

Журнал "Вопросы вирусологии" представлен в следующих международных информационно-справочных изданиях: Abstract Journals, AIDS & Cancer Research, Biocontrol News and Information, Biological Sciences, Chemical Abstracts, 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, Russian Science Citation Index (на базе Web of Science)

ЛР № 010215 от 29.04.97

Зав. редакцией *Т.М. Курушина*  
E-mail: vopr.virusol@mail.ru

Вёрстка *Е.М. Архипова*

Ответственность за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах, несут рекламодатели.

ISSN 0507-4088. *Вопр. вирусологии.* 2019. Т. 64. № 4. 145-200.

Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Учредители: **ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Общероссийская общественная организация «Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов»**

# ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

4

Том 64 · 2019

## Редакционная коллегия

**Главный редактор: ЛЬВОВ Д.К. (д.м.н., проф., акад. РАН)**

Зам. главного редактора: **Дерябин П.Г. (д.м.н., проф.)**

Ответственный секретарь: **Гребенникова Т.В. (д.б.н., проф., член-корр. РАН)**

Научный редактор: **Забережный А.Д. (д.б.н., проф.)**

### Члены редколлегии:

Альховский С.В. (д.б.н.)

Баринский И.Ф. (д.м.н., проф.)

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)

Зверев В.В. (д.б.н., проф., акад. РАН)

Зуев В.А. (д.м.н., проф.)

Иванова О.Е. (д.м.н., проф.)

Карганова Г.Г. (д.б.н., проф.)

Колобухина Л.В. (д.м.н., проф.)

Лобзин Ю.В. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Малеев В.В. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Онищенко Г.Г. (д.м.н., проф., акад. РАН)

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)

**Ананьев В.Ю.** (к.м.н., рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Приморском крае"; Владивосток, Россия)

**Антонов В.А.** (д.м.н., проф.; Волгоград, Россия)

**Баранов А.А.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Борисевич С.В.** (д.б.н., проф.; член-корр. РАН, Сергиев Посад, Россия)

**Брико Н.И.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Бутаев Т.М.** (д.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Республике Сев. Осетия-Алания; Владикавказ, Россия)

**Гарбуз Ю.А.** (рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Хабаровском крае"; Хабаровск, Россия)

**Глинских Н.П.** (д.м.н., проф.; Екатеринбург, Россия)

**Григорьев С.Н.** (рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Магаданской обл."; Магадан, 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.** (рук. ФКУЗ "Хабаровская ПЧС"; 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)

**Лисицин Е.А.** (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Владимирской обл.; Владимир, Россия)

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

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

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

**Нетесов С.В.** (д.б.н., проф., член-корр. РАН; Новосибирск, Россия)

**Никифоров В.В.** (д.м.н., проф.; Москва, Россия)

**Покровский А.Г.** (д.м.н., проф., член-корр. РАН; Новосибирск, Россия)

**Покровский В.И.** (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Резник В.И.** (к.м.н.; Хабаровск, Россия)

**Романенко В.В.** (д.м.н., зам. рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Свердловской обл."; Екатеринбург, Россия)

**Степанова Т.Ф.** (д.м.н., проф.; Тюмень, Россия)

**Тутельян А.В.** (д.м.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)

**Янович В.А.** (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Еврейской АО; Биробиджан, Россия)

**Яшкулов К.Б.** (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Республике Калмыкия; Элиста, Россия)

## ИНОСТРАННЫЕ ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА

**Виноград Н.А.** (д.м.н., проф.; Львов, Республика Украина)

**Грибкова Н.В.** (к.м.н.; Минск, Республика Беларусь)

**Титов А.П.** (д.м.н., проф., член-корр. НАН Беларуси, акад. РАН; Минск, Республика Беларусь)

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

**Berencsi G.** (PhD, MD, Prof.; Budapest, Hungary)

**Ciampor F.** (PhD, MD, DrSc; Bratislava, Slovak Republic)

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

**De Paiva T.M.** (PhD; San Paulo, Brazil)

**Galabov A.S.** (Prof., acad. of the Bulgarian Academy of Sciences; Sofia, Bulgaria)

**Golovljova I.** (PhD; Tallinn, Estonia)

**Goujgoulova G.** (PhD; Sofia, Bulgaria)

**Hoenen T.** (PhD; Hamilton, USA)

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

**Klenk H.-D.** (PhD, Prof.; Marburg, Germany)

**Kuhn J.H.** (MD, PhD, PhD, M.Sc.; Frederick, USA)

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

**Maneekarn N.** (PhD, D.V.M., Prof.; Chiang Mai, Thailand)

**Matrosovich M.N.** (PhD; Marburg, Germany)

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

**Oxford J.** (DSc; London, UK)

**Petrenkienė V.** (Assoc. Prof.; Kaunas, Lithuania)

**Roggendorf M.** (MD, Essen, Germany)

**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)

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

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

**Vainionpää R.** (Docent; Turku, Finland)

**Webster R.** (PhD, DSc, Memphis, USA)

**Webby R.** (PhD, Memphis, USA)

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

**Zeichardt H.** (PhD, DSc, Prof.; Berlin, Germany)

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

# VOPROSY VIROLOGII

PROBLEMS OF VIROLOGY (Russian Journal)

Scientific Theoretical Journal Issued once in two months. Published since 1956

## Volume 64 • 4 • 2019

### EDITORIAL BOARD

**Editor-in-Chief:** LVOV D.K., MD, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS

Assistant editors in chief: **Deryabin P.G.**, MD, PhD, DSc, Professor

Executive secretary: **Grebennikova T.V.**, Doctor of Biological Sciences, Professor,  
corresponding member of RAS

Scientific editor: **Zaberezhnyy A.D.**, Doctor of Biological Sciences, Professor

### *Members of editorial board:*

**Al'khovskiy S.V.** – Doctor of Biological Sciences; **Barinskiy I.F.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Belousova R.V.** – Doctor of Veterinary Sciences, Prof.; **Galegov G.A.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.; **Gulyukin M.I.** – Doctor of Veterinary Sciences, Prof., Academician of RAS; **Gurtsevich V.E.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Ershov F.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Zvrev V.V.** – Doctor of Biological Sciences, Prof., Academician of RAS; **Zuev V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Ivanova O.E.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Karganova G.G.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.; **Kolobukhina L.V.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Lobzin Yu.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Maleev V.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Onishchenko G.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Uryvaev L.B.** – MD, PhD, DSc, Prof., corresponding member of RAS; **Yuminova N.V.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.

### Editorial council

**Akimkin V.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

**Aliper T.I.** – Sc.D., Prof. (Moscow, Russia)

**Anan'ev V.Yu.** – MD, PhD (Vladivostok, Russia)

**Antonov V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Volgograd, Russia)

**Baranov A.A.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

**Borisevich S.V.** – Sc.D., Prof., corr. member of RAS (Sergiev Posad, Russia)

**Briko N.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

**Butaev T.M.** – MD, PhD, DSc (Vladikavkaz, Russia)

**Garbuz Yu.A.** – MD (Khabarovsk, Russia)

**Glinskikh N.P.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Ekaterinburg, Russia)

**Grigor'ev S.N.** – MD (Magadan, Russia)

**Zasedatelev A.S.** – Doctor of physical, Prof. (Moscow, Russia)

**Zlobin V.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Irkutsk, Russia)

**Ivanov L.I.** – MD (Khabarovsk, Russia)

**Kuzin A.A.** – MD, PhD, DSc (St. Petersburg, Russia)

**Kutyrev V.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Saratov, Russia)

**Leonova G.N.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Vladivostok, Russia)

**Lisitsin E.A.** – MD, PhD (Vladimir, Russia)

**Loktev V.B.** – Sc.D., Prof. (Novosibirsk, Russia)

**Malyshev N.A.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Moscow, Russia)

**Mikhaylov M.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., corr. member of RAS (Moscow, Russia)

**Netesov S.V.** – Sc.D., Prof., corr. member of RAS (Novosibirsk, Russia)

**Nikiforov V.V.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Moscow, Russia)

**Pokrovskiy A.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., corr. member of RAS (Novosibirsk, Russia)

**Pokrovskiy V.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

**Reznik V.I.** – MD, PhD (Khabarovsk, Russia)

**Romanenko V.V.** – MD, PhD, DSc (Ekaterinburg, Russia)

**Stepanova T.F.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Tyumen, Russia)

**Tutel'yan A.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., corr. member of RAS (Moscow, Russia)

**Chuchalin A.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

**Shestopalov A.M.** – Sc.D., Prof. (Novosibirsk, Russia)

**Shchelkanov M.Yu.** – Sc.D, Prof. (Vladivostok, Russia)

**Yanovich V.A.** – MD, PhD (Birobidzhan, Russia)

**Yashkulov K.B.** – MD, PhD (Elista, Russia)

### Advisory Board

**Vinograd N.A.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Lvov, Ukraina)

**Gribkova N.V.** – MD, PhD (Minsk, Republic of Belarus)

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

**Becker J.** – PhD, DM, Prof. (Jerusalem, Israel)

**Berenci G.** – PhD, MD, Prof. (Budapest, Hungary)

**Ciampor F.** – PhD, MD, Dr.Sc. (Bratislava, Slovak Republic)

**Compans R.W.** – PhD, Prof. (Atlanta, USA)

**De Paiva T.M.** – PhD (San Paulo, Brazil)

**Galabov A.S.** – Prof., acad. of the Bulgarian Academy of Sciences (Sofia, Bulgaria)

**Golovljova I.** – PhD (Tallinn, Estonia)

**Goujgoulova G.** – PhD (Sofia, Bulgaria)

**Hoenen T.** – PhD (Hamilton, USA)

**Kawaoka Y.** – PhD, Prof. (Tokyo, Japan)

**Klenk H.-D.** – PhD, Prof. (Marburg, Germany)

**Kuhn J.H.** – MD, PhD, PhD, MSc (Frederick, USA)

**Mackenzie J.** – PhD, Prof. (Brisbane, Australia)

**Maneekarn N.** – PhD, D.V.M., Prof. (Chiang Mai, Thailand)

**Matrosovich M.N.** – PhD (Marburg, Germany)

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

**Oxford J.** – DSc (London, UK)

**Petrenkiene V.** – Assoc. Prof. (Kaunas, Lithuania)

**Roggendorf M.** – MD (Essen, Germany)

**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)

**Turan K.** – PhD, Assoc. Prof. (Istanbul, Turkey)

**Vaheri A.** – PhD, MD, Prof. (Helsinki, Finland)

**Vainionpää R.** – Docent (Turku, Finland)

**Webster R.** – PhD, DSc. (Memphis, USA)

**Webby R.** – PhD (Memphis, USA)

**Yuelong Shu** – PhD (Beijing, P.R. China)

**Zeichardt H.** – PhD, DSc, Prof. (Berlin, Germany)

---

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОБЗОРЫ

**Замарина Т.В., Храпова Н.П., Пименова Е.В., Ханани Е.И., Викторов Д.В., Топорков А.В.**  
Иммунодиагностика лихорадки Зика: обзор производимых тест-систем . . . . . 150

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Латышев О.Е., Елисеева О.В., Костина Л.В., Алексеев К.П., Хаметова К.М., Алтаева Е.Г.,  
Верховский О.А., Алипер Т.И., Гребенникова Т.В.**  
Оценка иммуногенной активности клонированного штамма WA ротавируса А человека . . . . . 156

**Наровлянский А.Н., Мезенцева М.В., Суетина И.А., Руссу Л.И., Иванова А.М., Полосков В.В.,  
Изместьева А.В., Оспельникова Т.П., Сарымсаков А.А., Ершов Ф.И.**  
Цитокин-регулирующая активность противовирусного препарата ЦелАгрип в перевиваемых В-клеточных  
линиях лимфомы Беркитта. . . . . 165

**Гулюкин М.И., Капустина О.В., Ездакова И.Ю., Вальциферова С.В., Степанова Т.В., Аноятбеков М.**  
Выявление специфических антител классов G и M к вирусу лейкоза крупного рогатого скота  
в сыворотках крови . . . . . 173

**Нефедченко А.В., Южаков А.Г., Котенева С.В., Глотова Т.И., Глотов А.Г., Забережный А.Д.**  
Выявление ДНК герпесвируса четвертого типа у крупного рогатого скота  
при помощи ПЦР в режиме реального времени . . . . . 178

**Карамендин К.О., Саятов М.Х., Кыдырманов А.И., Касымбеков Е.Т., Асанова С.Е.,  
Даулбаева К.Д., Хан Е.Я.**  
Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Avian avulavirus* 20, выделенных от диких птиц. . . . . 185

**Мазлум Али, Жуков И.Ю., Аронова Е.В., Иголкин А.С., Власова Н.Н.**  
Особенности репликации вируса африканской чумы свиней в присутствии  
рекомбинантных белков CD2v, рХ69R и рЕ248R . . . . . 193

---

## CONTENTS

### REVIEWS

- Zamarina T.V., Khrapova N.P., Pimenova E.V., Khanani E.I., Viktorov D.V., Toporkov A.V.**  
Zika fever immunodiagnosics: overview of test systems . . . . . 150

### ORIGINAL RESEARCH

- Latyshev O.E., Eliseeva O.V., Kostina L.V., Alekseev K.P., Khametova K.M., Altaeva E.G., Verkhovsky O.A., Aliper T.I., Grebennikova T.V.**  
Assessment of immunogenic activity of the cloned human rotavirus A WA strain. . . . . 156

- Narovlyansky A.N., Mezentseva M.V., Suetina I.A., Russu L.I., Ivanova A.M., Poloskov V.V., Izmest'eva A.V., Ospelnikova T.P., Sarymsakov A.A., Ershov F.I.**  
Cytokine-regulating activity of anti-virus preparation CelAgripus in Burkitt's lymphoma stable B-cell lines . . . . . 165

- Gulyukin M. I., Kapustina O.V., Ezdakova I.Yu., Valtsiferova S.V., Stepanova T.V., Anoyatbekov M.**  
Detection of specific antibodies of classes G and M to bovine leukemia virus in the blood serum. . . . . 173

- Nefedchenko A.V., Yuzhakov A.G., Koteneva S.V., Glotova T.I., Glotov A.G., Zaberezhny A.D.**  
Detection of bovine herpesvirus 4 DNA in cattle by realtime PCR. . . . . 178

- Karamendin K.O., Sayatov M.Kh., Kydyrmanov A.I., Kasymbekov E.T., Asanova S.E., Daulbayeva K.D., Khan E.Ya.**  
Molecular-genetic characterization of *Avian avulavirus* 20 strains isolated from wild birds . . . . . 185

- Mazloun Ali, Zhukov I.U., Aronova E.B., Igolkin A.S., Vlasova N.N.**  
ASF virus replication features in the presence of recombinant proteins CD2v, pX69R and pE248R . . . . . 193

---

## ОБЗОРЫ

---

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Замарина Т.В., Храпова Н.П., Пименова Е.В., Ханани Е.И., Викторов Д.В., Топорков А.В.

### ИММУНОДИАГНОСТИКА ЛИХОРАДКИ ЗИКА: ОБЗОР ПРОИЗВОДИМЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 400131, г. Волгоград, Россия

Угроза быстрого распространения вируса Зика вследствие его завоза с территории эндемичных регионов дала импульс к интенсификации исследований эпидемиологии лихорадки Зика и её клинических проявлений, а также к созданию средств диагностики и профилактики данного заболевания. С 2013 по 2017 г. в России выявлено 18 случаев завоза инфекции туристами. Созданный на базе ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора референс-центр по мониторингу за лихорадкой Зика осуществляет консультативно-методическую помощь по вопросам лабораторной диагностики и мониторинга лихорадки, вызванной вирусом Зика. В связи с этим были изучены данные литературы о коммерчески доступных тест-системах для иммунодиагностики данной инфекции. В настоящее время для иммунодиагностики лихорадки Зика разработан ряд тест-систем для твердофазного иммуноферментного анализа, иммунохроматографии и метода флюоресцирующих антител. Компания Euroimmun (Германия) – пока единственный производитель, у которого имеются подробные данные по валидации специфичности производимых диагностических наборов. В независимых исследованиях подтверждено, что тест-системы Euroimmun обладают высокой специфичностью и чувствительностью. Это доказано при исследовании материала от различных групп населения, в том числе европейцев, посетивших эндемичные территории, а также жителей регионов, где циркулирует вирус Зика. Приведённые подробные характеристики тест-систем для иммунодиагностики лихорадки Зика компании Euroimmun позволяют сделать вывод о целесообразности их использования для обеспечения санитарной охраны территории РФ в рамках оперативной работы по выявлению антител у больных, предположительно инфицированных вирусом Зика.

**Ключевые слова:** вирус Зика; диагностика; иммуноферментный анализ; специфичность; чувствительность; обзор.

**Для цитирования:** Замарина Т.В., Храпова Н.П., Пименова Е.В., Ханани Е.И., Викторов Д.В., Топорков А.В. Иммунодиагностика лихорадки Зика: обзор производимых тест-систем. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(4): 150-155.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-150-155>

#### Информация об авторах:

Замарина Т.В., <https://orcid.org/0000-0002-2965-0555>  
Храпова Н.П., <https://orcid.org/0000-0002-9782-6866>  
Пименова Е.В., <https://orcid.org/0000-0002-8632-203X>  
Ханани Е.И., <https://orcid.org/0000-0002-1994-9350>  
Викторов Д.В., <https://orcid.org/0000-0002-2722-7948>  
Топорков А.В., <https://orcid.org/0000-0002-3449-4657>

**Для корреспонденции:** Замарина Татьяна Валерьевна, старший научный сотрудник лаборатории иммунодиагностики ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 400131, г. Волгоград. E-mail: [vari2@sprint-v.com.ru](mailto:vari2@sprint-v.com.ru)

Zamarina T.V., Khrapova N.P., Pimenova E.V., Khanani E.I., Viktorov D.V., Toporkov A.V.

#### ZIKA FEVER IMMUNODIAGNOSTICS: OVERVIEW OF TEST SYSTEMS

Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, 400131, Russian Federation

The threat of rapid spread of Zika virus beyond endemic regions has given rise to more research in field of epidemiology and clinic, as well as to the search for Zika fever new diagnostic and preventive tools. Between 2013 and 2017 in Russia 18 cases of infection transmission by travellers were reported. Fever Zika reference monitoring center in Volgograd Research Anti-Plague Institute (Volgograd, Russian Federation) provides counseling and methodological assistance on laboratory diagnosis and monitoring of Zika fever. In this regard, a literature review of commercial test systems for immunodiagnosics of this infection was performed. Currently, a number of test systems for solid-phase enzyme-linked immunoassay method (ELISA), immunochromatography and indirect immunofluorescent method (IIFT) have been developed for immunodiagnosics of Zika fever. Euroimmun Ltd. remains the only manufacturer that has access to detailed information on validation of the specificity of the produced diagnostic kits. Independent studies confirm that Euroimmun test systems have high specificity and high sensitivity, which is proved by the study of the material from various populations, including Europeans travelling to Zika virus endemic regions and people residing in these regions. A detailed overview of characteristics of Euroimmun test systems for immunodiagnosics of Zika fever allows us to conclude that there is a rationale for the use of these test systems for Russian Federation sanitary protection by identification of antibodies in patients, presumably infected with the Zika virus.

**Keywords:** Zika virus; diagnostics; ELISA; specificity; sensitivity; overview; review.

**For citation:** Zamarina T.V., Khrapova N.P., Pimenova E.V., Khanani E.I., Viktorov D.V., Toporkov A.V. Zika fever immunodiagnosics: overview of test systems. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(4): 150-155. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-150-155>

**For correspondence:** Tatyana V. Zamarina, Senior fellow in the Laboratory of immudiagnosics, Volgograd Research Anti-Plague Institute, Volgograd, 400131, Russian Federation. E-mail: [vari2@sprint-v.com.ru](mailto:vari2@sprint-v.com.ru)

**Information about authors:**

Zamarina T.V., <https://orcid.org/0000-0002-2965-0555>  
Khrapova N.P., <https://orcid.org/0000-0002-9782-6866>  
Pimenova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-8632-203X>  
Khanani E.I., <https://orcid.org/0000-0002-1994-9350>  
Viktorov D.V., <https://orcid.org/0000-0002-2722-7948>  
Toporkov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-3449-4657>

**Acknowledgment.** This work was supported by Federal budget of Russia.

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

Received 22 May 2019

Accepted 11 June 2019

Повсеместное распространение арбовирусных инфекций, а также недостаточная изученность их эпидемиологии, клинических проявлений, профилактики и лабораторной диагностики привлекают всё большее внимание исследователей. К основным направлениям исследований относится совершенствование диагностики заболеваний, вызванных арбовирусами.

