I. Molecular epidemiology of pathogenic hantaviruses in the far east of Russia, 2015–2018. *Problemy osobo opasnykh infektsii.* 2019; (4): 102–8. https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-4-102-108 https://elibrary.ru/cnooaj (in Russian)
3. Klempa B, Tkachenko E.A., Dzagurova T.K., Yunicheva Y.V., Morozov V.G., Okulova N.M., et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome caused by 2 lineages of Dobrava hantavirus, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(4): 617–25. https://doi.org/10.3201/eid1404.071310
4. Castel G., Chevenet F., Razzauti M., Murri S., Marianneau P., Cosson J.F., et al. Phylogeography of Puumala orthohantavirus in Europe. *Viruses.* 2019; 11(8): 679. https://doi.org/10.3390/v11080679
5. Schlegel M., Kindler E., Essbauer S.S., Wolf R., Thiel J., Groschup M.H., et al. Tula virus infections in the Eurasian water vole in Central Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2012; 12(6): 503–13. https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0784
6. Avsic-Zupanc T., Petrovec M., Furlan P., Kaps R., Elgh F., Lundkvist A. Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Dolenjska region of Slovenia-a 10-year survey. *Clin. Infect. Dis*. 1999; 28(4): 860–5. https://doi.org/10.1086/515185
7. Papa A., Antoniadis A. Hantavirus infections in Greece-an update. *Eur. J. Epidemiol.* 2001; 17(2): 189–94. https://doi.org/10.1023/a:1017987104363
8. Kruger D.H., Klempa B. Dobrava-Belgrade virus. In: *Molecular Detection of Human Viral Pathogens.* Boca Raton: CRC Press; 2011: 631–6.
9. Klempa B., Stanko M., Labuda M., Ulrich R., Meisel H., Krüger D.H. Central European Dobrava hantavirus isolate from a striped field mouse (Apodemus agrarius). *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(6): 2756–63. https://doi.org/10.1128/JCM.43.6.2756-2763.2005
10. Nemirov K., Vapalahti O., Lundkvist A., Vasilenko V., Golovljova I., Plyusnina A., et al. Isolation and characterization of Dobrava hantavirus carried by the striped field mouse (Apodemus agrarius) in Estonia. *J. Gen. Virol.* 1999: 80(2): 371–9. https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-2-371
11. Tkachenko E.A., Okulova N.M., Yunicheva YU.V., Morzunov S.P., Khaibulina S.F., Ryabova T.E., et al. The epizootological and virological characteristics of a natural hantavirus infection focus in the subtropic zone of the Krasnodarsk Territory. *Voprosy virusologii.* 2005; 50(3): 14–9. https://elibrary.ru/hsghsn (in Russian)
12. Blinova E., Deviatkin A., Makenov M., Popova Y., Dzagurova T. Evolutionary Formation and Distribution of Puumala Virus Genome Variants, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2023; 29(7): 1420–4. https://doi.org/10.3201/eid2907.221731
13. Plyusnin A., Vapalahti O., Vaheri A. Hantaviruses: Genome structure, expression and evolution. *J. Gen. Virol.* 1996; 77(11): 2677–87. https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-11-2677
14. Tunik T.V.1, Arbatskaya E.V.1, Lyapunov A.V., Khasnatinov M.A., Petrova I.V., Manzarova E.L., et al. To hantavirus infection in people and small mammals in Baikal area. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra Sibirskogo otdeleniya Rossiiskoi akademii meditsinskikh nauk.* 2014; (2): 71–6. https://elibrary.ru/sizjln (in Russian)
15. Yashina L.N., Abramov S.A., Dupal T.A., Yakimenko V.V., Tantsev A.K., Malyshev B.S., et al. Hantaviruses in insectivore populations in Siberia. *Problemy osobo opasnykh infektsii.* 2018; (4): 89–93. https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-4-89-93 https://elibrary.ru/yteidj (in Russian)
16. Ohlopkova O.V., Stolbunova K.A., Popov I.V., Popov I.V., Kabwe E., Davidyuk Y.N., et al. Detection of Brno loanvirus (Loanvirus brunaense) in common noctule bats (Nyctalus noctula) in Southern Russia. *Braz. J. Microbiol.* 2024. https://doi.org/10.1007/s42770-024-01587-5
17. Dorozhenkova T.E. Hemorrhagic fever with renal syndrome and its epidemiological characteristics in the republic of Belarus and Minsk. *Medicus*. 2020; (3): 71–5. https://elibrary.ru/klhcld (in Russian)
18. State report «On the sanitary and epidemiological situation in the Republic of Belarus in 2015». Minsk; 2016. (in Russian)
19. State report «Public health and the environment of Minsk in 2022: achieving the Sustainable Development Goal» Minsk; 2023. (in Russian)
20. Lee H.W., Calisher C., Schmaljohn C. Manual of hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. Seoul; 1998.
21. Alfadhli A., Love Z., Arvidson B., Seeds J., Willey J., Barklis E. Hantavirus nucleocapsid protein oligomerization *J. Virol.* 2001; 75(4): 2019–23. https://doi.org/10.1128/JVI.75.4.2019-2023.2001
22. Severson W.E., Xu X., Jonsson C.B. Cis-acting signals in encapsidation of Hantaan virus S-segment viral genomic RNA by its N protein. *J. Virol.* 2001; 75(6): 2646–52. https://doi.org/10.1128/JVI.75.6.2646-2652.2001
23. Welke R.W., Sperber H.S., Bergmann R., Koikkarah A., Menke L., Sieben C., et al. Characterization of Hantavirus N protein intracellular dynamics and localization. *Viruses*. 2022; 14(3): 457. https://doi.org/ 45710.3390/v14030457
24. Pruitt K.D., Tatusova T., Maglott D.R. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33: D501–4. https://doi.org/10.1093/nar/gki025
25. Sayers E.W., Cavanaugh M., Clark K., Ostell J., Pruitt K.D., Karsch-Mizrachi I. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48(D1): D84–6. https://doi.org/10.1093/nar/gkz956
26. Rice P., Longden I., Bleasby A. EMBOSS: the European molecular biology open software suite. *Trends Genet.* 2000; 16(6): 276–7. https://doi.org/10.1016/s0168-9525(00)02024-2
27. Wickham H., Wickham H. *Data Analysis.* Springer; 2016: 189–201. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4_9
28. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis, version 11. *Mol. Biol. Evol.* 2021; 38(7): 3022–7. https://doi.org/10.1093/molbev/msab120
29. Scheslenok E.P., Semizhon P.A., Kasnitskaya T.N., Omel'yanovich O.G., Voitenko N.T., Chaika A.V., et al. Hantaviruses circulating in the territory of the Republic of Belarus. In: *Proceedings of the IX All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation «Molecular Diagnostics – 2017». Volume 2.* Moscow; 2017: 350–1. (in Russian)
30. Scheslenok E.P., Fomina E.G., Semizhon P.A., Grigorieva E.E., Shkolina T.V., Vladyko A.S., et al. Preparation and description of recombinant polypeptides representing antigenically active regions of hantavirus nucleocapsid proteins. *Zdravookhranenie (Minsk).* 2018; (4): 16–21. https://elibrary.ru/xtcsrv (in Russian)
31. Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Bernshtein A.D., Morozov V.G., Siniugina A.A., et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(12): 2325–8. https://doi.org/10.3201/eid2512.181649