Крупнейшая за всю историю вспышка лихорадки Зика была зарегистрирована в Южной и Центральной Америке в 2015–2016 гг. За этот период были накоплены новые знания в области эпидемиологии и клиники, а также разработан и апробирован ряд средств для лабораторной диагностики и профилактики данной вирусной инфекции. Для детекции РНК вируса Зика на сегодняшний день коммерчески доступно несколько генодиагностических наборов зарубежного производства и одна отечественная тест-система, предназначенная для качественного определения РНК вируса Зика в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Рынок иммунодиагностических тест-систем для обнаружения антител к вирусу Зика не насыщен, несмотря на то, что спрос на них достаточно высок. Трудности при конструировании тест-систем для серодиагностики лихорадки Зика связаны с перекрёстной реактивностью между антителами к гетерологичным флавивирусам. В настоящее время компания Euroimmun (Германия) является единственным производителем, который предоставляет подробные данные валидации производимых диагностических наборов и сообщает об их высокой специфичности [1].

Наблюдается быстрое распространение вируса Зика за пределы эндемичных регионов. В России с 2013 по 2017 г. было выявлено 18 случаев этой инфекции, из них в 4 случаях диагноз подтверждён ретроспективно. Все случаи были завозными и связаны с посещением популярных туристических направлений, таких как Доминиканская Республика, Мексика, Индия, Таиланд, Колумбия и Китай [2].

В связи с вышеизложенным был создан референс-центр по мониторингу за возбудителем лихорадки Зика. На него возложены функции по анализу эпидемиологических рисков, состояния лабораторной диагностики и мониторинга лихорадки Зика, оказанию консультативно-методической помощи органам и организациям Роспотребнадзора, медицинским организациям (приказ Федеральной службы по надзору

в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 1.12.2017 № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации»).

Лабораторная диагностика лихорадки Зика включает серологические методы, выделение (изоляция) вируса, детекцию вирусной РНК методом ПЦР в обратной транскрипции [3]. Диагностический алгоритм исследования биологического материала (сыворотки крови, цельной крови, спинномозговой жидкости, мочи, спермы, слюны, амниотической жидкости), подозрительного на присутствие вируса Зика и антител к нему, предложенный National Center for Infectious Diseases, CDC (Атланта, США), учитывает время, прошедшее с начала клинических признаков вирусной инфекции [4]. Детекция вирусной РНК в сыворотке крови больного наиболее эффективна в 1-ю неделю после начала клинических проявлений болезни. Специфические антитела определяются в течение продолжительного времени и могут быть обнаружены как в остром периоде, так и в период реконвалесценции. Приблизительно с 5-го дня от начала заболевания начинают регистрироваться IgA и IgM. Через 2-3 дня после появления IgA и IgM в крови начинают определяться IgG. Однако необходимо учитывать, что все классы антител могут одновременно появляться в организме человека, что составляет определённые трудности при точной постановке диагноза [5–8].

Антитела могут быть обнаружены с помощью таких базовых тестов, как метод непрямой иммунофлюоресценции и твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) [1].

При интерпретации результатов иммунодиагностических тестов необходимо принимать во внимание структурную схожесть флавивирусов, что может быть причиной кросс-реактивности антител, которые образуются в случае перенесённой в анамнезе инфекции, вызванной одним из гетерологичных флавивирусов, или вследствие вакцинации против этой группы вирусов.

В настоящее время для иммунодиагностики лихорадки Зика разработан ряд тест-систем, которые приведены в табл. 1. Диагностические тест-системы созданы для твердофазного ИФА, метода иммунохроматографии, метода флюоресцирующих антител.

В иммуноферментных тест-системах для обна-

Средства иммунодиагностики лихорадки Зика

Название набора реагентов, производитель	Уровень внедрения
<i>Зарубежные иммунодиагностические наборы</i>	
Тест-система для определения антител к вирусу Зика методом иммуноферментного анализа	
Zika Virus IgM (ZV-IgM), ELISA Kit (Mybiosource, США)	Не зарегистрирован, применяется только в исследовательских целях
Anti-Zika Virus ELISA (IgA or IgG or IgM or IgAM) (Euroimmun, Германия)	Зарегистрирован за рубежом, не зарегистрирован на территории РФ, набор доступен для продажи
ZIKV Detect™ NS1 ELISA (Inbios, США)	не зарегистрирован, применяется только в исследовательских целях
ZIKV-DENV-CHIKV IFA IgG, IgM (Vircell, Испания)	Не зарегистрирован, применяется только в исследовательских целях
Zika IgG/IgM Antibodies, Dengue IgG/IgM antibodies & NS1 Antigen and Chikungunya IgG/IgM Antibodies (Biocan, Канада)	Не зарегистрирован, применяется только в исследовательских целях
Zika Virus Antibody (IgM), MAC-ELISA (Quest Diagnostics, США)	не зарегистрирован, только в исследовательских целях
<i>Иммунохроматографический тест</i>	
Tell Me Fast Zika IgG/IgM Rapid Test (Biocan, Канада)	Не зарегистрирован, применяется только в исследовательских целях
<i>Определение антител к вирусу методом флюоресцирующих антител</i>	
Anti-Zika Virus IIFT (IgG, IgM) (Euroimmun, Германия)	Зарегистрирован за рубежом, не зарегистрирован на территории РФ, набор доступен для продажи
Набор для исследования кросс-реактивности среди флавивирусов Arbovirus Profile 3 (IgG, IgM) (Euroimmun, Германия)	Зарегистрирован за рубежом, не зарегистрирован на территории РФ, доступен для продажи
Набор для дифференциальной диагностики лихорадок денге, чикунгуны, Зика – IIFT Arbovirus Fever Mosaic 2 (IgG, IgM) (Euroimmun, Германия)	Зарегистрирован за рубежом, не зарегистрирован на территории РФ, доступен для продажи
<i>Отечественные иммунодиагностические наборы</i>	
Набор реагентов для дифференциального определения IgM-антител к вирусам Зика, денге, Западного Нила и чикунгуны в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа «ИФА-IgM Зика, денге, ЗН, Чик» (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, Россия)	Зарегистрирован на территории РФ, РЗН 2018/7810

ружения IgG и IgM к вирусу Зика производства MyBioSource Inc. (США) используется сэндвич-вариант метода с двойным антигеном, иммобилизованным на твёрдой фазе. Производитель не предоставляет никакой информации о типе используемых антигенов или о специфичности и чувствительности производимых наборов. Biocan Diagnostics Inc. (Канада) предлагает быстрый тест на основе смеси белка NS1 и белка оболочки вируса Зика, который позволяет обнаружить антитела IgM и IgG в капиллярной крови. Компания утверждает, что специфичность составляет 99%, но никаких подробных данных о валидации разработанных тест-систем не предоставляет. Euroimmun (Германия) предлагает тест-системы как для иммунофлюоресцентного анализа, так и для иммуноферментного анализа для определения антител обоих классов IgM и IgG к вирусу Зика. Иммунофлюоресцентный анализ предназначен для совместного обнаружения вируса Зика, вируса чикунгуны и 4 серотипов вируса денге. Тест-система для иммуноферментного анализа сконструирована с использованием рекомбинантного белка NS1, что приводит к снижению перекрёстной реактивности с антителами к гетерологичным флавивирусам до максимальных

значений. Euroimmun в настоящее время является единственным производителем, предоставляющим подробные данные валидации производимых диагностических наборов, которые чётко решают вышеупомянутые трудности с перекрёстной реактивностью при серодиагностике флавивирусных инфекций [7]. Однако существует значимое ограничение для их использования в практике отечественных лабораторий – ни одна зарубежная тест-система не зарегистрирована на территории РФ. Специалистами НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи был разработан и зарегистрирован набор реагентов для дифференциального определения IgM-антител к вирусам Зика, денге, Западного Нила и чикунгуны в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа «ИФА-IgM Зика, денге, ЗН, Чик» (РЗН 2018/7810, 28.11.2018). Однако в настоящий момент в литературе нет подробных данных о чувствительности и специфичности этого набора.

Подробное рассмотрение тест-систем Euroimmun позволит сделать вывод об их пригодности для обеспечения санитарной охраны территории РФ в рамках оперативной работы по выявлению антител у больных, предположительно инфицированных вирусом Зика.

Для твердофазного ИФА компаниями Euroimmun разработаны наборы для определения в сыворотке крови человека 3 классов иммуноглобулинов: Anti-Zika Virus ELISA (IgA or IgG or IgM or IgAM). Компания-производитель представила подробные данные о чувствительности и специфичности тест-систем [8]. Учёные исследовали сыворотки крови от 38 жителей Доминиканской Республики и Колумбии с положительными результатами ПЦР на вирус Зика. Определяли антитела в сыворотках крови обследованных, у которых симптомы наблюдались более 5 дней. Другой группой лиц стали европейцы (жители Германии), прибывшие из эндемичных регионов, в крови которых прямым методом был обнаружен вирус денге (референтная группа). Образцы из двух панелей (колумбийской и европейской) исследовали наборами Anti-Zika Virus ELISA (IgG) и Anti-Zika Virus ELISA (IgM) для определения их чувствительности и специфичности. Чувствительность набора Anti-Zika Virus ELISA (IgG) была 100% в обеих панелях, а Anti-Zika Virus ELISA (IgM) – 27% (колумбийская панель) и 87% (европейская панель). Специфичность во всех случаях была высокой (97%).

Описанные выше данные вызывают ряд вопросов. Во-первых, для того вывода о специфичности и чувствительности тест-систем исследователи взяли недостаточное количество пациентов, такая выборка не является репрезентативной, нет данных о возрасте и иммунном статусе пациентов обеих групп. Во-вторых, необходимо объяснить причины резкого расхождения показателей чувствительности наборов для Anti-Zika Virus ELISA (IgG) и Anti-Zika Virus ELISA (IgM) в Колумбийской группе (100 и 27% соответственно). По приведённым данным, в сыворотках крови референтной группы обнаруживали антитела к вирусу Зика, при этом авторы сообщают о 100% специфичности. Таким образом, необходим более глубокий анализ диагностической чувствительности и специфичности каждого набора, а также их способности давать устойчиво стабильный результат при тестировании референтных образцов.

Специфичность иммуноферментных наборов была оценена в реакции с 72 образцами крови пациентов, серопозитивными на ревматоидный фактор и различные аутоантитела, а также с 22 пробами от пациентов с острой инфекцией, вызванной вирусом Эпштейна–Барр. Диагностический набор Anti-Zika Virus ELISA для определения IgG обладал 100% специфичностью (не давал ложноположительных результатов со всеми 94 образцами), IgA – 99% (93 сыворотки из 94 были отрицательными), IgM – 96% (детектировал ложное наличие антител в 4 сыворотках из 94) [9].

В Университетской клинике Freiburg и Институте тропической медицины им. Бернхарда Нохта (Германия) были проведены исследования специфичности тест-систем производства Euroimmun (IgG и IgM). В работе использовали сыворотки крови европейцев с острой формой инфекции или вакцинированных от инфекций, вызванных вирусами, которые потенциально могли бы иметь кросс-реактивность с вирусом

Зика: вирус клещевого энцефалита (31 человек), вирус денге (26), вирус жёлтой лихорадки (15), вирус гепатита С (16). Все сыворотки содержали высокие титры IgM (при острой форме инфекции) или IgG (после вакцинации) к какому-либо из вышеперечисленных вирусов. В качестве положительного контрольного образца использовали сыворотки крови жителей Германии, инфицированных вирусом Зика в Бразилии. Данные сыворотки были протестированы дважды – через 3 дня и через год после начала болезни. Результаты продемонстрировали 100% специфичность для набора Anti-Zika Virus ELISA (IgG) и 98% для Anti-Zika Virus ELISA (IgM). Кросс-реактивными в опытах с набором Anti-Zika Virus ELISA (IgM) оказались поликлональные сыворотки крови беременных, содержащие IgM к *Mycoplasma pneumoniae*, ЦМВ, ВИЧ (в тестировании набора Anti-Zika Virus ELISA (IgG) эти сыворотки не применяли) [9].

W. Vogena и соавт. провели исследование образцов крови здоровых доноров, жителей Западной Австрии (Тироль), которые в прошлом посещали эндемичные территории или были вакцинированы против различных флавивирусов, на наличие антител к вирусу лихорадки Зика с помощью тест-систем Euroimmun. Антитела к вирусу Зика IgM были обнаружены у 3 (0,03%) доноров из 1001, а IgG – у 1 (0,01%) донора из 1001. При этом ПЦР и реакция нейтрализации вируса были отрицательны во всех случаях. Исследователи отметили, что тест-системы Euroimmun надёжны и удобны в работе, а также пригодны для обследования сывороток крови людей, перенесших вакцинацию от гетерологичных флавивирусных инфекций [10].

Таким образом, в независимых исследованиях подтверждено, что тест-системы Anti-Zika Virus ELISA для определения IgA, IgG, IgM обладают высокой специфичностью и чувствительностью, что доказано при исследовании материала от различных групп населения, в том числе европейцев, посетивших эндемичные территории, а также жителей регионов, где циркулирует вирус Зика.

Выраженная кросс-реактивность сывороток больных лихорадкой Зика в отношении родственных флавивирусов (денге, Западного Нила, жёлтой лихорадки, японского энцефалита и др.) создаёт существенные трудности при серодиагностике лихорадки Зика. Также необходимо дифференцировать лихорадку Зика от лихорадок, которые циркулируют с ней на одной территории, в частности от лихорадки чикунгунья [11, 12]. Дифференциальное определение антител с использованием ИФА необходимо проводить как в случае первичной инфекции, вызванной вирусом Зика, так и при вторичной инфекции, которая развивается на фоне наличия анамнестических или поствакцинальных антител к гетерологичным флавивирусам [1]. Были проанализированы сыворотки от пациентов с клинически и серологически подтверждёнными инфекциями, вызванными вирусами денге, клещевого энцефалита, японского энцефалита, Западного Нила, а также образцы сывороток крови вакцинированных людей (всего более 450 образцов). Результаты представлены в табл. 2.

Результаты исследования специфичности тест-систем Anti-Zika Virus ELISA для определения IgA, IgG, IgM

Гетерологичный вирус	Положительный результат в реакции с набором Anti-Zika Virus Elisa					
	количество проб	IgA, %	количество проб	IgG, %	количество проб	IgM, %
<i>Вирус денге</i>						
РНК вируса + и/или АГ NS1 +	88	0	104	0	103	0
Клинически и серологически подтверждён диагноз	10	10 (в одном образце)	42	2,4 (в одном образце)	42	0
<i>Вирус клещевого энцефалита</i>						
После вакцинации	15	0	135	0	134	0
Клинически и серологически подтверждён диагноз	54	0	18	0	18	0
<i>Вирус жёлтой лихорадки</i>						
После вакцинации (положительный тест нейтрализации)	12	0	12	0	12	0
<i>Вирус японского энцефалита</i>						
Клинически и серологически подтверждён диагноз	13	0	25	4	25	0
<i>Вирус лихорадки Западного Нила</i>						
РНК вируса (положительная ПЦР)	40	2,5 (в одном образце)	40	0	40	0
Клинически и серологически подтверждён диагноз + положительный тест нейтрализации	16	0	32	0	34	2,9 (в одном образце)

Данные, представленные в табл. 2, свидетельствуют о том, что тест-системы Anti-Zika Virus ELISA для определения IgA, IgG, IgM производства Euroimmun обладают высокой специфичностью к вирусу Зика, в большинстве случаев перекрёстная иммунореактивность сывороток больных в отношении перечисленных вирусов детектировалась максимум у одного пациента из всей выборки либо была равна нулю [8]. Компания Euroimmun заявляет, что высокую специфичность обеспечивает использование высокоспецифичного рекомбинантного протеина в качестве антигена захвата при изготовлении иммуноферментных тест-систем [13].

Особое внимание необходимо уделить вопросу кросс-реактивности вируса Зика и вируса жёлтой лихорадки. Эндемичными по жёлтой лихорадке являются территории 32 стран Африки и 12 стран Южной Америки, при въезде в них требуется международное свидетельство о вакцинации против жёлтой лихорадки для путешественников [14, письмо Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 10.02.2016 № 01/1460-16-32 «О профилактике жёлтой лихорадки»]. Профилактическая вакцинация является единственным и самым надёжным средством предупреждения данного заболевания. В Москве от жёлтой лихорадки ежегодно вакцинируют около 5000 граждан [15].

В табл. 2 представлены данные о том, что с помощью трёх вышеназванных иммуноферментных тест-систем Euroimmun были обследованы 36 человек, вакцинированных против жёлтой лихорадки (по 12 человек каждой тест-системой). В каждой группе кросс-реактивность не была зафиксирована ни

в одном случае. Таким образом, наборы Euroimmun пригодны для обследования лиц, вакцинированных от жёлтой лихорадки.

Для метода флюоресцирующих антител было разработано 3 различных набора реагентов: Anti-Zika Virus IIFT (IgG or IgM), набор для исследования кросс-реактивности среди флавивирусов Arbovirus Profile 3 (IgG or IgM), набор для дифференциальной диагностики лихорадок денге, чикунгунья, Зика IIFT Arbovirus Fever Mosaic 2 (IgG or IgM). В данных наборах в качестве антигена на поверхности слайда используются целые вирусные частицы, в отличие от иммуноферментных тест-систем, что существенно увеличивает вероятность кросс-реактивности [8].

Таким образом, приведённые подробные характеристики тест-систем для иммунодиагностики лихорадки Зика Euroimmun позволяют сделать вывод о целесообразности их использования для обеспечения санитарной охраны территории РФ при выполнении мероприятий, направленных как на предупреждение, так и на ликвидацию неблагоприятных медико-санитарных и санитарно-эпидемиологических последствий чрезвычайных ситуаций. Однако для их использования на территории РФ необходимо провести общепринятые испытания.

С помощью тест-систем, разработанных компанией Euroimmun, возможно определение как острой фазы инфекции (в большинстве случаев начиная с 5-го дня после появления симптомов), так и факт ранее перенесённой инфекции, что не только важно для оценки клинической картины, но и даёт возможность для более тщательного и подробного эпидемиологического анализа. Разработанный в НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи

отечественный набор для обнаружения IgM антител к вирусу Зика является единственным зарегистрированным средством иммунодиагностики лихорадки Зика на территории РФ. Подробное изучение свойств этой тест-системы позволит сделать выбор наиболее эффективного средства для серологической диагностики лихорадки, вызванной вирусом Зика.

**Финансирование.** Данная работа выполнена при финансировании из федерального бюджета.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 4-13 см. REFERENCES)

1. Попова А.Ю., Топорков А.В., ред. *Лихорадка Зика: эпидемиология, клиника, лабораторная диагностика и меры профилактики: Практическое руководство*. Волгоград: Волга-Пресс; 2016.
2. Карань Л.С. Молекулярные методы в диагностике ряда инфекционных заболеваний: традиции и инновации. Available at: <https://docplayer.ru/68301036-Molekulyarnye-metody-v-diagnostike-ryada-infekcionnyh-zabolevaniy-tradicii-i-innovacii-karan-l-s-fbun-cnii-epidemiologii-2017.html>
3. Попова А.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Топорков А.В., Викторов Д.В., Смелянский В.П. и др. Лихорадка Зика: состояние проблемы на современном этапе. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; (1): 5-12. Doi: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-1-5-12>
14. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. О желтой лихорадке в Нигерии. Available at: [http://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news\\_details.php?ELEMENT\\_ID=10281](http://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=10281)
15. Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по городу Москве. Профилактика желтой лихорадки. Available at: <http://77.rospotrebnadzor.ru/index.php/san-epid/40-2009-08-20-06-08-14/4872-2017-01-26-14-41-59>

#### REFERENCES

1. Popova A.Yu., Toporkov A.V., eds. *Zika Fever: Epidemiology, Clinic, Laboratory Diagnostics and Preventive Measures: A Practical Guide [Likhoradka Zika: epidemiologiya, klinika, laboratornaya diagnostika i mery profilaktiki: Prakticheskoe rukovodstvo]*. Volgograd: Volga-Press; 2016. (in Russian)
2. Karan' L.S. *Molecular Methods in the Diagnosis of a Number of Infectious Diseases: Traditions and Innovations [Molekulyarnye metody v diagnostike ryada infekcionnykh zabolevaniy: traditsii i innovatsii]*. Available at: <https://docplayer.ru/68301036-Molekulyarnye-metody-v-diagnostike-ryada-infekcionnyh-zabolevaniy-tradicii-i-innovacii-karan-l-s-fbun-cnii-epidemiologii-2017.html> (in Russian)
3. Popova A.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Toporkov A.V., Viktorov D.V., Smelyanskiy V.P., et al. Zika fever: the state of the problem at the present stage. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2016; (1): 5-12.

4. Doi: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-1-5-12> (in Russian) Centers for Disease Control and Prevention. Diagnostic Tests for Zika Virus. Available at: <https://www.cdc.gov/zika/hc-providers/types-of-tests.html>
5. Charrel R., Leparc-Goffart I., Pas S., de Lamballerie X., Koopmans M., Reusken C. State of knowledge on Zika virus for an adequate laboratory response. Available at: [https://www.researchgate.net/publication/293950559\\_State\\_of\\_knowledge\\_on\\_Zika\\_virus\\_for\\_an\\_adequate\\_laboratory\\_response](https://www.researchgate.net/publication/293950559_State_of_knowledge_on_Zika_virus_for_an_adequate_laboratory_response)
6. Calleri G., Burdino E., Bonora S., Raso R. Zika virus infection in two travelers returning from an epidemic area to Italy, 2016: Algorithm for diagnosis and recommendations. *Travel Med. Infect. Dis.* 2016; 14(5): 506-8. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.07.001>
7. Charrel R., Leparc-Goffart I., Pas S., de Lamballerie X., Koopmans M., Reusken C. Background review for diagnostic test development for Zika virus infection. *Bull. World Health Organ.* 2016; 94(8): 574-84. Doi: <https://doi.org/10.2471/BLT.16.171207>
8. Zika virus infections. Euroimmun test systems for the diagnosis of Zika virus infections. Available at: [http://www.euroimmun.com/documents/Indications/Infections/Zika-virus/HI\\_2668\\_I\\_UK\\_B.pdf](http://www.euroimmun.com/documents/Indications/Infections/Zika-virus/HI_2668_I_UK_B.pdf)
9. Huzly D., Hanselmann I., Schmidt-Chanasit J., Panning M. High specificity of a novel Zika virus ELISA in European patients after exposure to different flaviviruses. *Euro Surveill.* 2016; 21(16). Doi: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.16.30203>
10. Borena W., Hofer T., Stiasny K., Aberle S.W., Gaber M., von Laer D., et al. No molecular or serological evidence of Zikavirus infection among healthy blood donors living in or travelling to regions where Aedes albopictus circulates. *PLoS One.* 2017; 12(5): e0178175. Doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0178175>
11. Lanciotti R.S., Kosoy O.L., Laven J.J., Velez J.O., Lambert A.J., Johnson A.J., et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(8): 1232-9. Doi: <http://dx.doi.org/10.3201/eid1408.080287>
12. Serological diagnosis of Zika virus infections. Press release. Luebeck, Germany: Euroimmun; 2016. Available at: <https://www.euroimmun.com/index.php?eID=dumpFile&t=f&f=3013&token=6cc0bb2eb7c10f484ae50ad91e69cd6424088529>
13. Steinhagen K., Probst C., Radzinski C., Schmidt-Chanasit J., Emmerich P., van Esbroeck M., et al. Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016. *Euro Surveill.* 2016; 21(50). Doi: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.50.30426>
14. Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare. Yellow fever in Nigeria. Available at: [http://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news\\_details.php?ELEMENT\\_ID=10281](http://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=10281) (in Russian)
15. Office of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing in the City of Moscow. Prevention of yellow fever. Available at: <http://77.rospotrebnadzor.ru/index.php/san-epid/40-2009-08-20-06-08-14/4872-2017-01-26-14-41-59> (in Russian)

Поступила 22.05.19

Принята в печать 11.06.19

---

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

---

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Латышев О.Е.<sup>1</sup>, Елисеева О.В.<sup>1</sup>, Костина Л.В.<sup>1</sup>, Алексеев К.П.<sup>1</sup>, Хаметова К.М.<sup>1</sup>,  
Алтаева Е.Г.<sup>2</sup>, Верховский О.А.<sup>2</sup>, Алипер Т.И.<sup>1</sup>, Гребенникова Т.В.<sup>1,3</sup>

### ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ КЛОНИРОВАННОГО ШТАММА WA РОТАВИРУСА А ЧЕЛОВЕКА

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

<sup>2</sup>АНО «Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных», 123098, г. Москва, Россия;

<sup>3</sup>Российский университет дружбы народов, 117198, Москва, Россия

---

**Введение.** Ротавирусная инфекция (РВИ), этиологическим агентом которой является дцРНК-содержащий вирус рода *Rotavirus* семейства *Reoviridae*, относящийся к группе А (РВА), служит причиной тяжёлых диарей у человека и различных видов млекопитающих. Вакцинопрофилактика – наиболее эффективный способ снижения уровня заболеваемости РВИ. В настоящее время экспериментально доказана эффективность использования поросят-гнотобиотов в качестве универсальной модели для воспроизведения РВИ человека и оценки качества вакцинных препаратов против РВИ.

**Цели и задачи.** Оценка иммуногенной активности клонированного штамма Wa РВА в опыте на новорождённых поросятах вьетнамской вислобрюхой породы.

**Материал и методы.** Получение клонированного штамма Wa РВА человека, rVP6 РВА человека. Иммуноферментный анализ и полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией для выявления РВА человека. Иммунизация и экспериментальное заражение новорождённых поросят.

**Результаты.** В статье представлены результаты опыта по двукратной иммунизации новорождённых поросят препаратами нативного вируса с инфекционной активностью 5,5 lg ТЦИД<sub>50</sub>/мл в дозе 3 см<sup>3</sup>, HRV с адьювантом в дозе 500 мкг и плацебо (контроль) с последующим экспериментальным заражением всех животных вирусом вирулентного штамма Wa G1P[8] РВА человека с инфекционной активностью 5,5 lg ТЦИД<sub>50</sub>/мл в дозе 5 см<sup>3</sup>. Клинические признаки болезни и гибель наблюдали только у контрольных животных. Разработан метод детекции РНК РВА с помощью ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в ректальных смывах, пробах тонкого отдела кишечника и периферических лимфатических узлах. На основе полученного rVP6 РВА человека разработан метод выявления специфических IgG-антител к РВА с помощью иммуноферментного анализа (ИФА), и приведены результаты выявления РВА в сыворотке крови подопытных поросят.

**Заключение.** В ходе проведённых исследований установлена высокая иммуногенная активность нативного и очищенного вируса клонированного штамма Wa РВА и подтверждена возможность его применения в качестве основного компонента вакцины против РВИ. Показана возможность использования конвенционных новорождённых поросят вместо поросят-гнотобиотов в качестве опытной модели.

**Ключевые слова:** ротавирус А; рекомбинантный белок VP6; иммунизация; заражение; ОТ-ПЦР; иммуноферментный анализ; новорожденные поросята.

**Для цитирования:** Латышев О.Е., Елисеева О.В., Костина Л.В., Алексеев К.П., Хаметова К.М., Алтаева Е.Г., Верховский О.А., Алипер Т.И., Гребенникова Т.В. Оценка иммуногенной активности клонированного штамма WA ротавируса А человека. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(4): 156-164.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-156-164>

#### Информация об авторах:

Латышев О.Е., <https://orcid.org/0000-0002-5757-3809>

Елисеева О.В., <https://orcid.org/0000-0002-0723-9749>

Костина Л.В., <https://orcid.org/0000-0002-9556-1454>

Алексеев К.П., <https://orcid.org/0000-0001-9536-3127>

Хаметова К.М., <https://orcid.org/0000-0002-8461-600X>

Алтаева Е.Г., <https://orcid.org/0000-0001-7188-1704>

Верховский О.А., <https://orcid.org/0000-0003-0784-9341>

Алипер Т.И., <https://orcid.org/0000-0002-5876-2425>

Гребенникова Т.В., <https://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

**Для корреспонденции:** Латышев Олег Евгеньевич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: [oleglat80@mail.ru](mailto:oleglat80@mail.ru)

Latyshev O.E.<sup>1</sup>, Eliseeva O.V.<sup>1</sup>, Kostina L.V.<sup>1</sup>, Alekseev K.P.<sup>1</sup>, Khametova K.M.<sup>1</sup>, Altaeva E.G.<sup>2</sup>, Verkhovsky O.A.<sup>2</sup>, Aliper T.I.<sup>1</sup>, Grebennikova T.V.<sup>1,3</sup>

### ASSESSMENT OF IMMUNOGENIC ACTIVITY OF THE CLONED HUMAN ROTAVIRUS A WA STRAIN

<sup>1</sup>National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation;

<sup>2</sup>Diagnostics and Prevention Research Institute for Human and Animal Diseases, Moscow, 123098, Russian Federation;

<sup>3</sup>Peoples Friendship University of Russia, Moscow, 117198, Russian Federation

**Introduction.** Rotavirus infection (RVI) caused by the dsRNA-containing virus from genus Rotavirus, Reoviridae family, belonging to group A (RVA), is the cause of severe diarrhea in human and other mammalian species. Vaccination is the most effective way to reduce the incidence of RVI. At present, the effectiveness of using gnotobiotic piglets as a universal model for reproducing human rotavirus infection and assessing the quality of RVI vaccine preparations has been experimentally proven.

**Goals and objectives.** Evaluation of immunogenic activity of the cloned RVA Wa strain in the new-born Vietnamese pot-bellied piglets trial.

**Material and methods.** Development of viral preparations of the cloned human Wa strain PBA, development of human RVA rVP6, ELISA, polymerase chain reaction with reverse transcription, immunization and experimental infection of newborn piglets.

**Results.** The article presents the results of the experiment on double immunization of newborn piglets with native virus preparations with the infection activity 5.5 lg TCID<sub>50</sub>/ml, 3 cm<sup>3</sup> per dose, HRV with adjuvant 500 µg per dose and mock preparation (control group) followed with experimental inoculation of all animals with virulent virus strain Wa G1P[8] human RVA with infectious activity of 5.5 lg TCID<sub>50</sub>/ml in 5 cm<sup>3</sup> dose. Development of clinical signs of disease and animal death were observed only in control group. RT-PCR system to detect RVA RNA in rectal swabs, samples of small intestine and peripheral lymph nodes was developed. ELISA based on obtained human RVA rVP6 was developed and results on RVA-specific IgG-antibodies in serum samples of experimental piglets are presented.

**Conclusion.** In the course of the research, a high immunogenic activity of the native and purified virus of the cloned Wa RVA strain Wa was established and the possibility of its use as the main component of the RVI vaccine was confirmed. The possibility of using conventional newborn pigs instead of gnotobiotic piglets as an experimental model was demonstrated.

**Keywords:** rotavirus A; recombinant VP6 protein; immunization; infection; RT-PCR; ELISA; newborn piglets.

**For citation:** Latyshev O.E., Eliseeva O.V., Kostina L.V., Alekseev K.P., Khametova K.M., Altaeva E.G., Verkhovsky O.A., Aliper T.I., Grebennikova T.V. Assessment of immunogenic activity of the cloned human rotavirus A WA strain. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(4): 156-164. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-156-164>

**For correspondence:** Oleg E. Latyshev, PhD, Senior Scientist, Laboratory of molecular diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: oleglat80@mail.ru

#### Information about authors:

Latyshev O.E., <https://orcid.org/0000-0002-5757-3809>

Eliseeva O.V., <https://orcid.org/0000-0002-0723-9749>

Kostina L.V., <https://orcid.org/0000-0002-9556-1454>

Alekseev K.P., <https://orcid.org/0000-0001-9536-3127>

Khametova K.M., <https://orcid.org/0000-0002-8461-600X>

Altaeva E.G., <https://orcid.org/0000-0001-7188-1704>

Verkhovsky O.A., <https://orcid.org/0000-0003-0784-9341>

Aliper T.I., <https://orcid.org/0000-0002-5876-2425>

Grebennikova T.V., <https://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

**Acknowledgments.** The publication was prepared with the support of the RUDN «5-100».

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

Received 19 August 2019

Accepted 10 October 2019

## Введение

Ротавирусная инфекция (РВИ), этиологическим агентом которой является дцРНК-содержащий вирус рода *Rotavirus* семейства *Reoviridae*, относящийся к группе А (РВА), вызывает болезнь у человека и различных видов млекопитающих. Заболевание характеризуется острым течением, диареей, рвотой, гастроэнтеритом и развитием общего интоксикационного синдрома. РВА имеет основное значение в заболеваемости детей, госпитализированных с синдромом гастроэнтерита [1], и является основным этиологическим фактором повсеместно распространённых и зачастую летальных острых кишечных инфекций. РВА

реплицируются преимущественно в эпителиальных клетках ворсинок тонкого отдела кишечника, вызывая их дегенерацию, некроз и десквамацию [2]. Структурная особенность трёхслойной белковой оболочки вирусных частиц ротавирусов делает их устойчивыми к кислой среде желудка и пищеварительным ферментам кишечника, поэтому РВА является важнейшим энтеропатогеном неонатального периода человека и многих видов животных, включая свиней.

На основе антигенных особенностей белка VP4 и структуры гена VP7 штаммы РВА подразделяют по VP7 на G-типы, а по VP4 – на P-типы. На сегодняшний день известно 32 G-генотипа и 47 P-генотипов РВА,

при этом наиболее распространены в мире 6 G-типов (G1, G2, G3, G4, G9 и G12) и 3 P-типа (P[4], P[6] и P[8]) [3–5]. Эпидемиологическую значимость у человека имеют штаммы РВА, относящиеся к генотипами G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и G12P[8] [6–8]. Кроме того, у людей отмечено глобальное распространение новых, не циркулировавших ранее генотипов РВА, вероятно, животного происхождения, что свидетельствует о межвидовой ресторации вируса [9, 10].

Вакцинопрофилактика является наиболее эффективным способом снижения уровня заболеваемости РВИ и в настоящее время вакцинация против РВИ включена в национальные календари прививок 82 стран мира [11]. На мировом рынке доступны две вакцины, основанные на живых ослабленных штаммах РВА человеческого и/или животного происхождения: моновалентная Rotarix и пентавалентная RotaTeq [12]. Моновалентная аттенуированная вакцина (РВ1) Rotarix (GSK Biologicals, Бельгия) создана на основе ослабленного штамма РВ G1P[8], который является эпидемическим актуальным штаммом в США и во многих других странах. Пятивалентная живая оральная вакцина (РВ5) RotaTeq (Merck and Co., США) содержит 5 реассортантных вирусов, полученных на основе бычьего и человеческих штаммов РВА [13]. Клинические испытания вакцин показали, что эффект вакцинации по предотвращению всех случаев РВИ примерно одинаков. Эффективность РВ1 против тяжёлого ротавирусного гастроэнтерита составила 84, 75 и 57% в странах с низким, средним и высоким уровнем детской смертности соответственно, для РВ5 – 72–96% против всех случаев тяжёлой диареи у детей младшего возраста. В странах с высокой смертностью РВ5 предотвращала 41–57% случаев РВИ [14].

Поскольку к заражению РВА восприимчив не только человек, но и различные виды млекопитающих, то ряд зарубежных исследователей воспроизвели РВИ человека на поросятах-гнотобиотах и экспериментально доказали их эффективность в качестве универсальной модели для оценки качества вакцинных препаратов против РВИ человека [15–18]. Это обусловлено значительным сходством в физиологическом развитии, анатомических аспектах и механизмах формирования системного и местного иммунитета младенцев и новорождённых поросят [19–21]. Благодаря аутбридингу поросята позволяют имитировать разнообразие человеческой популяции, они, как и младенцы, иммунокомпетентны в момент рождения, но иммунологически незрелые [22]. Моделирование инфекции и/или вакцинации на поросятах-гнотобиотах, получивших или не получивших молозиво, т.е. с циркулирующими в кровотоке и присутствующими в кишечнике антителами или же без них, позволяет имитировать сценарии вакцинации детей, получающих смеси либо находящихся на грудном вскармливании [23].

Ранее нами проведены исследования молекулярно-биологических свойств клонированного штамма ротавируса человека Wa РВА, который идентичен актуальному эпидемическому штамму Wa G1P[8] РВА, и

обладает большим потенциалом для дальнейшего использования в качестве вакцинного препарата [15].

**Цель** настоящей работы – оценка иммуногенной активности клонированного штамма Wa РВА в опыте на новорождённых поросятах и изучение возможности использования конвенционных животных для этой цели.

### Материал и методы

**Вирус.** В работе использовали клонированный штамм Wa РВА и вирулентный штамм Wa G1P[8] РВА человека, адаптированные к культуре клеток MARC-145 [15]. Вирусы культивировали на среде DMEM, для получения очищенного препарата использовали вирус штамма Wa РВА, концентрированный полиэтиленгликолем и очищенный в градиенте плотности сахарозы (HRV). Концентрацию белка в HRV определяли с помощью набора micro-BSA («Biorad», США), степень его очистки и структурный состав вирусных белков – методом электрофореза в полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия (ДСН-ПААГ), как описано нами ранее [15]. Для экспериментального заражения новорождённых поросят использовали вирулентный штамм Wa G1P[8] РВА человека с инфекционной активностью 5,50 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.

**Рекомбинантный белок rVP6 РВА человека.** Синтетический ген, кодирующий кодон-оптимизированную последовательность гена VP6 актуального эпидемического изолята РВА человека RVA/Human-wt/GR/Ath146/2010/G4P[8] (KC890881 в базе данных GenBank), был изготовлен по нашему заказу (ЗАО «Евроген», Россия) и клонирован в трансферную плазмиду для бакуловирусной системы экспрессии pFastBacDual из набора Bac-to-Bac (Invitrogen, США). Рекомбинантный бакуловirus был получен согласно рекомендациям производителя системы экспрессии Bac-to-Bac (Invitrogen, США) и использован для трансфекции клеток насекомых SF-9. Клетки выращивали в культуральных пластиковых флаконах (матрасах) различного объёма, а также в условиях суспензии (10–20 об/мин) с использованием бессывороточных сред EX-Cell 420 (SAFC, Германия) при 27°C. Для роллерного метода культивирования посевная концентрация клеток составляла  $0,5 \times 10^6$  клеток/мл. Для получения препарата белка для использования в ИФА осадок клеток замораживали-оттаивали, ресуспендировали в 10-кратном объёме карбонат-бикарбонатного буфера pH 9,6 и обрабатывали ультразвуком с помощью погружного зонда 5 мм в течение 2 мин на максимальной мощности с интервалом в 1 с. Полученную суспензию осветляли центрифугированием 5 мин на настольной центрифуге 5415D (Eppendorf, Германия) на максимальных оборотах, осветлённый лизат использовали для сорбции иммунологических планшет.

**Иммуноферментный анализ.** Для выявления антител к РВА в сыворотке крови свиней был разработан непрямой вариант ИФА с HRV и rVP6 РВА в качестве антигенов и сывороток крови, полученных от серопозитивных и серонегативных животных. При постановке ИФА антигены сорбировали на иммунологических

микропланшетах (Greiner Bio-One, Германия) в 0,1 М КББ (карбонатно-бикарбонатный буфер, pH 9,5) в концентрации 5 мкг/мл и инкубировали в течение ночи при 4 °С. Свободные участки пластика блокировали, внося в каждую лунку по 200 мкл раствора инертного белка. На следующих этапах в лунки микропланшета последовательно вносили испытуемые пробы (положительные и отрицательные сыворотки крови свиней и поросят в последовательных разведениях начиная с 1 : 200) и моноклональные антитела к IgG свиньи, меченные пероксидазой хрена (конъюгат) в рабочем разведении. В качестве промывочного раствора использовали фосфатно-солевой буфер с Твин-20 (ФСБТ) (0,01 М фосфатный буфер, 170 mM NaCl, 0,1% твин-20, pH 7,4). Все этапы реакции сопровождалась инкубацией планшетов с каждым из реагентов в течение 1 ч при 37 °С. В качестве хромоген-субстратной смеси использовали однокомпонентный субстратный буфер, содержащий 3,3',5,5'-тетраметилбензидин и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ООО «Хема-Медика», Россия). Реакцию останавливали через 15 мин добавлением в лунки 50 мкл 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Результаты реакции регистрировали на спектрофотометре с вертикальным лучом света (iMark Microplate Reader, «Bio-Rad», Япония) при длине волны 450 нм по коэффициенту оптического поглощения (ОП 450). Параллельно все испытуемые пробы исследовали на наличие антител к РВА в коммерческом наборе «Ngezim Rotavirus Porcino» («Ingenasa», Испания) по методике производителя.

*Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).* Наличие РНК РВА человека определяли методом ОТ-ПЦР с использованием пар специфичных праймеров на участки генов [24, 25]:

- VP4: RotaVP4Con3: TGGCTTCGCTCATTTATA-GACA, RotaVP4Con2: ATTTCCGACCATTTATAACC;
- VP6: RotaVP6-F: GACGGVGCRACTACATGGT, RotaVP6-R: GTCCAATTCATNCCTGGTGG);
- VP7: RotaVP7-F: ATGTATGGTATTGAATATAC-SAC, RotaVP7-R: AACYTGCCACCATTTTTTCC).