Информация об авторах:

Семижон Павел Анатольевич✉ **–** канд. биол. наук, заведующий лабораторией биотехнологии и иммунодиагностики особо опасных инфекций ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Минск, Республика Беларусь. E-mail: pavel5555@tut.by; https://orcid.org/0000-0001-7986-8299

Счесленок Елена Павловна – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии и иммунодиагностики особо опасных инфекций ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Минск, Республика Беларусь. E-mail: elena_pavlovna@tut.by; https://orcid.org/0000-0001-8143-684X

Дубков Никита Анатольевич – научный сотрудник лаборатории биотехнологии и иммунодиагностики особо опасных инфекций ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Минск, Республика Беларусь.
E-mail: dubkov.nikita@gmail.com; https://orcid.org/0009-0007-8488-4307

Сухоцкая Елизавета Андреевна – младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии и иммунодиагностики особо опасных инфекций ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», Минск, Республика Беларусь. E-mail: elissuchozkaja5@gmail.com; https://orcid.org/0009-0007-0439-6363

Столбунова Кристина Александровна – младший научный сотрудник лаборатории геномики и эволюции вирусов НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ, Новосибирск, Россия. E-mail: kristina.sunwo@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0003-3376-945x

Попов Игорь Витальевич – младший научный сотрудник факультета «Биоинженерия и ветеринарная медицина» Донского государственного технического университета, Ростов-на-Дону, Россия. E-mail: ipopov@donstu.ru; https://orcid.org/0000-0002-9223-8731

Попов Илья Витальевич – младший научный сотрудник факультета «Биоинженерия и ветеринарная медицина» Донского государственного технического университета, Ростов-на-Дону, Россия. E-mail: ivpopov@donstu.ru; https://orcid.org/0000-0001-7947-1654

Алексеев Александр Юрьевич – канд. биол. наук, старший научный сотрудник НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ, Новосибирск, Россия. E-mail: ayalekseev@frcftm.ru; https://orcid.org/0000-0003-0015-9305

Кабве Эммануэль – канд. биол. наук, старший научный сотрудник НИЛ OpenLab «Генные и клеточные технологии», научно-клинический центр прецизионной и регенеративной медицины, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия. E-mail: emmanuelkabwe@ymail.com; https://orcid.org/0000-0003-4328-8190

Давидюк Юрий Николаевич – канд. биол. наук, старший научный сотрудник НИЛ OpenLab «Генные и клеточные технологии», научно-клинический центр прецизионной и регенеративной медицины, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия. E-mail: davi.djuk@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-4409-2942