Программа амплификации: 50 °С – 30 мин, 95 °С – 5 мин; затем 35 циклов: (94 °С – 15 с, 47 °С (VP7) – 51 °С (VP4) – 52 °С (VP6) – 30 с, 72 °С – 30 с), 72 °С – 10 мин. Для проведения реакции 5 мкл РНК вносили в ПЦР-смесь, состоящую из 5 мкл 5xRT буфера (Fermentas), 1 мкл 10 пмоль каждого праймера, 2,5 мкл смеси dNTP, 0,125 мкл ревертазы RevertAid и 0,25 мкл Taq-полимеразы. Конечный объем смеси – 25 мкл.

Анализ продуктов амплификации выполняли посредством разделения фрагментов ДНК в 1% агарозном геле в TBE буфере. Продукты амплификации в геле окрашивали бромистым этидием. Для определения длины образовавшихся продуктов использовали 100+bp DNA Ladder («Evrogen», Россия).

*Животные.* В опыте использовали новорождённых поросят породы вьетнамская вислобрюхая. Животных содержали в отдельном помещении в деревянном вольере, оборудованном приспособлениями для корма и воды. До экспериментального заражения поросят содержали вместе со свиноматкой, после заражения

– отдельно по группам. До начала эксперимента сыворотки крови, молозиво и фекалии, полученные от трёх свиноматок и сыворотку крови от 20 новорождённых поросят исследовали на наличие антител к РВА методом ИФА и РНК вируса методом ОТ-ПЦР. Для формирования экспериментальных групп были отобраны 8 серонегативных и отрицательных в ОТ-ПЦР поросят 5-суточного возраста.

*Схема эксперимента.* Для опыта были сформированы две опытные группы ( $n=3$  в каждой) и одна контрольная группа ( $n=2$ ) поросят. Всех животных иммунизировали двукратно, на 0-е и 16-е сутки после начала эксперимента (п.э.). Поросьятам 1-й опытной группы перорально вводили аттенуированный штамм Wa РВА человека с инфекционной активностью 5,50 log ТЦД<sub>50</sub>/мл в дозе 3 см<sup>3</sup>. Животных 2-й опытной группы иммунизировали внутримышечно HRV, смешанным с адьювантом (синтетический полимер, pH 7,2–7,4) в соотношении 9:1, в дозе 500 мкг/животное. Поросьятам контрольной группы перорально вводили по 3 см<sup>3</sup> среды ДМЕМ, не содержащей РВА (плацебо). На 31-е сутки п.э. проводили экспериментальное заражение всех поросят вирулентным вирусом штамма Wa G1P[8] РВА человека с инфекционной активностью 5,50 Ig ТЦД<sub>50</sub>/мл в дозе 5 см<sup>3</sup>/голову, вводя её перорально. В течение эксперимента проводили ежедневный клинический осмотр животных, оценивая активность сосания материнского молока, поведенческие реакции, состояние кожных и слизистых покровов. Регистрировали наличие выделений из ротовой и носовой полостей, консистенцию кала. Измеряли массу тела, ректальную температуру, брали кровь и ректальные смывы у каждого поросёнка на 1, 3, 16, 31, 32, 35, 39 и 43-е сутки п.э. Полученные пробы сывороток крови исследовали разработанным и коммерческим ИФА, ректальные смывы – методом ПЦР. Эвтаназию поросят опытных групп осуществляли на 43-и сутки п.э. в соответствии с рекомендациями Европейской комиссии по эвтаназии экспериментальных животных [26], патоморфологическое обследование проводили с описанием состояния внутренних органов и тканей.

Статистическую обработку результатов осуществляли общепринятыми методами с использованием компьютерных программ Microsoft Office Excel 2003, Stat Plus 2005.

## Результаты

На первом этапе работы с использованием двух полученных и иммунохимически охарактеризованных антигенов был разработан метод непрямого твердофазного ИФА для выявления антител к РВА в сыворотке крови и молозиве свиней. При исследовании сывороток крови свиней и поросят, полученных от заведомо негативных (клинически здоровые свиньи и рождённые от них поросята из благополучного по РВИ хозяйства,  $n=58$ ) или заведомо РВА-позитивных (вакцинированные животные,  $n=36$ ) свиней, результаты разработанного и коммерческого ИФА совпали в 100% случаев. В первом случае все результаты исследований были

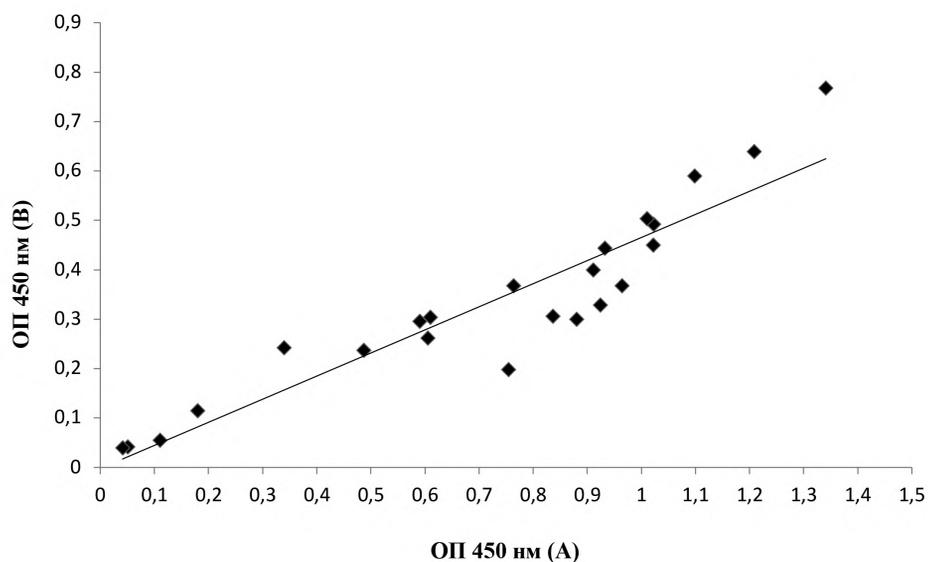


Рис. 1. Сравнительный анализ результатов по определению коррелятивной связи между результатами ИФА, полученными с помощью gVP6 (А) и HRV (Б) при исследовании 23 проб сыворотки крови свиней, полученных из двух свиноводческих хозяйств РФ; данные приведены относительно линии тренда.

отрицательными, во втором – положительными. Установлена положительная корреляция результатов полученных при исследовании отрицательных ( $r = 0,98$ ,  $p < 0,05$ ), положительных ( $r = 0,91$ ,  $p < 0,05$ ) и слабоположительных ( $r = 0,79$ ,  $p < 0,05$ ) проб. Результаты исследований показали, что по сравнению с очищенным вирусом рекомбинантный белок gVP6 наиболее эффективен при использовании в качестве антигена (рис. 1). Он обеспечивал максимальную константу связывания с РВА-специфическими антителами и не снижал антигенную активность при хранении.

Таким образом, разработанный метод ИФА показал высокую чувствительность и специфичность и был использован для серологического обследования трёх супоросных свиноматок непосредственно перед опоросом с целью последующего формирования опытных и контрольной групп новорождённых поросят (рис. 2).

Как показано на рис. 2, у двух свиноматок были выявлены антитела к РВА в титрах 1 : 400 – 1 : 800 (№ 3 и 4 соответственно), только одна свиноматка (№ 5) оказалась РВА-серонегативной. После опороса вирусспецифические антитела были обнаружены в молозиве первых двух животных и не выявлены в молозиве третьей. Результаты ОТ-ПЦР по выявлению РНК вируса в крови и ректальных смывах у этой свиноматки были также отрицательны. Сыворотка крови поросят, рождённых от иммунных свиноматок, содержала антитела к РВА, а поросята от свиноматки № 5 были серонегативными.

Проведённая с интервалом в 16 сут двукратная иммунизация поросят опытных групп не повлияла на их физиологический статус, они, как и поросята контрольной группы, были подвижны, активно сосали материнское молоко, кал был оформленный. Темпера-

тура тела не превышала 39,5 °С, состояние кожных и слизистых покровов оставалось в норме. Выделений из ротовой и носовой полостей не наблюдалось. Равномерный прирост массы тела поросят проходил во всех трёх группах животных до проведения экспериментального заражения (31-е сутки п.э) включительно (рис. 3).

Начиная с 35-х суток п.э (4-е сутки после экспериментального заражения) у поросят контрольной группы регистрировали угнетение, потерю аппетита, снижение массы (см. рис. 2) и температуры тела. Наблюдался жидкий стул серо-зелёного цвета с характерным кислым запахом. На 12-е сутки после экспериментального заражения (43-е сутки п.э.) оба животных этой группы пали. В отличие от них, все иммунизированные поросята 1-й и 2-й опытных групп после экспериментального заражения оставались клинически здоровыми на протяжении всего срока наблюдения. У них продолжался прирост массы тела, при этом статистически достоверных весовых различий между опытными животными не установлено.

Для изучения сроков выделения РВА из организма поросят исследовали ректальные смывы, полученные в динамике, на наличие РНК РВА человека методом ОТ-ПЦР (табл. 1).

Анализ результатов, приведённых в табл. 1, свидетельствует о том, что у поросят 1-й опытной группы после перорального введения клонированного штамма Wa РВА человека наблюдали кратковременное выделение ротавируса, а у животных, иммунизированных HRV внутримышечно, вирусывыделение отсутствовало в течение всего срока наблюдения. После экспериментального заражения у всех животных этих групп РНК в исследуемом материале не выявляли. В отличие от опытных, у поросят контрольной группы

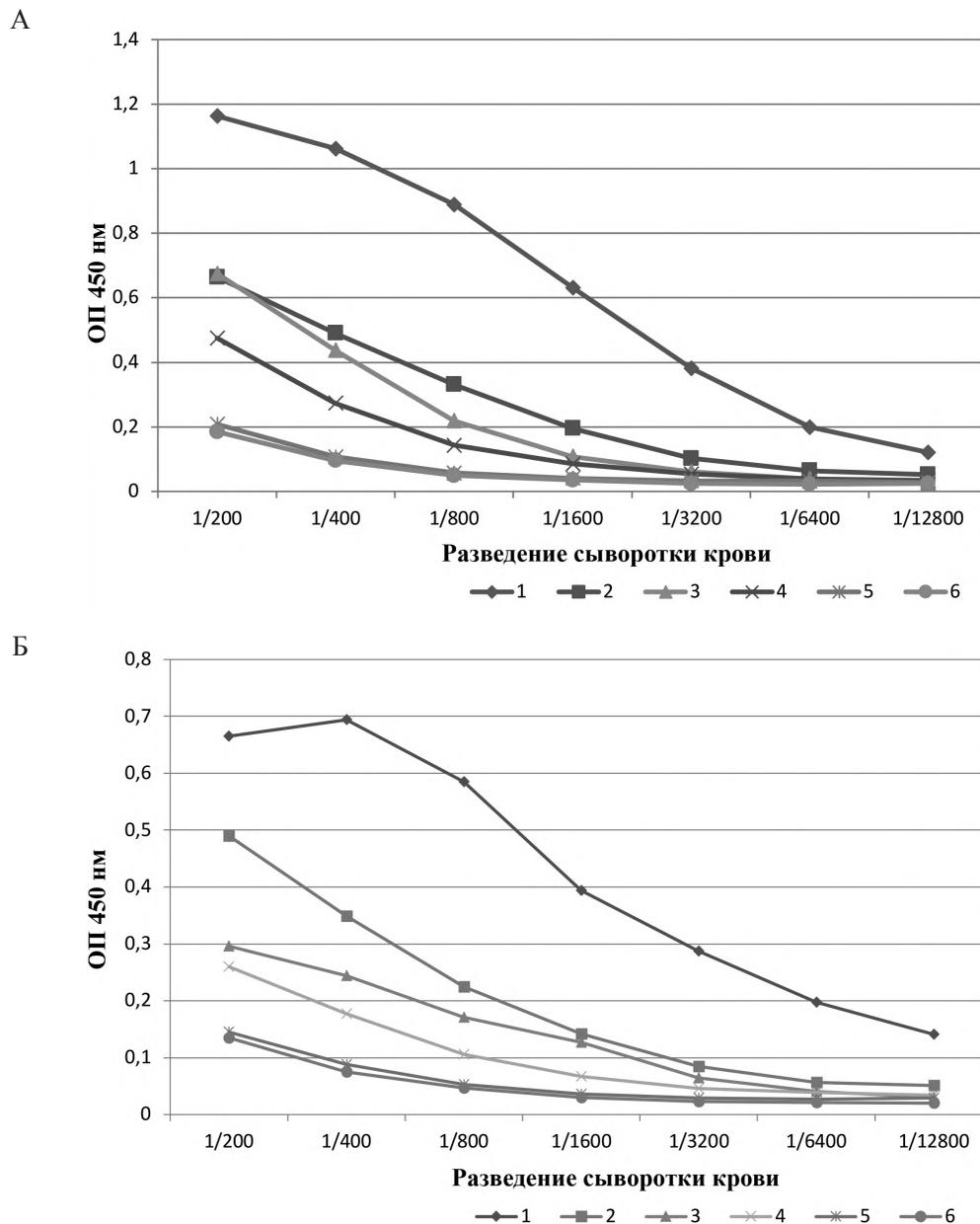


Рис. 2. Кривые титрования проб сыворотки крови свиноматок в непрямом твердофазном ИФА.

А – в качестве антигена использован рекомбинантный белок gVP6, полученный в бакуловирусной системе экспрессии генов; Б – в качестве антигена использован HRV. 1 – гипериммунная сыворотка крови свињи (положительный контроль); 2 – положительная сыворотка крови свињи (слабоположительный контроль); 3 – сыворотка крови от супоросной свиноматки № 3; 4 – сыворотка крови от супоросной свиноматки № 4; 5 – сыворотка крови от супоросной свиноматки № 5; 6 – сыворотка крови неиммунной свињи (отрицательный контроль).

РНК РВА обнаруживали в ректальных смывах, начиная с 1-х суток после заражения и вплоть до гибели. У павших поросят РНК РВА выявили в пробах тонкого отдела кишечника и периферических лимфатических узлах. После проведения патоморфологического исследования отмечали атрофию ворсинок тонкого отдела кишечника. У животных опытных групп подобной картины не наблюдали.

Динамику IgG-антителогенеза у поросят опытных и контрольной групп установили в разработанном

ИФА с использованием рекомбинантного и нативного антигенов, а также в коммерческом ИФА-наборе (табл. 2).

Данные табл. 2 свидетельствуют о том, что достоверно выявляемые РВА-специфические антитела, относящиеся к IgG-изотипу, были зарегистрированы у всех поросят опытных групп только на 43-е сутки п.э. Посмертное обследование павших поросят контрольной группы показало отсутствие антител подобной специфичности в сыворотке крови.

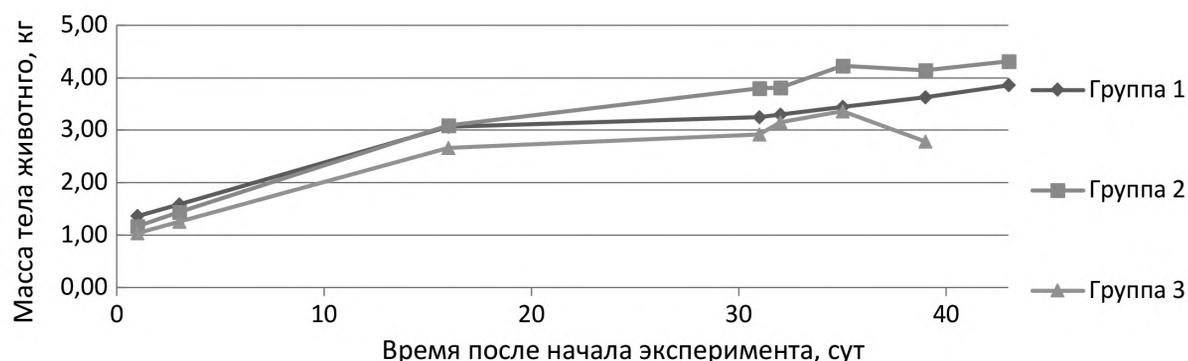


Рис. 3. Динамика изменения массы тела иммунизированных и контрольных поросят в среднем по группе.

Таблица 1  
Результаты выявления РНК РВА человека в ректальных смывах поросят методом ОТ-ПЦР

Группа	Время после начала эксперимента, сутки							
	1-е	3-и	16-е	31-е	32-е	35-е	39-е	43-и
1-я (n=3)	-	+	-	-	-	-	-	-
	-	+	-	-	-	-	-	-
	-	+	-	-	-	-	-	-
2-я (n=3)	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
3-я (n=2)	-	-	-	-	+	+	+	Пал
	-	-	-	-	+	+	+	Пал
	-	-	-	-	+	+	+	Пал

Примечание. «+» и «-» – положительная и отрицательная реакция соответственно.

### Обсуждение

Многочисленные эксперименты, проведённые в нашей стране и за рубежом, свидетельствуют о том, что к заражению РВА восприимчив не только человек, но и различные виды млекопитающих, включая сельскохозяйственных животных (крупный рогатый скот и свиньи) [27]. Благодаря схожей физиологии новорождённых поросят и младенцев, их способностью аналогичным образом формировать иммунитет слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта, а также их восприимчивостью к заражению штаммами РВА человека, новорождённые поросята являются актуальной моделью для изучения патогенеза энтеровирусов и механизмов формирования вирус-специфического иммунного ответа [21, 23].

В предыдущих исследованиях нами были адаптированы к размножению на перевиваемой культуре клеток MARC-145 вирусы клонированного и вирулентного штаммов Wa G1P[8] РВА человека [15]. Для изучения их способности вызывать инфекцию либо предотвращать развитие болезни после иммунизации, т.е. определения иммуногенной активности клонированного штамма Wa РВА, нами был поставлен опыт по двукратной иммунизации 5-суточных

новорождённых поросят породы вьетнамская вислобрюхая аттенуированным вирусом с последующим заражением вирулентным. Кроме живого аттенуированного вируса, для иммунизации был использован концентрированный и очищенный в градиенте плотности сахарозы вирус, являющийся инактивированным цельновирионным препаратом (HRV). Поскольку подобные опыты за рубежом проводили только на поросятах-гнотобиотах, то параллельно мы изучали возможность использования конвенционных новорождённых поросят для этой цели. По результатам эксперимента установлено, что после адаптации к культуре клеток MARC-145 вирулентный вирус сохранил свои иммунобиологические свойства и вызвал у заражённых животных острую форму течения болезни. У инфицированных поросят регистрировали диарею, угнетение, снижение температуры тела, потерю массы тела и очаги поражения в кишечнике, что имитировало клиническую картину РВИ у больных детей, в отличие от экспериментальной модели на грызунах, которые восприимчивы к ротавирусной диарее только до 2-3-недельного возраста [23, 28]. В то же время поросята чувствительны к заражению ротавирусом по меньшей мере до 8-недельного возраста, что достаточно для изучения поствакцинального иммунитета [23, 29].

Экскрецию РВА, установленную с первых суток после заражения и продолжающуюся в течение всего наблюдения, определяли по наличию РНК ротавируса в ректальных смывах с помощью разработанного ОТ-ПЦР. Болезнь закончилась летальным исходом для обоих поросят контрольной группы.

Иммунизация поросят вирусом клонированного штамма Wa РВА защищала их от гибели и от клинических проявлений болезни, причем эффективным оказался не только нативный ротавирус, введенный перорально, но и HRV, не способный к репликации в организме. Это указывает на принципиальную возможность добиться формирования напряжённого иммунитета против РВИ человека, проведя иммунизацию организма смесью вирусных белков. Ранее проведённые исследования в этом направлении показали альтернативный путь разработки новых вакцинных

Таблица 2

Результаты ИФА по выявлению IgG-антител к РВА человека в сыворотке крови поросят

Группа	ИФА/антиген	Время после начала эксперимента, сутки							
		1-е	3-и	16-е	31-е	32-е	35-е	39-е	43-и
1-я	HRV	-	-	-	-	-	-	-	+
	rVP6	-	-	-	-	-	-	+	+
	Ingenasa	-	-	-	-	-	-	-	+
2-я	HRV	-	-	-	-	-	-	-	+
	rVP6	-	-	-	-	-	-	-	+
	Ingenasa	-	-	-	-	-	-	+	+
3-я	HRV	-	-	-	-	-	-	-	-
	rVP6	-	-	-	-	-	-	-	Пали*
	Ingenasa	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание. Результаты исследований приведены в среднем по группе. Отсекающим значением (cut off) ОП450 для дифференциации положительных и отрицательных результатов реакции являлся показатель 0,3; \* – у павших животных посмертно брали кровь, полученную сыворотку исследовали с отрицательным результатом.

препаратов против РВИ – создание нереплицирующихся вакцин, в их составе могут быть рекомбинантные белки или вирусоподобные частицы [6], основным преимуществом которых является улучшенный профиль безопасности вакцин в отношении инвагинации кишечника [30].

Для оценки иммуногенности клонированного штамма Wa РВА и, в перспективе, традиционных и разрабатываемых вакцин нами разработана тест-система на основе непрямого твердофазного ИФА, предназначенная для выявления антител к РВА человека. Для этого были проведены исследования по получению и молекулярно-биологической характеристике рекомбинантного белка VP6, который является групп-специфическим антигеном, способным обнаружить антитела к любым штаммам РВА. Установлено, что по своим антигенным свойствам rVP6 сопоставим с нативным HRV, однако значительно стабильнее при хранении и эффективнее в дискриминации положительных и отрицательных результатов от сомнительных. Использование моноклональных антител вместо поликлональной антисыворотки в качестве конъюгата значительно повышает специфичность и воспроизводимость метода.

IgG является основным изотипом иммуноглобулинов в сыворотке крови всех видов млекопитающих и тот факт, что оба препарата, использовавшиеся для двукратной иммунизации, не стимулировали появление РВА-специфических антител, относящихся к IgG-изотипу, в сыворотке крови до момента экспериментального заражения, можно объяснить тремя основными факторами. Во-первых, различиями в задействованных структурах и механизмах формирования системного и местного иммунитета; во-вторых, различиями в их функционировании у взрослых и новорождённых; в-третьих, тропизмом энтеровирусов, поражающих клетки кишечника. На фоне иммунологической незрелости структур системного иммунитета основным защитным механизмом у новорождённых, в отношении которого и происходит запуск, является местный иммунитет (или иммунитет слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта). Поскольку у свиней, как и у человека, в кишечнике, молозиве, молоке и секрете слизистых оболочек преобладают секреторные антитела, относящиеся к sIgA-изотипу [31], то очевидно, что после иммунизации в первую очередь происходит антигенная стимуляция (помимо Т-лимфоцитов) В-клеток кишечника, большая часть из которых начинает синтезировать антитела подобной специфичности. В отличие от молекул иммуноглобулинов других изотипов, молекулы sIgA устойчивы к протеолитическому расщеплению в желудочно-кишечном тракте и поэтому по сравнению с IgG- или IgM-антителами они наиболее эффективны в связывании с энтеропатогенами. Другая часть В-клеток дифференцируется в клетки памяти, отличительным свойством которых является длительное

присутствие в организме. На этом этапе популяция В-клеток, секретирующая IgG-антитела, достаточно незначительна, однако после заражения быстро происходит так называемый иммунный ответ памяти, в результате которого формируется не только местный (sIgA- и IgG- антитела), но и системный противовирусный иммунитет с доминирующим синтезом IgG-антител. Возможно, в этом случае наличие и уровень IgG-антител к РВА в сыворотке крови будут коррелировать с тяжестью и исходом болезни, однако данное заключение нуждается в подтверждении, для чего необходимы дополнительные эксперименты.

### Заключение

Таким образом, резюмируя полученные результаты и имеющиеся данные, можно сделать общее заключение о том, что конвенционных новорождённых поросят породы вьетнамская вислобрюхая можно использовать как для воспроизведения РВИ человека, так и в качестве экспериментальной модели для оценки эффективности различного типа вакцин против РВИ. Два испытуемых нами препарата, изготовленные на основе нативного и очищенного ротавируса клонированного штамма Wa РВА, введённые перорально и внутримышечно с адьювантом соответственно, стимулировали формирование напряжённого иммунитета против РВИ, что выразилось в 100% защите поросят после экспериментального заражения вирулентным эпидемическим штаммом Wa G1P[8] РВА человека. Это свидетельствует о выраженной иммуногенности клонированного штамма Wa РВА и возможности его дальнейшего использования в качестве основного компонента разрабатываемой нами вакцины против РВИ. Вероятно, что появление IgG-антител к РВА в сыворотке крови – маркер формирования системного иммунитета против РВИ, обеспечивающий, наряду с местным, выживание животных после заражения.

**Финансирование.** Публикация подготовлена при поддержке Программы РУДН «5-100».

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3, 4, 8-14, 16-26, 28-31 см. REFERENCES)**

1. Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013.
2. Алипер Т.И., ред. *Актуальные инфекционные болезни свиней: Руководство для студентов, научных и практических специалистов*. М.: ЗооВетКнига; 2019.
5. Зайцева Е.В., Ольнева Т.А., Кулешов К.В., Подколзин А.Т., Шипулин Г.А., Кондрагьева Л.М. и др. Результаты мониторинга антигенных типов ротавирусов гр. А на территории Российской Федерации в период 2011-2015 гг. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(7): 445-8. Doi: <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-7-445-448>
6. Алексеев К.П., Кальнов С.Л., Гребенникова Т.В., Алипер Т.И. Ротавирусная инфекция человека. Стратегии вакцинопрофилактики. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(3): 154-9.
7. Денисюк Н.Б. Генетическая характеристика ротавирусов группы А, циркулирующих в Оренбургском регионе в сезон 2016-2017 гг. *Детские инфекции*. 2017; 16(4): 42-5. Doi: <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2017-16-4-42-45>
15. Хаметова К.М., Алексеев К.П., Южаков А.Г., Костина Л.В., Раев С.А., Мусиенко М.И. и др. Молекулярно-биологические свойства клонированного штамма Wa ротавируса А человека. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(1): 16-22.
27. Сергеев В.А., Непоклонов Е.А., Алипер Т.И. *Вирусы и вирусные вакцины*. М.: Библионика; 2007.

**REFERENCES**

1. L'vov D.K., ed. *Virology Guide: Human and Animal Viruses and Viral Infections [Rukovodstvo po virusologii: Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
2. Aliper T.I., ed. *Topical Pig Infectious Diseases: A Guide for Students, Scientific, and Practitioners [Aktual'nye infektsionnye bolezni sviney: Rukovodstvo dlya studentov, nauchnykh i prakticheskikh spetsialistov]*. Moscow: ZooVetKniga; 2019. (in Russian)
3. Gentsch J.R., Laird A.R., Bielfelt B., Griffin D.D., Banyai K., Ramachandran M., et al. Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *J. Infect. Dis.* 2005; 192(Suppl. 1): 146-59. Doi: <https://doi.org/10.1086/431499>
4. Matthijnsens J., Heylen E., Zeller M., Rahman M., Lemey P., Van Ranst M. Phylogenetic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *Mol. Biol. Evol.* 2010; 27(10): 2431-6. Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msq137>
5. Zaytseva E.V., Ol'neva T.A., Kuleshov K.V., Podkolzin A.T., Shipulin G.A., Kondrat'eva L.M., et al. Monitoring results of antigenic types of Rotavirus A on the territory of the Russian Federation in the period 2011-2015. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(7): 445-8. Doi: <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-7-445-448> (in Russian)
6. Alexseev K.P., Kal'nov S.L., Grebennikova T.V., Aliper T.I. Human rotavirus infection. Vaccine prevention strategies. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(3): 154-9. (in Russian)
7. Denisyuk N.B. Genetic characteristics of group A rotaviruses circulating in the Orenburg region in the 2016-2017 season. *Detskie infektsii*. 2017; 16(4): 42-5. Doi: <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2017-16-4-42-45> (in Russian)
8. Zhang J., Liu H., Jia L., Payne D.C., Hall A.J., Xu Z., et al. Active, population-based surveillance for rotavirus gastroenteritis in Chinese children: Beijing Municipality and Gansu Province, China. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2015; 34(1): 40-6. Doi: <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000505>
9. Gómez M.M., da Silva M.F.M., Volotão E.M., Fialho A.M., Mazzoco C.S., Rocha M.S., et al. G26P[19] rotavirus A strain causing acute gastroenteritis in the American continent. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2018; 113(12): e180344. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760180344>
10. My P.V., Rabaa M.A., Donato C., Cowley D., Phat V.V., Dung T.T., et al. Novel porcine-like human G26P[19] rotavirus identified in hospitalized paediatric diarrhoea patients in Ho Chi Minh City, Vietnam. *J. Gen. Virol.* 2014; 95(12): 2727-33. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.068403-0>

11. PATH (2011-2016). Available at: <https://www.path.org/programs/center-for-vaccine-innovation-and-access/rotaflash/>
12. Burnett E., Jonesteller C.L., Tate J.E., Yen C., Parashar U.D. Global impact of rotavirus vaccination on childhood hospitalizations and mortality from diarrhea. *J. Infect. Dis.* 2017; 215(11): 1666-72. Doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/jix186>
13. Crawford S.E., Ramani S., Tate J.E., Parashar U.D., Svensson L., Hagbom M., et al. Rotavirus infection. *Nat. Rev. Dis. Primers*. 2017; 3: 17083. Doi: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>
14. Tate J.E., Parashar U.D. Rotavirus vaccines in routine use. *Clin. Infect. Dis.* 2014; 59(9): 1291-301. Doi: <https://doi.org/10.1093/cid/ciu564>
15. Khametova K.M., Alekseev K.P., Yuzhakov A.G., Kostina L.V., Raev S.A., Musienko M.I., et al. Molecular biological properties of the cloned Wa strain of human rotavirus A. *Voprosy virusologii*. 2019; 64(1): 16-22. (in Russian)
16. Ward L.A., Rosen B.I., Yuan L., Saif L.J. Pathogenesis of an attenuated and a virulent strain of group A human rotavirus in neonatal gnotobiotic pigs. *J. Gen. Virol.* 1996; 77(Pt. 7): 1431-41. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-7-1431>
17. Friess A.E., Sinowatz F., Skolek-Winnisch R., Träutner W. The placenta of the pig. II. The ultrastructure of the areolae. *Anat. Embryol. (Berl.)*. 1981; 163(1): 43-53. Doi: <https://doi.org/10.1007/bf00315769>
18. Lala P.K., Chatterjee-Hasrouni S., Kearns M., Montgomery B., Colavincenzo V. Immunobiology of the feto-maternal interface. *Immunol. Rev.* 1983; 75: 87-116. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.1983.tb01092.x>
19. Butler J.E., Lemke C.D., Weber P., Sinkora M., Lager K.M. Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets: XIX. Undiversified B cells with hydrophobic HCDR3s preferentially proliferate in the porcine reproductive and respiratory syndrome. *J. Immunol.* 2007; 178(10): 6320-31. Doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.10.6320>
20. Saif L.J., Fernandez F.M. Group A rotavirus veterinary vaccines. *J. Infect. Dis.* 1996; 174(Suppl. 1): 98-106. Doi: [https://doi.org/10.1093/infdis/174.Supplement\\_1.S98](https://doi.org/10.1093/infdis/174.Supplement_1.S98)
21. Yuan L., Saif L.J. Induction of mucosal immune responses and protection against enteric viruses: rotavirus infection of gnotobiotic pigs as a model. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002; 87(3-4): 147-60. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00046-6](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00046-6)
22. Hammerberg C., Schurig G.G., Ochs D.L. Immunodeficiency in young pigs. *Am. J. Vet. Res.* 1989; 50(6): 868-74.
23. Azevedo M.P., Vlasova A.N., Saif L.J. Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *Expert. Rev. Vaccines*. 2013; 12(2): 169-81. Doi: <https://doi.org/10.1586/erv.13.3>
24. Babji S., Arumugam R., Sarvanabhavan A., Gentsch J.R., Kang G. Approach to molecular characterization of partially and completely untyped samples in an Indian rotavirus surveillance program. *Vaccine*. 2014; 32(Suppl. 1): A84-8. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.04.024>
25. Gentsch J.R., Glass R.I., Woods P., Gouvea V., Gorziglia M., Flores J., et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30(6): 1365-73.
26. Close B., Banister K., Baumans V., Bernoth E.M., Bromage N., Bunyan J., et al. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. DGXT of the European Commission. *Lab. Anim.* 1997; 31(1): 1-32. Doi: <https://doi.org/10.1258/002367797780600297>
27. Sergeev V.A., Nepoklonov E.A., Aliper T.I. *Viruses and Viral Vaccines [Virusy i virusnye vaksiny]*. Moscow: Biblionika; 2007. (in Russian)
28. Yuan L., Ward L.A., Rosen B.I., To T.L., Saif L.J. Systematic and intestinal antibody-secreting cell responses and correlates of protective immunity to human rotavirus in a gnotobiotic pig model of disease. *J. Virol.* 1996; 70(5): 3075-83.
29. Burns J.W., Krishnaney A.A., Vo P.T., Rouse R.V., Anderson L.J., Greenberg H.B. Analyses of homologous rotavirus infection in the mouse model. *Virology*. 1995; 207(1): 143-53. Doi: <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1060>
30. Patel M., Shane A.L., Parashar U.D., Jiang B., Gentsch J.R., Glass R.I. Oral rotavirus vaccines: how well will they work where they are needed most? *J. Infect. Dis.* 2009; 200(Suppl. 1): 39-48. Doi: <https://doi.org/10.1086/605035>
31. Wagstrom E.A., Yoon K.J., Zimmerman J.J. Immune components in porcine mammary secretions. *Viral Immunol.* 2000; 13(3): 383-97. Doi: <https://doi.org/10.1089/08828240050144699>

Поступила 19.08.19

Принята в печать 10.10.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Наровлянский А.Н.<sup>1</sup>, Мезенцева М.В.<sup>1</sup>, Суетина И.А.<sup>1</sup>, Руссу Л.И.<sup>1</sup>, Иванова А.М.<sup>1</sup>,  
Полосков В.В.<sup>1</sup>, Измestьева А.В.<sup>1</sup>, Оспельникова Т.П.<sup>1</sup>, Сарымсаков А.А.<sup>2</sup>, Ершов Ф.И.<sup>1</sup>

## ЦИТОКИН-РЕГУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОТИВОВИРУСНОГО ПРЕПАРАТА ЦелАгрип В ПЕРЕВИВАЕМЫХ В-КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЛИМФОМЫ БЕРКИТТА

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи»  
Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

<sup>2</sup>Институт химии и физики полимеров Академии наук Республики Узбекистан, 100128, г. Ташкент, Узбекистан

**Введение.** Цитокины, активируемые в ответ на иммуносупрессивные вирусные инфекции, могут прямо или косвенно влиять на неопластическую трансформацию В-клеток. В настоящем исследовании изучали новую субстанцию, разработанную для получения противовирусного лекарственного средства ЦелАгрип (CelAgripus, ЦА), которая проявляет интерферон- (ИФН) и цитокин-индуцирующую активность и, по-видимому, может быть использована в качестве активатора противовирусного иммунитета.

**Цель** исследования – оценить цитокин-регулирующее действие ЦА в линиях клеток лимфомы Беркитта (ЛБ), латентно инфицированных вирусом Эпштейна–Барр (ВЭБ).

Авторам предстояло изучить ЦА-индуцированную экспрессию генов цитокинов – интерлейкинов (ИЛ) -1 $\beta$ , -2, -4, -6, -8, -10, -12, -17, -18; ИФН- $\alpha$ , - $\gamma$ , - $\beta$ , - $\lambda$ 1, - $\lambda$ 2, - $\lambda$ 3; фактора некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО $\alpha$ ) в нормальных и трансформированных ВЭБ клетках ЛБ.

**Материал и методы.** Использовали линии клеток фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ), Namalva, Daudi, Raji и R3HR-1, на которых изучали препараты ЦА, госсипол-уксусной кислоты (ГУК), натрий-карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) с помощью методов ОТ-ПЦР и оценки цитотоксичности.

**Результаты.** Выявлено действие ЦА на экспрессию генов ИФН- $\lambda$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8 и ИЛ-10. Направленность цитокинового ответа зависела от вида клеток и дозы препарата.

**Обсуждение.** При обработке ЦА клеток ЛБ наблюдались активация генной экспрессии ИФН- $\lambda$ , ИЛ-1 $\beta$ , -6, -8 и супрессия активности гена ИЛ-10. При действии субстанций Na-КМЦ и ГУК, используемых для синтеза ЦА, выявлено, в основном, подавление экспрессии генов ИФН- $\beta$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-10, ИЛ-18 и ФНО $\alpha$ .

**Заключение.** Субстанция ЦА оказывает новые эффекты по активации экспрессии ряда ключевых цитокиновых генов в перевиваемых линиях клеток ЛБ. Направленность цитокинового ответа зависит от вида клеток и дозы препарата.

**Ключевые слова:** цитокины; индуктор интерферона; вирус Эпштейна–Барр; лимфома Беркитта; перевиваемые линии клеток; экспрессия генов; полимерная цепная реакция.

**Для цитирования:** Наровлянский А.Н., Мезенцева М.В., Суетина И.А., Руссу Л.И., Иванова А.М., Полосков В.В., Измestьева А.В., Оспельникова Т.П., Сарымсаков А.А., Ершов Ф.И. Цитокин-регулирующая активность противовирусного препарата ЦелАгрип в перевиваемых В-клеточных линиях лимфомы Беркитта. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(4):165-172. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-165-172>

### Информация об авторах:

Наровлянский А.Н., <http://orcid.org/0000-0003-0601-7148>

Мезенцева М.В., <http://orcid.org/0000-0001-7346-5536>

Суетина И.А., <http://orcid.org/0000-0003-2878-0590>

Руссу Л.И., <http://orcid.org/0000-0001-6353-9917>

Иванова А.М., <http://orcid.org/0000-0002-6008-7967>

Полосков В.В., <http://orcid.org/0000-0003-0001-2493>

Измestьева А.В., <http://orcid.org/0000-0002-0035-324X>

Оспельникова Т.П., <http://orcid.org/0000-0002-1580-6096>

Сарымсаков А.А., <http://orcid.org/0000-0003-4562-7280>

Ершов Ф.И., <http://orcid.org/0000-0002-4780-7560>

**Для корреспонденции:** Наровлянский Александр Наумович, д-р биол. наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории цитокинов НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: narovl@yandex.ru

Narovlyansky A.N.<sup>1</sup>, Mezentseva M.V.<sup>1</sup>, Suetina I.A.<sup>1</sup>, Russu L.I.<sup>1</sup>, Ivanova A.M.<sup>1</sup>, Poloskov V.V.<sup>1</sup>,  
Izmes't'eva A.V.<sup>1</sup>, Ospelnikova T.P.<sup>1</sup>, Sarymsakov A.A.<sup>2</sup>, Ershov F.I.<sup>1</sup>

## CYTOKINE-REGULATING ACTIVITY OF ANTI-VIRUS PREPARATION CelAgripus IN BURKITT'S LYMPHOMA STABLE B-CELL LINES

<sup>1</sup>National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F.Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation;

<sup>2</sup>Institute of Polymer Chemistry and Physics Uzbek Academy of Sciences, Tashkent, 100128, Uzbekistan

**Introduction.** Cytokines activated in response to immunosuppressive viral infections can directly or indirectly affect the neoplastic transformation of B cells. In this study, we studied a new substance designed to produce the antiviral drug CelAgrip (CA, CelAgripus), which exhibits interferon (IFN) and cytokine-inducing activity and, apparently, can be used as an activator of antiviral immunity.

**Purpose** - is to evaluate the cytokine-regulating effect of CA in Burkitt's lymphoma (LB) cell lines latently infected with the Epstein-Barr virus (EBV).

**Objectives:** to study the CA-induced expression of the cytokine genes IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2, IFN- $\lambda$ 3, TNF- $\alpha$  in normal and EBV transformed LB cells.

**Material and methods.** Cell line: the human embryo fibroblasts (HEF), Namalva, Daudi, Raji, P3HR-1. Preparations: CA, gossypol-acetic acid (GAA), sodium carboxymethyl cellulose (Na-CMC). Methods: RT-PCR and methods for assessing cytotoxicity (MTT and Scepter 2.0 Merck cell counter).

**Results.** The effect of the CA preparation on the expression of IFN- $\lambda$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and IL-10 genes was revealed.

**Discussion.** We observed the activation of gene expression of IFN- $\lambda$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 and suppression of IL-10 gene activity when treatment CA of LB cells.

**Conclusion.** The substance CA has new effects on the activation of the expression of a number of key cytokine genes in stable Burkitt lymphoma cell lines.

**Keywords:** cytokines; interferon inducer; Epstein-Barr virus; Burkitt's lymphoma; stable cell lines; gene expression; the polymerase chain reaction.