Участие авторов: Семижон П.А., Счесленок Е.П. – концепция и дизайн исследования; Счесленок Е.П., Дубков Н.А. – сбор биоматериала; Семижон П.А., Счесленок Е.П., Сухоцкая Е.А. – проведение экспериментов; Семижон П.А., Счесленок Е.П., Дубков Н.А. – секвенирование нуклеотидных последовательностей и публикация в базе данных; Попов Иг.В. – проведение *in silico* анализа специфичности праймеров; Попов Ил.В. – валидация результатов *in silico* анализа специфичности праймеров; Столбунова К.А., Кабве Э., Давидюк Ю.Н. – сравнительный и филогенетический анализ и интерпретация данных; Семижон П.А., Счесленок Е.П., Дубков Н.А., Сухоцкая Е.А., Столбунова К.А, Попов Иг.В., Попов Ил.В., Алексеев А.Ю., Кабве Э., Давидюк Ю.Н. – подготовка рукописи, рецензирование текста и полученных результатов, оформление текста.

Поступила 13.01.2025
Принята в печать 24.02.2025
Опубликована 28.02.2025

Information about the authors:

Pavel A. Semizhon✉ – PhD, Head of the Laboratory of Biotechnology and Immunodiagnostics of Particularly Dangerous Infections of the State Institution «Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health», Minsk, Republic of Belarus. E-mail: pavel5555@tut.by; https://orcid.org/0000-0001-7986-8299

Elena P. Scheslenok – PhD, Leading Researcher, Laboratory of Biotechnology and Immunodiagnostics of Particularly Dangerous Infections, State Institution «Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health», Minsk, Republic of Belarus. E-mail: elena_pavlovna@tut.by; https://orcid.org/0000-0001-8143-684X

Nikita A. Dubkov – Researcher at the Laboratory of Biotechnology and Immunodiagnostics of Particularly Dangerous Infections of the State Institution «Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health», Minsk, Republic of Belarus. E-mail: dubkov.nikita@gmail.com; https://orcid.org/0009-0007-8488-4307

Elizaveta A. Sukhotskaya – Junior Researcher, Laboratory of Biotechnology and Immunodiagnostics of Particularly Dangerous Infections, State Institution «Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health». Minsk, Republic of Belarus. E-mail: elissuchozkaja5@gmail.com; https://orcid.org/0009-0007-0439-6363

Kristina A. Stolbunova – Junior Researcher, Laboratory of Virus Genomics and Evolution, Research Institute of Virology, Federal Research Center for Physical and Mathematical Medicine, Novosibirsk, Russia. E-mail: kristina.sunwo@yandex.ru; https://orcid.org/0000-0003-3376-945x

Igor V. Popov – Junior Researcher, Faculty of Bioengineering and Veterinary Medicine, Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russia. E-mail: ipopov@donstu.ru; https://orcid.org/0000-0002-9223-8731

Ilia V. Popov – Junior Researcher, Faculty of Bioengineering and Veterinary Medicine, Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russia. E-mail: ivpopov@donstu.ru; https://orcid.org/0000-0001-7947-1654

Alexander Yu. Alekseev – PhD, Senior Researcher at the Research Institute of Virology, Federal Research Center for Physical and Mathematical Medicine, Novosibirsk, Russia. E-mail: ayalekseev@frcftm.ru; https://orcid.org/0000-0003-0015-9305

Emmanuel Kabwe – PhD, Senior Research Fellow at Laboratory OpenLab «Gene and Cell Technologies», Scientific and Clinical Center for Precision and Regenerative Medicine, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia. E-mail: emmanuelkabwe@ymail.com; https://orcid.org/0000-0003-4328-8190

Yuriy N. Davidyuk – PhD, Senior Research Fellow at Laboratory OpenLab «Gene and Cell Technologies», Scientific and Clinical Center for Precision and Regenerative Medicine, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia. E-mail: davi.djuk@mail.ru; https://orcid.org/0000-0002-4409-2942

Contribution: Semizhon P.A., Scheslenok E.P. – concept and design of the study; Scheslenok E.P., Dubkov N.A. – collection of biomaterial; Semizhon P.A., Scheslenok E.P., Sukhotskaya E.A. – conducting experiments; Semizhon P.A., Scheslenok E.P., Dubkov N.A. – sequencing of nucleotide sequences and publication in a database; Popov Ig.V. – in silico analysis of primer specificity; Popov Il.V. – validation of the the results of the in silico analysis of primer specificity; Stolbunova K.A., Kabwe E., Davidyuk Yu.N. – comparative and phylogenetic analysis and interpretation of data; Semizhon P.A., Scheslenok E.P., Dubkov N.A., Sukhotskaya E.A., Stolbunova K.A., Popov Ig.V., Popov Il.V., Alekseev A.Yu., Kabwe E., Davidyuk Yu.N. – preparation of the manuscript, review of the text and obtained results, text design.

Received 13 January 2025
Accepted 24 February 2025
Published 28 February 2025

Problems
of Virology

Voprosy
Virusologii

ISSN 0507-4088. Вопр. вирусологии. 2025. Т. 70. № 1. 1–98.