**For citation:** Narovlyansky A.N., Mezentseva M.V., Suetina I.A., Russu L.I., Ivanova A.M., Poloskov V.V., Izmet'eva A.V., Ospelnikova T.P., Sarymsakov A.A., Ershov F.I. Cytokine-regulating activity of anti-virus preparation CelAgripin in Burkitt's lymphoma stable B-cell lines. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(4):165-172. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-165-172>

**For correspondence:** Alexander N. Narovlyansky, DBS, Chief Researcher of the Cytokine Laboratory, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F.Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: narovl@yandex.ru

#### Information about author:

Narovlyansky A.N., <http://orcid.org/0000-0003-0601-7148>

Mezentseva M.V., <http://orcid.org/0000-0001-7346-5536>

Suetina I.A., <http://orcid.org/0000-0003-2878-0590>

Russu L.I., <http://orcid.org/0000-0001-6353-9917>

Ivanova A.M., <http://orcid.org/0000-0002-6008-7967>

Poloskov V.V., <http://orcid.org/0000-0003-0001-2493>

Izmet'eva A.V., <http://orcid.org/0000-0002-0035-324X>

Ospelnikova T.P., <http://orcid.org/0000-0002-1580-6096>

Sarymsakov A.A., <http://orcid.org/0000-0003-4562-7280>

Ershov F.I. <http://orcid.org/0000-0002-4780-7560>

**Acknowledgments.** The work was carried out with the financial support of the «Russian Foundation for Basic Research» on the project (grant) №18-515-41001\18.

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

Received 12 March 2019

Accepted 09 April 2019

## Введение

Лимфома Беркитта (ЛБ) относится к гетерогенной группе агрессивных В-клеточных сарком. Ещё в 1964 г. была установлена связь ЛБ и вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) [1]. Использование культур перевиваемых клеток, полученных от больных ЛБ, представляет интерес для исследователей, занимающихся проблемами вирусологии, онкологии, иммунологии и разработкой новых лекарственных препаратов. Известно, что ВЭБ обнаруживается в лимфоцитах крови больных ЛБ, но не выявляется в опухолевых клетках. При этом в полученных из таких опухолей линиях 5–25% клеток продуцировали ВЭБ. В течение последних 20 лет количество вирусов, которые связывают с возникновением лимфом, увеличилось и включает, кроме ВЭБ, Т-клеточный лимфотропный вирус человека 1 (Human T-cell lymphotropic virus 1), вирус иммунодефицита человека (Human immunodeficiency virus 1 и 2) и вирус герпеса человека 8-го типа (Human herpesvirus, HHV8). Эти вирусы могут способствовать развитию лимфом путём прямого воздействия (ВЭБ и ЛБ) или в результате длительной иммуносупрессии (например, HHV8). Предполагается, что цитокинные реакции в ответ на иммуносупрессивные вирусные инфекции могут пря-

мо или косвенно влиять на неопластическую трансформацию В-клеток. При этом цитокины способны стимулировать рост клеток и подавлять апоптоз, что ведёт к усилению инвазии и метастазированию трансформированных клеток. Обнаружены высокие уровни цитокинов – интерлейкинов (ИЛ) -6, -17A, -10 при ЛБ у детей [2]. При мониторинге продукции цитокинов в линиях клеток ЛБ, позитивных по ВЭБ, K.Miyauchi и соавт. [3] выявили продукцию ИЛ-10, интерферон- $\gamma$  (ИФН- $\gamma$ ), индуцированного белка IP-10/CXCL10, макрофагального хемокина MDC/CCL22, макрофагальных воспалительных белков MIP-1a/CCL3 и MIP-1b/CCL4. Авторы указывают, что латенция ВЭБ, по-видимому, связана с продукцией ИЛ-10, MDC/CCL22 и MIP-1a/CCL3 в клетках ЛБ. ВЭБ экспрессирует ряд гомологов клеточных цитокинов, одним из которых является вирусный ИЛ-10 (вириИЛ-10) [4]. Это позволяет ВЭБ обходить противовирусные ответы организма хозяина и устанавливать латентность. Предполагается, что вириИЛ-10 ВЭБ может супрессировать индуцированные человеческим ИЛ-10 противовоспалительные гены и повышать экспрессию воспалительных генов, и тем самым перекрывать или отменять противовоспалительные эффекты человеческого ИЛ-10 [5].

ИФН и их индукторы – одни из основных препаратов для терапии и профилактики вирусных инфекций [6]. Они используются в течение длительного времени и показали свою эффективность как в подавлении вирусной репродукции, так и в коррекции механизмов врождённого иммунитета [7]. В Институте химии и физики полимеров Академии наук Республики Узбекистан разработана новая субстанция для получения противовирусного лекарственного средства [8]. В качестве полимерной матрицы использованы высокоочищенные формы карбоксиметилцеллюлозы, а в качестве ИФН- и цитокин-индуцирующего агента – природный полифенол госсипол. Препарат ЦелАгрип (CelAgrilus, ЦА) разрешён Минздравом Республики Узбекистан для применения в качестве профилактического и лечебного средства при вирусном гриппе и острых респираторных вирусных инфекциях.

**Цель** настоящей работы – оценка цитокин-регулирующего действия индуктора ИФН ЦелАгрип в линиях клеток ЛБ, латентно инфицированных ВЭБ.

Исследователям предстояло изучить ЦА-индуцированную экспрессию генов цитокинов, а именно: ИЛ-1 $\beta$ , -2, -4, -6, -8, -10, -12, -17, -18; ИФН- $\alpha$ , - $\gamma$ , - $\beta$ , - $\lambda$ 1, - $\lambda$ 2, - $\lambda$ 3 и фактора некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО $\alpha$ ), в нормальных и трансформированных ВЭБ клетках ЛБ.

### Материал и методы

**Клетки:** 1) линия диплоидных фибробластов эмбриона человека (ФЭЧ); 2) перевиваемая линия человеческих клеток ЛБ Namalva, выделенная G. Klein и соавт. [9]; 3) перевиваемая линия человеческих клеток ЛБ Daudi, полученная от биопсии опухоли 16-летнего африканского мальчика Daudi Onyangaj [10]; 4) перевиваемая линия человеческих клеток ЛБ Raji (линия недифференцированных лимфобластоидных клеток В-типа), полученная в 1963 г. R.J.V. Pulvertaft [11] из ЛБ 11-летнего африканского мальчика; 5) перевиваемая линия человеческих клеток ЛБ P3HR-1 была выделена и распространена Y. Ninuma и соавт. [12]. Все линии получены из коллекции культур клеток ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России (лаборатория культур тканей НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского).

**Культивирование перевиваемых линий клеток** осуществляли в питательной среде Игла ДМЕМ (ООО «Биолот», Санкт-Петербург) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС; Thermo Fisher Scientific Inc., США) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °C и 5% CO<sub>2</sub>.

**Препараты:** 1) субстанция ЦА (НПП «Радикс», Россия) является натриевой солью сополимера (1→4)-6-0-карбоксиметил- $\beta$ -D-глюкозы, (1→4)- $\beta$ -D-глюкозы, (2→24)2,3,14,15,21,24,29,32-октагидрокси-23-(карбоксиметоксиметил)-7,10-диметил-4,13-ди(2-пропил)-19,22,26,30,31-пентаоксагенацикло [23,3,2,2<sup>16</sup>O<sup>5,28</sup>O<sup>9,18</sup>O<sup>12,17</sup>] дотриактанта 1,3,5(28),6,6(27),9(18),10,12(17),13,15-декаена; 2) госсипол-уксусная кислота (ГУК). Молекулярная формула: C<sub>32</sub>H<sub>34</sub>O<sub>10</sub>, 98%, является активным компонентом, извлечённым

из семян хлопчатника. ГУК использовали в качестве исходного сырья для синтеза субстанции ЦА; 3) натрий-карбоксиметилцеллюлоза (Na-КМЦ) – натриевая соль целлюлозогликолевой кислоты. Эмпирическая формула [C<sub>6</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub>(OH)<sub>3-x</sub>(OCH<sub>2</sub>COONa)<sub>x</sub>]<sub>n</sub>. Na-КМЦ использовали в качестве исходного сырья для синтеза субстанции ЦА. Все изученные в работе препараты предоставлены Институтом химии и физики полимеров Академии наук Республики Узбекистан.

**Подготовка образцов для исследований.** ЦА исследовали на клетках для определения цитотоксичности в исходной концентрации 200 мг/мл. Образцы Na-КМЦ и ГУК были разведены в среде для суспензионных культур до концентрации 10 мг/мл и 20 мг/мл, соответственно. Все 3 препарата были профильтрованы через фильтр 0,45 мкм и внесены в лунки 96-луночной планшеты через 24 ч после посадки клеток, титровали в двукратных разведениях от 1/2 до 1/1024 и инкубировали с клетками в течение 24 ч в CO<sub>2</sub>-термостате при 37 °C. Эксперименты выполняли с тремя повторами.

**Количественная оценка цитотоксичности препаратов с использованием МТТ-тестирования** [13]. Использовали стандартный метод МТТ (3[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия, Sigma, США). Восстановленные клетками МТТ-реагент является показателем жизнеспособности клеток в изучаемой культуре, что позволяет количественно оценить гибель клеток, под воздействием тестируемого препарата. Жизнеспособность клеток оценивали по интенсивности окраски раствора, т.е. измеряя оптическую плотность при длине волны 545 нм фотометра «Immunochem 2100» (США). Эксперименты проводили с тремя повторами. Цитотоксичными считали препараты при снижении показателей ОП более чем на 50%.

**Количественная оценка цитотоксичности препаратов с использованием портативного счётчика клеток Scepter 2.0 (Merck Millipore).** Анализировали популяции перевиваемых суспензионных линий клеток по размеру и клеточному объёму в соответствии с инструкцией к прибору при обработке различными концентрациями ЦА.

**Культивирование клеток для исследования цитонного спектра.** Исследуемые перевиваемые линии клеток пересевали в 6-луночные плашки в объёме 2 мл. Через 24 ч культивирования в лунки вносили образцы в следующих конечных концентрациях: ЦА – 5 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,05 мг/мл; Na-КМЦ – 0,5 мг/мл и 0,05 мг/мл; ГУК – 0,2 мг/мл и 0,02 мг/мл.

Для выделения РНК применяли коммерческие тест-системы на магнитных частицах «Кровь – Выделение ДНК/РНК» («ООО Силекс», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Для удаления из пробы нуклеиновых кислот нежелательного типа использовали соответствующую нуклеазу. Экспрессию генов определяли с использованием полуколичественного метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Образцы кДНК нормировали по контрольному гену GAPDH, кодирующему

глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназу. ПЦР проводили на амплификаторе «Терцик». Амплификаты ДНК анализировали электрофорезом в 2,5% агарозном геле с бромистым этидием. Для идентификации нуклеотидных последовательностей использовали маркер для электрофореза фирмы «Promega», США. Детекцию соответствующих ДНК-продуктов проводили с использованием трансиллюминатора при длине волны 254 нм.

В работе были использованы пары праймеров для следующих цитокинов: ИЛ-1 $\beta$ , -2, -4, -6, -8, -10, -12, -17, -18; ИФН- $\alpha$ , - $\gamma$ , - $\beta$ , - $\lambda$ 1, - $\lambda$ 2, - $\lambda$ 3; ФНО $\alpha$  [14].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

### Результаты

На начальном этапе исследований определяли *in vitro* токсические (субтоксические) и эффективные концентрации ЦА. Для клеток ФЭЧ, Raji и Namalva препарат проявлял токсичность при концентрациях  $\geq 25$  мг/мл. А при добавлении ЦА к клеткам P3HR-1 и Daudi наблюдалась их деструкция при концентрациях препарата  $\geq 12,5$  мг/мл. Для анализа роли исходных субстанций, используемых для синтеза ЦА, были проведены эксперименты по определению цитотоксичности Na-КМЦ и ГУК. Эти субстанции более токсичны для клеток, чем ЦА. При изучении влияния субтоксических концентраций ЦА (50 мг/мл) на перевиваемые линии клеток ЛБ выявлено уменьшение объёма, диаметра и количества жизнеспособных клеток. Обработка культур клеток нетоксичными концентрациями препарата (например, 5 мг/мл) не влияла на жизнеспособность исследуемых клеток. На основании полученных данных для дальнейшей работы были отобраны концентрации препаратов, не проявлявшие токсических свойств (для ЦА – 5, 0,5 и 0,05 мг/мл; для Na-КМЦ – 0,5 и 0,05 мг/мл и ГУК – 0,2 и 0,02 мг/мл).

В табл. 1 приведены данные по экспрессии широкого спектра генов ИФН и цитокинов при действии ЦА в перевиваемых клетках ЛБ и ФЭЧ. Во всех изученных линиях клеток наблюдали конститутивную экспрессию генов ИФН I типа (ИФН- $\alpha$  и - $\beta$ ), ИЛ-18 и ФНО $\alpha$ , которая сохранялась при действии ЦА. В то же время даже при индукции ЦА отсутствовала активность генов ИФН II типа (ИФН- $\gamma$ ) и ИЛ-2, -4, -12, -17. Активность генов ИФН типа III ( $\lambda$ -1,  $\lambda$ -2,  $\lambda$ -3) не выявлялась в линиях клеток Daudi и Raji, а также при их обработке препаратом. В клетках P3HR-1 наблюдалась спонтанная экспрессия гена ИФН $\lambda$ -1, которая подавлялась при обработке ЦА, но при этом происходила индукция активности гена ИФН $\lambda$ -3. А в клетках Namalva, наоборот, наблюдали подавление активности гена ИФН $\lambda$ -3 при действии препарата.

Отдельно следует рассмотреть изменения в активации генов ИЛ-1 $\beta$ , -6, -8 и -10. Из данных, суммированных в табл. 1, следует: 1) в нормальных диплоидных клетках человека, а также в клетках Daudi и Raji не выявлялась мРНК ИЛ-1 $\beta$ ; 2) в клетках P3HR-1

и Namalva, необработанных ЦА, также отсутствовала экспрессия этого гена, но при обработке клеток препаратом во всех использованных концентрациях обнаруживалась экспрессия мРНК ИЛ-1 $\beta$ ; 3) мРНК ИЛ-6 не определялась в двух клеточных линиях (Daudi и Raji), а в линии P3HR-1 выявлялась конститутивная активность этого гена, которая не изменялась при обработке ЦА; 4) в линии клеток Namalva активация этого гена выявлялась только при обработке препаратом в концентрациях 0,05 и 5 мг/мл; 5) ген ИЛ-8 активировался при действии ЦА во всех использованных концентрациях в трёх линиях клеток – P3HR-1, Raji и ФЭЧ; 6) отсутствовал синтез мРНК ИЛ-8 в клетках Daudi; 7) в клетках Namalva, в которых конститутивно выявлялась экспрессия гена ИЛ-8, при действии ЦА в концентрации 0,05 мг/мл активность гена ИЛ-8 не обнаружена.

При обработке ЦА в линии ФЭЧ обнаружена экспрессия гена ИЛ-10, а в клетках Raji конститутивно выявляемый синтез мРНК ИЛ-10 подавлялся. В клетках Daudi и Namalva также конститутивно выявлялась активность гена ИЛ-10 и при обработке ЦА наблюдалась супрессия активности в концентрации 5 мг/мл (для Daudi) и 0,5 мг/мл (для Namalva). В клетках P3HR-1 экспрессия гена ИЛ-10 не обнаруживалась.

В табл. 2 приведены результаты изучения способности исходных для синтеза ЦА соединений – Na-КМЦ и ГУК, стимулировать экспрессию генов цитокинов в этих же линиях клеток. В ФЭЧ выявлено влияние Na-КМЦ только на подавление экспрессии генов ИЛ-18 и ФНО $\alpha$ ; ГУК подавляла генную активность ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8 и ФНО $\alpha$ . В клетках Daudi и P3HR-1 не обнаружено изменений в спектре цитокинов, только в линии клеток P3HR-1 при введении ГУК в концентрации 0,02 мг/мл наблюдали подавление экспрессии генов ИФН- $\beta$  и ФНО $\alpha$ . В линии клеток Raji Na-КМЦ подавляла экспрессию генов ИЛ-18 и ФНО $\alpha$ ; отмечены отсутствие генной экспрессии ИЛ-10 и активация гена ИЛ-8 как при обработке этих клеток Na-КМЦ, так и ГУК. В культуре клеток Namalva Na-КМЦ супрессировал генную экспрессию ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-10 и ФНО $\alpha$ , а ГУК – ИЛ-1 $\beta$  и -10.

### Обсуждение

В результате изучения цитотоксичности субстанции ЦА и исходных для её синтеза соединений установлено, что по сравнению с ГУК, которая проявляет значительно более выраженную токсичность на диплоидных и трансформированных клетках, ЦА практически не токсичен для диплоидных фибробластов и линий клеток ЛБ при концентрациях до 12,5 мг/мл. Это согласуется с классическими работами по снижению токсичности биологически активных соединений при их модификации путём ковалентного соединения с полимерными молекулами [15]. При исследовании цитокинового профиля на основании анализа генной экспрессии методом ОТ-ПЦР в изучаемых линиях клеток мы не выявили активности генов ИФН II типа (ИФН- $\gamma$ ) и ИЛ-2, -4, -12, -17 даже при индукции ЦА. Но при этом во всех изученных линиях клеток

Таблица 1

**Экспрессия генов интерферонов и цитокинов при действии препарата ЦелАгрии в перевиваемых клетках лимфомы Беркитта и фибробластах эмбриона человека**

Клетки/ Концентрация ЦА, мг/мл	ИФН- $\alpha$	ИФН- $\gamma$	ИФН- $\beta$	$\lambda$ -1	$\lambda$ -2	$\lambda$ -3	ИЛ-1 $\beta$	ИЛ-2	ИЛ-4	ИЛ-6	ИЛ-8	ИЛ-10	ИЛ-12	ИЛ-17	ИЛ-18	ФНО $\alpha$	GAPDH
P3HR 5,0	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P3HR 0,5	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P3HR 0,05	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
P3HR контр.	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
Daudi 5,0	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Daudi 0,5	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Daudi 0,05	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Daudi контр.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Raji 5,0	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Raji 0,5	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Raji 0,05	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Raji контр.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Namalva 5,0	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Namalva 0,5	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Namalva 0,05	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+
Namalva контр.	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
ФЭЧ 5,0	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
ФЭЧ 0,5	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
ФЭЧ 0,05	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
ФЭЧ контр.	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+

Примечание. Здесь и в табл. 2: экспрессию генов цитокинов определяли с использованием полуколичественного метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией; «+» – наличие активности; «-» – отсутствие активности, контр – контрольные линии клеток без обработки препаратом; GAPDH – контрольный ген, кодирующий глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназу, по которому нормировали образцы кДНК.

наблюдали конститутивную экспрессию генов ИФН-I типа I (ИФН- $\alpha$  и - $\beta$ ), ИЛ-18 и ФНО $\alpha$ , которая сохранялась также при действии препарата ЦА. Ранее, в работах сообщалось о спонтанной продукции ИФН I типа в лимфобластоидных линиях клеток человека [16]. Позже эффект конститутивной экспрессии ИФН I типа и передачи сигналов в состоянии покоя (без индуцирующего агента) был обнаружен в клетках человека и мыши, включая макрофаги и В-клетки [17]. Тем не менее этот эффект до конца не исследован [18]. Предполагается, что конститутивный ИФН поддерживает экспрессию компонентов передачи сигналов ИФН I типа и базальный уровень активности генов, связанных с иммунитетом, для обеспечения быстрого ответа на вирусную инфекцию [19]. Известно также, что ряд цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , -4, -6, -7, -8, -10 и -13 и/или их генов конститутивно экспрессируются в различных количествах, например, при В-клеточном хроническом лимфобластном лейкозе (В-CLL) [20]. Считается, что ФНО $\alpha$  влияет на генез лимфомы посредством усиления воспалительных и антиапоптотических сигналов, возможно, через путь NF- $\kappa$ B [21]. Кроме того, было обнаружено, что ФНО $\alpha$ , ФНО-R1 и ФНО-R2 повышены у пациентов с неходжкинскими лимфомами (НХЛ), и что уровни ФНО, ФНО-R1

и ФНО-R2 в плазме крови представляют собой ценные прогностические маркеры [22]. Исследования также показали, что ФНО $\alpha$  может взаимодействовать с другими цитокинами, такими как ИЛ-6, -10 и -2 *in vivo*, для увеличения пролиферации клеток НХЛ [23]. Конститутивная экспрессия мРНК ИЛ-18 – провоспалительного цитокина, участвующего в Th1-иммунном ответе, была обнаружена во многих типах клеток, включая купферовские клетки, моноциты, остеобласты, мононуклеары периферической крови, кератиноциты, дендритные клетки, астроциты, микроглиальные клетки, панкреатические  $\beta$ -клетки. Однако только макрофаги и дендритные клетки секретировали функциональный ИЛ-18 [24]. мРНК ИЛ-18, как и мРНК рецепторов ИЛ-18 (ИЛ-18R $\alpha$  и -18R $\beta$ ), конститутивно и убиквитарно экспрессируется в В-клеточных линиях человека, но при этом не происходит секреции функционирующего белка [25]. Таким образом, конститутивная или спонтанная экспрессия цитокинов в нормальных и в трансформированных клетках не редкое событие. Однако механизмы такой экспрессии до сих пор не поняты.

Для анализа экспрессии генов, связанных с активностью препарата, прежде всего представляют интерес гены, чья активность изменялась при обработке

Таблица 2  
Экспрессия генов интерферонов и цитокинов при действии натрий-карбоксиметилцеллюлозы (NaКМЦ) и госсипол-уксусной кислоты (ГУК) в перевиваемых клетках лимфомы Беркигга и фибробластах эмбриона человека

Культура/концентрация, мг/мл	ИФН-α	ИФН-γ	ИФН-β	λ-1	λ-2	λ-3	ИЛ-1β	ИЛ-2	ИЛ-4	ИЛ-6	ИЛ-8	ИЛ-10	ИЛ-12	ИЛ-17	ИЛ-18	ФНОα	GARDH
P3HR1 NaКМЦ 0,5	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
P3HR1 ГУК 0,02	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
P3HR1 контр.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Daudi NaКМЦ 0,5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Daudi ГУК 0,02	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Daudi контр.	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Raji NaКМЦ 0,05	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Raji ГУК 0,2	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
Raji контр.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Namalva NaКМЦ 0,05	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Namalva ГУК 0,02	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Namalva контр.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
ФЭЧ NaКМЦ 0,5	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
ФЭЧ ГУК 0,02	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
ФЭЧ контр.	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

ЦА клеток ЛБ, а именно генная экспрессия цитокинов ИЛ-1β, -6, -8 и -10.

Провоспалительный цитокин ИЛ-1β экспрессируется в различных тканях и является важным медиатором воспалительного ответа, участвует в регуляции пролиферации клеток, дифференцировке и апоптозе [26]. Среди изученных клеток ЛБ индукцию экспрессии этого гена в ответ на ЦА мы наблюдали только в двух линиях – P3HR-1 и Namalva. Вполне возможно, что обработка ЦА таких лимфомных клеток приводит к активации апоптоза и блокированию пролиферации.

ИЛ-6 участвует в воспалении и созревании В-клеток. Белок, кодируемый геном ИЛ-6, является эндогенным пирогеном и индуцирует лихорадочные состояния у инфекционных больных и людей с аутоиммунными заболеваниями [27]. В случае злокачественной трансформации предполагается, что ИЛ-6 играет важную роль в регуляции опухолевого микроокружения, прогрессии злокачественных клеток и их метастазирования [28]. В клетках Daudi и Raji мы не обнаружили активности гена ИЛ-6. Однако его экспрессия наблюдалась в культуре клеток P3HR-1 и сохранялась при обработке ЦА. Интересно, что в линии клеток Namalva, спонтанно продуцирующей ИФН I типа, не обнаруживалась экспрессия гена ИЛ-6, но при действии препарата происходила его активация.

ИЛ-8 является нейтрофил-специфическим хемотактическим фактором и относится к семейству СХС хемокинов. Продуцируется различными клетками (моноциты, макрофаги, нейтрофилы, лимфоциты, эндотелиальные и эпителиальные клетки) после стимуляции ИЛ-1α, -1β, -17, ФНОα, или толл-подобными рецепторами. Известно, что основной функцией ИЛ-8 является привлечение нейтрофилов к месту инфекции или повреждения [29]. Кроме того, ИЛ-8 как провоспалительный хемокин и ангиогенный фактор связан с различными воспалительными реакциями и, как оказалось, с прогрессированием опухолей [30]. При немелкоклеточной карциноме лёгкого ИЛ-8 сверхэкспрессируется под влиянием протоонкогена KRAS и усиливает стромальный ответ, вызывая воспаление и ангиогенез, которые связаны с пролиферацией опухоли и отрицательно коррелируют с выживанием пациентов [31]. Кроме того, ряд исследований доказывает роль ИЛ-8 в качестве диагностического маркера НХЛ [32]. Повышение уровней экспрессии ИЛ-4, -1 и -8 было обнаружено также при лимфомах MALT (mucosa-associated lymphoid tissue) [33]. В нашем исследовании различных перевиваемых линий клеток ЛБ было обнаружено, что экспрессия гена ИЛ-8 под действием ЦА активировалась как в клетках P3HR-1 и Raji, так и в диплоидных клетках ФЭЧ. Оценка возможной роли ЦА в качестве аттрактанта нейтрофилов, моноцитов и макрофагов нуждается в дополнительных исследованиях.

Плейотропные эффекты ИЛ-10 связаны в основном с иммунорегуляцией и воспалением. ИЛ-10 хорошо известен как фактор ингибиции синтеза цитокинов (CSIF) [34]. Он продуцируется активированными иммунными клетками, подавляет экспрессию Th1 цито-

кинов, ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов ИФН- $\gamma$ , ФНО, ИЛ-1 $\beta$  и -6, МНС антигенов II класса, повышает продукцию антител, пролиферацию и выживание В-клеток, регулирует JAK-STAT сигнальный путь [35]. В настоящее время признана и поддерживается проонкогенная роль ИЛ-10, основанная на его иммуносупрессивных свойствах. Тем не менее установлено, что ВЭБ как один из основных агентов В-клеточной опухолевой трансформации продуцирует собственный вирусный ИЛ-10 (вирИЛ-10), который является гомологом ИЛ-10 человека, с помощью которого подавляется продукция ИФН и усиливаются пролиферация и дифференцировка В-клеток. Предполагается, что, как уже упоминалось ранее, подавление посредством вирИЛ-10 противовоспалительных генов, индуцированных ИЛ-10 человека, с одновременной стимуляцией экспрессии воспалительных генов может отменять противовоспалительные эффекты ИЛ-10 человека [5]. До сих пор не установлена общая роль ИЛ-10 при раке [36]. Известны различные и противоречивые эффекты ИЛ-10, приводящие к опухолевому росту или регрессии опухолей, что может быть связано и с существованием вирусных цитокиновых аналогов. При изучении действия ЦА на активацию гена ИЛ-10 нами было показано, что препарат индуцировал экспрессию в диплоидных ФЭЧ и подавлял его активность в клетках Raji (в широком диапазоне концентраций), Namalva (при концентрации 0,5 мг/мл) и Daudi (5 мг/мл). Не обнаружено действия препарата в клетках P3HR-1. Учитывая, что исследуемые клетки ЛБ являются ВЭБ-трансформированными, вполне можно предположить избирательное действие препарата в качестве индуктора ИЛ-10 в нормальных диплоидных клетках и в качестве супрессора, возможно, присутствующего вирИЛ-10. Однако для доказательства этого предположения необходимо дифференцировать активность генов ИЛ-10 и вирИЛ-10.

Таким образом, в перевиваемых линиях клеток ЛБ выявлено воздействие ЦА на экспрессию генов ИФН- $\lambda$ , ИЛ-1 $\beta$ , -6, -8 и -10. Направленность воздействия зависела от вида клеток и дозы препарата.

Возникает вопрос о вкладе структурных частей молекулы ЦА в регуляцию цитокиновых генов. На этих же линиях клеток мы изучали экспрессию генов цитокинов исходных для синтеза ЦА соединений – На-КМЦ и ГУК. В фибробластах эмбриона человека На-КМЦ практически не влияла на изменение экспрессии цитокиновых генов. Отмечено только подавление экспрессии ИЛ-18 и ФНО $\alpha$ , при этом ГУК подавляла генную активность ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8 и ФНО $\alpha$ . В клетках ЛБ Daudi и P3HR-1 мы также не обнаружили значимых изменений в спектре цитокинов, только в линии клеток P3HR-1 при обработке ГУК в концентрации 0,02 мг/мл наблюдали подавление экспрессии генов ИФН- $\beta$  и ФНО $\alpha$ . В линии клеток Raji На-КМЦ так же, как и в культуре ФЭЧ, подавляла экспрессию ИЛ-18 и ФНО $\alpha$ . Кроме того, отмечены подавление генной экспрессии ИЛ-10 и активация гена ИЛ-8 как при обработке этих клеток На-КМЦ, так и ГУК. Наконец, в

культуре клеток Namalva На-КМЦ подавлял генную экспрессию ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-10 и ФНО $\alpha$ , а ГУК – ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-10.

### Заключение

В перевиваемых линиях клеток ЛБ выявлено действие ЦА на экспрессию генов ИФН- $\lambda$ , ИЛ-1 $\beta$ , -6, -8 и -10. Направленность цитокинового ответа зависела от вида клеток и дозы препарата.

Если при обработке ЦА клеток ЛБ мы наблюдали, в основном, активацию генной экспрессии ИФН- $\lambda$ , ИЛ-1 $\beta$ , -6, -8 и супрессию активности гена ИЛ-10, то при действии На-КМЦ и ГУК выявлено подавление экспрессии генов ИФН- $\beta$ , ИЛ-1 $\beta$ , -10, -18 и ФНО $\alpha$ . Таким образом, при создании синтетической молекулы ЦА мы получили новый эффект по активации экспрессии ряда ключевых генов.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке «Российского фонда фундаментальных исследований» по проекту (гранту) № 18-515-41001\18.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-5, 9-12, 14, 16-36 см. REFERENCES)

- Ершов Ф.И., Киселев О.И. *Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств)*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2005.
- Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н. Интерфероны и индукторы интерферонов. В кн.: Хаитов Р.М., Атауллаханов Р.И., Шульженко А.Е., ред. *Иммунотерапия: руководство для врачей*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2018: 123-47.
- Атаханов А.А., Сарымсаков А.А., Рашидова С.Ш. *Наносистемы целлюлозы и серебра: синтез, структура и свойства*. Ташкент; 2016.
- Хабриев Р.У., ред. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*. М.: Медицина; 2005.
- Платэ Н.А., Васильев А.Е. *Физиологически активные полимеры*. М.: Химия; 1986.

### REFERENCES

- Epstein M.A. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*. 1964; 1(7335): 702-3. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(64\)91524-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(64)91524-7)
- Ndede I., Mining S.K., Patel K., Wanjala F.M., Chumba D., Tenge C. Cytokines associated with Burkitt's lymphoma in western Kenya. *BMC Res. Notes*. 2017; 10(1): 519. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2841-0>
- Miyachi K., Urano E., Yoshiyama H., Komano J. Cytokine signatures of transformed B cells with distinct Epstein-Barr virus latencies as a potential diagnostic tool for B cell lymphoma. *Cancer Sci*. 2011; 102(6): 1236-41. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01924.x>
- Liu Y., de Waal Malefyt R., Briere F., Parham C., Bridon J.M., Banchereau J., et al. The EBV IL-10 homologue is a selective agonist with impaired binding to the IL-10 receptor. *J. Immunol*. 1997; 158(2): 604-13.
- Jog N.R., Chakravarty E.F., Guthridge J.M., Judith A., James J.A. Epstein Barr Virus Interleukin 10 Suppresses Anti-inflammatory Phenotype in Human Monocytes. *Front. Immunol*. 2018; 9: 2198. Doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02198>
- Ershov F.I., Kiselev O.I. *Interferons and Their Inductors (From Molecules to Drugs) [Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств)]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2005. (in Russian)
- Ershov F.I., Narovlyanskiy A.N. Interferons and interferon inducers. In: Khaïtov R.M., Ataullakhanov R.I., Shul'zhenko A.E., eds. *Immunotherapy: A Guide for Doctors [Иммунотерапия: руководство]*

- stvo dlya vrachey]. Moscow: GEOTAR-Media; 2018: 123-47. (in Russian)
8. Atakhanov A.A., Sarymsakov A.A., Rashidova S.Sh. *Nanosystems of Cellulose and Silver: Synthesis, Structure and Properties [Nanosistemy tsellyulozy i serebra: sintez, struktura i svoystva]*. Tashkent; 2016. (in Russian)
  9. Klein G., Dombos L., Gothoskar B. Sensitivity of Epstein-Barr virus (EBV) producer and non-producer human lymphoblastoid cell lines to superinfection with EBV. *Int. J. Cancer*. 1972; 10(1): 44-57. Doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.2910100108>
  10. Klein E., Klein G., Nadkarni J.S., Nadkarni J.J., Wigzell H., Clifford P. Surface IgM kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived cultured lines. *Cancer Res*. 1968; 28(7): 1300-10.
  11. Pulvertaft R.J.V., Cantab M.D. Cytology of Burkitt's tumour (African lymphoma). *Lancet*. 1964; 283(7327): 238-40. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(64\)92345-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(64)92345-1)
  12. Hinuma Y., Konn M., Yamaguchi J., Grace J.T. Replication of Herpes-Type Virus in a Burkitt Lymphoma Cell Line. *J. Virol*. 1967; 1(6): 1045-51.
  13. Khabriev R.U., ed. *Manual on Experimental (Preclinical) Study of New Pharmacological Substances [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv]*. Moscow: Meditsina; 2005. (in Russian)
  14. PrimerBank. PCR Primers for Gene Expression Detection and Quantification. Available at: <https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>
  15. Plate N.A., Vasil'ev A.E. *Physiologically Active Polymers [Fiziologicheski aktivnye polimery]*. Moscow: Khimiya; 1986. (in Russian)
  16. Pickering L.A., Kronenberg L.H., Stewart W.E. Spontaneous production of human interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1980; 77(10): 5938-42. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.77.10.5938>
  17. Mostafavi S., Yoshida H., Moodley D., LeBoite H., Rothamel K., Raj T., et al. Parsing the interferon transcriptional network and its disease associations. *Cell*. 2016; 164(3): 564-78. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.032>
  18. Sarhan J., Liu B.C., Muendlein H.I., Weindel C.G., Irina Smirnova I., Tang A.Y., et al. Constitutive interferon signaling maintains critical threshold of MLKL expression to license necroptosis. *Cell Death Differ*. 2019; 26(2): 332-47. Doi: <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0122-7>
  19. Abt M.C., Osborne L.C., Monticelli L.A., Doering T.A., Alenghat T., Sonnenberg G.F., et al. Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity. *Immunity*. 2012; 37(1): 158-70. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.04.011>
  20. van Kooten C., Rensink I., Aarden L., van Oers R. Cytokines and Intracellular Signals Involved in the Regulation of B-CLL Proliferation. *Leuk. Lymphoma*. 1993; 12(1-2): 27-33. Doi: <https://doi.org/10.3109/10428199309059568>
  21. Purdue M.P., Lan Q., Krickler A., Grulich A.E., Vajdic C.M., Turner J. Polymorphisms in immune function genes and risk of non-Hodgkin Lymphoma: findings from the New South Wales non-Hodgkin Lymphoma Study. *Carcinogenesis*. 2007; 28(3): 704-12. Doi: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgl200>
  22. Warzocha K., Salles G., Bienvenu J., Bastion Y., Dumontet C., Renard N., et al. Tumor necrosis factor ligand-receptor system can predict treatment outcome in lymphoma patients. *J. Clin. Oncol*. 1997; 15(2): 499-508. Doi: <https://doi.org/10.1200/JCO.1997.15.2.499>
  23. Tian T., Wang M., Ma D. TNF- $\alpha$ , a good or bad factor in hematological diseases? *Stem Cell Investig*. 2014; 1: 12. Doi: <https://doi.org/10.3978/j.issn.2306-9759.2014.04.02>
  24. Gardella S., Andrei C., Costigliolo S., Poggi A., Zocchi M.R., Rubartelli A. Interleukin-18 synthesis and secretion by dendritic cells are modulated by interaction with antigen-specific T-cells. *J. Leukoc. Biol*. 1999; 66(2): 237-41.
  25. Lorey S.L., Huang Y.C., Sharna V. Constitutive expression of Interleukin-18 and Interleukin-18 receptor mRNA in tumour derived human B-cell lines. *Clin. Exp. Immunol*. 2004; 136(3): 456-62. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02465.x>
  26. IL1B interleukin 1 beta (Homo sapiens (human)); Gene ID: 3553. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3553>
  27. IL6 interleukin 6 Homo sapiens (human); Gene ID: 3569. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3569>
  28. Anestakis D., Petanidis S., Kalyvas S., Nday C.M., Tsave O., Kioseoglou E., et al. Mechanisms and Applications of Interleukins in Cancer Immunotherapy. *Int. J. Mol. Sci*. 2015; 16(1): 1691-710. Doi: <https://doi.org/10.3390/ijms16011691>
  29. Akdis M., Aab A., Altunbulakli C., Azkur K. Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor  $\beta$ , and TNF- $\alpha$ : Receptors, functions, and roles in diseases. *JACI*. 2016; 138(4): 984-1010. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.033>
  30. Waugh D.J., Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res*. 2008; 14(21): 6735-41. Doi: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-4843>
  31. Sunaga N., Kaira K., Tomizawa Y., Shimizu K., Imai H., Takahashi G., et al. Clinicopathological and prognostic significance of interleukin-8 expression and its relationship to KRAS mutation in lung adenocarcinoma. *Br. J. Cancer*. 2014; 110(8): 2047-53. Doi: <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.110>
  32. Lee H.L., Eom H.S., Yun T., Kim H.J., Park W.S., Nam B.H., et al. Serum and urine levels of interleukin-8 in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Cytokine*. 2008; 43(1): 71-5. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.04.004>
  33. Miyata-Takata T., Takata K., Toji T., Goto N., Kasahara S., Takahashi T., et al. Elevation of serum interleukins 8, 4, and 1 $\beta$  levels in patients with gastrointestinal low-grade B-cell lymphoma. *Sci. Rep*. 2015; 5:18434. Doi: <https://doi.org/10.1038/srep18434>
  34. Wikipedia, The Free Encyclopedia. IL10. Available at: [https://en.wikipedia.org/wiki/Interleukin\\_10](https://en.wikipedia.org/wiki/Interleukin_10)
  35. Sabat R., Grütz G., Warszawska K., Kirsch S., Witte E., Wolk K., et al. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010; 21(5): 331-44. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2010.09.002>
  36. Berti F.C.B., de Oliveira K.B. IL-10 in cancer: Just a classical immunosuppressive factor or also an immunostimulating one? *AIMS Allergy Immunol*. 2018; 2(2): 88-97. Doi: <https://doi.org/10.3934/Allergy.2018.2.88>

Получена 12.03.19

Принята в печать 09.04.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Гулюкин М.И., Капустина О.В., Ездакова И.Ю., Вальциферова С.В., Степанова Т.В., Аноятбеков М.

**ВЫЯВЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ КЛАССОВ G И M К ВИРУСУ ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В СЫВОРОТКАХ КРОВИ**

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

**Введение.** Лейкоз крупного рогатого скота (КРС) – широко распространённая во всём мире инфекция, возбудитель которой – вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) по структурному строению и функциональным особенностям схож с вирусом Т-клеточного лейкоза человека (HTLV-1 и HTLV-2) и рассматривается как актуальная медико-социальная проблема. Изучение иммунного ответа у экспериментально инфицированных телят на ранней стадии развития болезни, синтеза специфических антител классов G (IgG) и M (IgM), диагностической информативности выявления IgM при лейкозе КРС актуально и определяет цель данного исследования.

**Материал и методы.** Образцы крови и сыворотки крови КРС: животных, экспериментально инфицированных ВЛКРС, больных лейкозом КРС; контрольные отрицательные; специфические к гетерологичным возбудителям болезней КРС. Непрямой и сэндвич-вариант твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ ИФА); коммерческие наборы ТФ ИФА (IDEXX, США; ООО «Хема», ФКП Курская биофабрика фирма «БИОК», Россия) для выявления специфических IgG и IgM к ВЛКРС, в реакции иммунодиффузии в агаровом геле (РИД).

**Результаты.** Гуморальный иммунный ответ развивается вскоре после инфицирования – к 1–8-й неделе. IgM выявляются начиная с 3-х суток, а IgG – с 7-х суток после заражения. Обнаружено до 97% совпадений положительных результатов в РИД и непрямом варианте ТФ ИФА на основе моноклональных антител к IgM КРС.

**Обсуждение.** Динамика синтеза антител классов M и G к гликопротеину gp51 ВЛКРС имеет дозозависимый волнообразный характер, согласуется с уровнями повышения/снижения абсолютного и относительного количества лейкоцитов/лимфоцитов крови инфицированных телят.

**Выводы.** Сывороточные специфические IgM обнаружены начиная с 3-х суток после инфицирования ВЛКРС. Ранее выявление IgM в сыворотке крови КРС может быть использовано как дополнительный тест для выявления больных животных.

**Ключевые слова:** крупный рогатый скот; лейкоз крупного рогатого скота; вирус лейкоза крупного рогатого скота; специфические антитела классов G и M; моноклональные антитела к IgM крупного рогатого скота; лимфоцитоз; лимфосаркома

**Для цитирования:** Гулюкин М. И., Капустина О.В., Ездакова И.Ю., Вальциферова С.В., Степанова Т.В., Аноятбеков М. Выявление специфических антител классов G и M к вирусу лейкоза крупного рогатого скота в сыворотках крови. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(4):173-177. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-173-177>

**Информация об авторах:**Гулюкин М.И., <https://orcid.org/0000-0002-7489-6175>Капустина О.В., <https://orcid.org/0000-0002-7382-8656>Ездакова И.Ю., <https://orcid.org/0000-0002-8467-4920>Вальциферова С.В., <https://orcid.org/0000-0002-5731-8955>Степанова Т.В., <https://orcid.org/0000-0001-9092-8045>Аноятбеков М., <https://orcid.org/0000-0002-0180-0574>

**Для корреспонденции:** Гулюкин Михаил Иванович, д-р вет. наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, руководитель научного направления ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, 109428, г. Москва. E-mail: [admin@viev.ru](mailto:admin@viev.ru)

Gulyukin M.I., Kapustina O.V., Ezbekova I.Yu., Valtziferova S.V., Stepanova T.V., Anoyatbekov M.

**DETECTION OF SPECIFIC ANTIBODIES OF CLASSES G AND M TO BOVINE LEUKEMIA VIRUS IN THE BLOOD SERUM**

Federal Scientific Centre VIEV, Moscow, 109428, Russian Federation

**Introduction.** Bovine leukemia is a widespread infection worldwide, the causative agent of which is the bovine leukemia virus (BLV) in structural structure and functional features similar to human T-cell leukemia virus (HTLV-1 and HTLV-2) and it is considered as an actual medical and social problem. The study of the immune response in experimentally infected calves at an early stage of the disease development, synthesis of specific antibodies of classes G and M (IgG and IgM), diagnostic informativeness of detection of IgM in cattle leukemia is relevant and determines the purpose of this study.

**Material and methods.** Samples of blood and serum of cattle: animals experimentally infected with VLKRS, patients with cattle leukemia; control negative; specific to heterologous pathogens of cattle diseases. Indirect and sandwich variant enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); commercial ELISA kits (IDEXX, USA; Hema LLC, FKP Kursk Biofactory Firm BIOK, Russia) for the detection of specific IgG and IgM for BLV in the agar gel immunodiffusion reaction (RID).

**Results.** The humoral immune response develops shortly after infection — by 1–8 weeks. IgM are detected starting from the 3<sup>rd</sup> day, and IgG from the 7<sup>th</sup> day after infection. Up to 97% of coincidence of positive results in RID and indirect variant of TF ELISA based on monoclonal antibodies to cattle IgM (IgM<sub>bovine</sub>) were found.

**Discussion.** The dynamics of the synthesis of antibodies of classes M and G to the glycoprotein gp 51 BLV has a dose-dependent wave-like character, is consistent with the levels of increase / decrease in the absolute and relative number of leukocytes / blood lymphocytes of infected calves.

**Findings.** Serum specific IgM was detected starting 3 days after infection with BLV. Early detection of IgM in serum of cattle can be used as an additional test for the detection of sick animals.

**Keywords:** *cattle; cattle leukemia; cattle leukemia virus; specific antibodies of classes G and M; monoclonal antibodies to IgM<sub>bovine</sub>; lymphocytosis; lymphosarcoma.*

**For citation:** Gulyukin M. I., Kapustina O.V., Ezdakova I.Yu., Valtsiferova S.V., Stepanova T.V., Anoyatbekov M. Detection of specific antibodies of classes G and M to bovine leukemia virus in the blood serum. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(4): 173-177. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-173-177>

**For correspondent:** Mikhail I. Gulyukin, Dr. Sci., Professor, Honored Scientist, Academician of the Russian Academy of Sciences, Federal Scientific Centre VIEV (FSC VIEV), Moscow, 109428, Russian Federation. E-mail: [admin@viev.ru](mailto:admin@viev.ru)

**Information about authors:**

Gulyukin M.I., <https://orcid.org/0000-0002-7489-6175>  
Kapustina, O.V., <https://orcid.org/0000-0002-7382-8656>  
Ezdakova, I.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8467-4920>  
Valtsiferova, S.V., <https://orcid.org/0000-0002-5731-8955>  
Stepanova T.V., <https://orcid.org/0000-0001-9092-8045>  
Anoyatbekov M., <https://orcid.org/0000-0002-0180-0574>

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

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

Received 14 June 2019

Accepted 10 October 2019

## Введение

Среди инфекционных болезней животных лейкоз крупного рогатого скота (КРС) представляет одну из наиболее сложных и до конца не решённых проблем ветеринарной медицины, требующих научно обоснованного практического решения [1, 2]. Лейкозы животных диагностируются практически во всём мире. Вирус лейкоза КРС (ВЛКРС) вызывает пожизненную инфекцию, которая может протекать как в асимптоматической форме, так и в форме персистентного лимфоцитоза и лимфосаркомы, особенно среди животных молочного направления продуктивности. Около 60% инфицированных ВЛКРС животных не имеют клинических признаков, у 30% развивается стойкий лимфоцитоз, а оставшиеся 10% погибают вследствие лимфосаркомы [3, 4]. После опубликования серий работ о близком генетическом и антигенном родстве ВЛКРС с вирусом Т-клеточного лейкоза человека (HTLV-1 и HTLV-2) [5], а также о роли ВЛКРС как потенциального предрасполагающего фактора при раке молочной железы у женщин [6–8] вопросы диагностики, профилактики и искоренения лейкоза КРС приобретают особую актуальность.

Раннее и своевременное выявление инфицированных животных, развивающейся инфекции, в том числе онкологической стадии болезни, – один из ключевых моментов диагностики и профилактики лейкоза среди поголовья КРС [3, 8, 9]. Согласно рекомендациям Международного эпизоотического бюро (МЭБ), методами серодиагностики лейкоза КРС являются реакция иммунодиффузии в агаровом геле (РИД) и метод иммуноферментного анализа (ИФА) [4].

В последнее время исследования механизмов формирования иммунного ответа привели к рассмотрению иммуноглобулинов класса М (IgM) в качестве потенциального диагностического и терапевтического агента [10, 11]. Естественные IgM открывают новую область диагностики и терапии неопластических болезней [12]. Известно, что IgM являются первыми антителами, синтезируемыми в ответ на чужеродный антиген. Эти иммуноглобулины синтезируются двумя субпопуляциями В-клеток: В1 и В2. Мишенями для

ВЛКРС являются CD5<sup>+</sup> В1-клетки, экспрессирующие IgM, поэтому В1-клетки первично инфицированных животных будут синтезировать специфические IgM в первые сутки после заражения [13, 14]. В этих клетках не происходит переключение изотипа на иммуноглобулины класса G (IgG).

Клинических исследований диагностической информативности выявления IgM при инфекционных болезнях животных, в частности при лейкозе КРС, в научной литературе существенно меньше, чем исследований, касающихся IgG. Этот факт объясняется более ранней разработкой технологии получения моноклональных антител (МКА) к IgG и проблемами, связанными с разработкой высокочувствительных лабораторных технологий выделения и определения IgM.

В связи с вышеизложенным очевидно, что изучение динамики синтеза IgM и выявление их в сыворотке крови КРС, инфицированного ВЛКРС, актуально и представляет большой практический интерес.

**Целью** данного исследования было изучение динамики синтеза специфических сывороточных IgG и IgM на ранней стадии развития болезни у телят, экспериментально инфицированных ВЛКРС.

## Материал и методы

Эксперимент проводили на телятах чёрно-пёстрой голштинизированной породы ( $n=11$ ) в возрасте 5–8 мес. Животные были разделены на 3 группы: интактные животные (контроль;  $n=3$ ) и 2 опытные группы (в каждой по 4 животных), экспериментально инфицированные внутривенно полевым изолятом ВЛКРС: 1-я группа – по 2 см<sup>3</sup>/голову; 2-я группа – по 5 см<sup>3</sup>/голову цельной крови коровы-донора, больной лейкозом КРС (серологически, гематологически, ИФА- и ПЦР-положительной).

Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу Минздрава СССР от 12.08.1977 № 755).

В эксперименте использовали образцы сыворотки

крови КРС, полученные от экспериментально инфицированных животных; сыворотки крови КРС, больного лейкозом (гематологически- и ПЦР-положительные); контрольные отрицательные сыворотки крови КРС, специфические к гетерологичным возбудителям болезней КРС (вирусной диареи КРС, инфекционного ринотрахеита КРС, парагриппа-3). Объём каждого образца сыворотки составлял не менее 1,0 мл. Аликвоты всех сывороток (по 0,2 мл) до использования хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Антитела к ВЛКРС выявляли в лаборатории лейкологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН с помощью РИД, используя набор ФКП Курская биофабрика фирма «БИОК» (Россия).

Изотип продуцируемых антител к ВЛКРС определяли в непрямом и сэндвич-вариантах твердофазного иммуоферментного анализа (ТФ ИФА) на основе МКА к IgM и IgG. Учёт и интерпретацию результатов реакции осуществляли на фотометре микропланшетного формата Thermo Scientific Multiskan FC при длине волны 450 нм.

Для выявления общего пула IgM в сыворотках крови КРС использовали разработанный сэндвич-вариант ТФ ИФА на основе неконкурирующих МКА к эпитопам IgM – МКА клона С2 и пероксидазного конъюгата МКА клона G9. Сыворотку считали положительной, если её оптическая плотность ( $ОП_{450}$ ) в 2,1 раза и более превышала таковую отрицательной контрольной сыворотки. Выявляемые значения  $ОП_{450}$  прямо пропорциональны концентрации антител в исследуемой пробе.

Для выявления специфических IgG и IgM к ВЛКРС в сыворотках крови КРС использовали коммерческие наборы ТФ ИФА (IDEXX, США; ООО «Хема», Россия), согласно инструкциям производителя.

Статистическая обработка цифровых данных, полученных в результате экспериментальных исследований, выполнена с использованием стандартных программ и включала подсчёт средних арифметических ( $M$ ), стандартных ошибок ( $m$ ) и стандартных отклонений ( $\sigma$ ). Уровень значимости вариационных рядов оценивали с использованием параметрического  $t$ -критерия Стьюдента.

### Результаты

Известно, что специфические антитела к поверхностным антигенам (gp51) вырабатываются раньше, чем к внутренним структурным белкам ВЛКРС [15, 16]. В связи с этим была изучена динамика синтеза специфических IgG и IgM к gp51 ВЛКРС на начальной стадии развития первичной инфекции у телят, экспериментально инфицированных ВЛКРС.

На рисунках 1 и 2 показано, что у животных контрольной группы до 65 сут после инокуляции (п/и; срок наблюдения) специфические IgG и IgM к gp51 ВЛКРС не выявлены. У всех инфицированных животных развился специфический гуморальный ответ на ВЛКРС. Результаты изучения динамики продукции специфических антител на начальной стадии развития инфекции показали дозозависимый характер их синтеза.

Также установлен волнообразный (перемежающийся)

характер синтеза IgM (см. рис. 1). Начальный фоновый уровень IgM не превышал 40 международных единиц (EU) ТФ ИФА. Диагностически значимый уровень IgM обнаружен начиная с 3-х суток п/и во 2-й опытной группе. К 5–7-м суткам специфические антитела обнаружены в обеих опытных группах, что соответствует повышению относительного количества В-лимфоцитов фенотипа sIgM<sup>+</sup> и CD5<sup>+</sup> (до 98,7–100% sIgM<sup>+</sup> и 46% CD5<sup>+</sup>; в контрольной группе – 17,3% sIgM<sup>+</sup>; 22,1% CD5<sup>+</sup>). Кроме того, во 2-й группе животных в период до 7 сут п/и выявлены более высокие относительное количество и процент специфических IgM. Хотя на 7-е сутки отмечено снижение относительного количества IgM во 2-й группе, процент IgM к gp51 ВЛКРС в обеих группах по отношению к общему пулу IgM максимальный: 97/97 и 89/86 в 1-й и 2-й группах, соответственно. К 14-м суткам продукция IgM к gp51 снижается в обеих группах, а к 21-м суткам повышается. В дальнейшем животные оставались IgM-серопозитивными на диагностически детектируемом уровне в течение 65 сут (срок наблюдения), причём уровень IgM к gp51 в 1-й группе незначительно превышал таковой у животных 2-й группы (79/75 – 21 сут; 72/67 – 28 сут; 65/62 – 65 сут).

Как видно из представленных на рис. 2 данных, синтез специфических IgG на начальной стадии развития инфекции также является дозозависимым. IgG к gp51 удалось выявить на диагностически значимом уровне у животных 2-й группы начиная с 7-х суток п/и, что соответствует повышению относительного количества



Рис. 1. Выявление специфических IgM к gp51 ВЛКРС в сыворотке крови экспериментально инфицированных телят.

По оси абсцисс – сроки (сутки) отбора проб сывороток у интактных (контрольная группа) и инфицированных (1-я и 2-я группы) телят. По оси ординат – относительное количество специфических IgM к gp51 ВЛКРС в международных единицах твердофазного иммуоферментного анализа (EU ТФ ИФА).



Рис. 2. Выявление специфических IgG к gp51 ВЛКРС в сыворотке крови экспериментально инфицированных телят. По оси абсцисс – сроки (сутки) отбора проб сывороток у интактных (контрольная группа) и инфицированных (1-я и 2-я группы) телят. По оси ординат – относительное количество специфических антител класса G к gp51 ВЛКРС в международных единицах твердофазного иммуноферментного анализа (ЕУ ТФ ИФА).

В-лимфоцитов (98,7% sIgM<sup>+</sup>, в контрольной группе – 17,3%). Начиная с 14-х суток, п/и специфические IgG выявляли в обеих группах. Однако до 21-х суток п/и их уровень во 2-й группе был выше: 102/65; после 21-х суток – 188/114. Пик накопления IgG приходился на 28 суток п/и с последующим снижением антителогенеза к 65-м суткам (срок наблюдения). В этот период также отмечено незначительное превышение уровня IgG у животных 1-й группы по сравнению с показателем 2-й группы. На 21-е сутки п/и обнаружено повышение относительного количества лимфоцитов от числа лейкоцитов 80,5% (2-я группа), 83,5% (1-я группа) против 62–63% на 14-е сутки п/и. Однако во 2-й группе, абсолютное количество лимфоцитов оставалось на уровне фона (7,1 тыс. кл/мкл), а в 1-й группе увеличилось в 2 раза – 14,5 тыс. кл/мкл. На 28-е сутки п/и относительное количество лимфоцитов сохранялось на уровне 21-х суток (80–84%), тогда как абсолютное количество лимфоцитов увеличилось в 1-й группе в 1,8 раза, а во 2-й – в 2,1 раза и составило 26,4 тыс. кл/мкл. Следует отметить, что с 28-х по 65-е сутки (до конца срока наблюдения) уровень IgG в 1-й группе был выше.

Также при исследовании мазков крови и выделенных лимфоцитов крови от инфицированных телят отмечено изменение морфологии лимфоцитов: появление на 21–28-е сутки п/и аномальных клеток Ридера и теней Боткина–Гумпрехта, количество которых увеличивалось к 65-м суткам (срок наблюдения).

### Обсуждение

IgM вырабатываются при первичном инфицировании, в острый период инфекции или при активизации

хронической инфекции, а затем постепенно исчезают [17]. Согласно данным литературы, антитела к ВЛКРС могут быть обнаружены через 3–16 нед после заражения [3, 8, 15, 18, 19].

Однако проведенные нами исследования проб сывороток крови телят, экспериментально инфицированных ВЛКРС, на наличие IgG и IgM показали, что гуморальный иммунный ответ развивается вскоре после заражения (1-я неделя п/и) и является дозозависимым. В начальный период после заражения характер синтеза специфических IgG- и IgM-антител к ВЛКРС отличается. Пик накопления IgM к gp51 начальной стадии развития болезни приходился на 5–7-е сутки п/и, тогда как IgG к gp51 у клинически нормальных экспериментально инфицированных телят на 28-е сутки п/и. Следует отметить обнаружение IgM к gp51 ВЛКРС у клинически нормальных экспериментально инфицированных телят на начальной стадии развития болезни с 3–5-го дня по 8-ю неделю п/и.

Результаты исследования иммунного ответа на заражение телят ВЛКРС показали, что динамика синтеза IgG и IgM к gp51 носит перемежающийся (волнообразный) характер, ассоциирована с уровнями повышения/снижения абсолютного и относительного количества лейкоцитов/лимфоцитов в крови инфицированных. По данным N.A. Gillet и соавт., данный процесс соответствует прерывистому периодическому всплеску репликации вируса в лимфоидных тканях, отличных от периферической крови с клиренсом вновь инфицированных клеток [20].

Максимальная продукция IgM, обнаруженная на 5–7-е сутки п/и, соответствует высокому уровню абсолютного количества лимфоцитов. К этому времени увеличивались интенсивность и плотность экспрессии рецепторов sIgM<sup>+</sup> и CD5<sup>+</sup> на В-лимфоцитах, особенно во 2-й группе. Тенденция к повышению/снижению продукции IgG и IgM отмечена в некоторых работах [3, 19] и подтверждается в наших исследованиях. Снижение продукции IgM соответствовало снижению экспрессии sIgM<sup>+</sup> и CD5<sup>+</sup> на В-лимфоцитах и изменению морфологии выделенных лимфоцитов крови инфицированных телят. Так, к 65-м суткам п/и, особенно у телят 2-й группы, отмечали снижение экспрессии рецепторов sIgM<sup>+</sup> и CD5<sup>+</sup> на В-лимфоцитах, появление В-лимфоцитов с цитоплазматической локализацией IgM, гибель 85% лимфоцитов, появление на 21–28-е сутки п/и аномальных клеток Ридера и теней Боткина–Гумпрехта, что согласуется с данными D. Wu и др. (1996) [13], J. Naessens (1997) [21], A.N. Khvastunova и др. (2015) [22], И.Ю. Ездаковой (2018) [23].

Установлено, что на 28-е сутки п/и (в данном опыте – время выявления специфических антител в РИД) при уровне специфических IgG в сыворотке инфицированных телят >60 ЕУ ИФА выявляется до 97% совпадений положительных результатов в РИД и ИФА.

### Выводы

1. Изучение иммунного ответа в ранние сроки после экспериментального заражения телят показало, что к 1–8-й неделям появляются признаки развития инфек-

ции, в том числе антивирусный гуморальный иммунный ответ. Динамика синтеза IgG и IgM к gp51 ВЛКРС носит перемежающийся (волнообразный) характер, согласуется с уровнями повышения/снижения абсолютного и относительного количества лейкоцитов/лимфоцитов в крови инфицированных телят и соответствует прерывистому периодическому всплеску репликации вируса с клиренсом вновь инфицированных клеток.

2. Специфические IgM к ВЛКРС обнаружены в сыворотках крови экспериментально инфицированных ВЛКРС телят начиная с 3-х суток п/и. На 28-е сутки п/и обнаружено до 97% совпадений положительных результатов в РИД и непрямом варианте ТФ ИФА на основе МКА к IgM<sub>кРС</sub>.

3. Раннее обнаружение специфических IgM в сыворотке крови КРС может быть использовано как дополнительный тест для выявления животных, инфицированных ВЛКРС.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2, 4-6, 9, 11-15, 18, 20-22 см. REFERENCES)

- Гулюкин М.И., Валихов А.Ф., Нахмансон В.М., Иванова Л.А., Грек К.П., Лопунов С.В. Особенности инфекционного процесса, индуцированного вирусом лейкоза крупного рогатого скота. *Ветеринарный Консультант*. 2008; (19): 7-9.
- Климов Е.А., Косовский Г.Ю. К вопросу о возможности заражения человека вирусом лейкоза крупного рогатого скота. *Ветеринарная медицина*. 2012; (2): 9-10.
- Двоглазов Н. Г., Храмов В.В., Агаркова Т.А., Осипова Н.А. Сравнительный анализ применения ИФА и РИД при диагностике лейкоза крупного рогатого скота. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 2015; (1): 89-93.
- Ездакова И.Ю., Еремина М.А., Попова Е.В. Мониторинг состояния иммунитета у быков-производителей молочных и мясных пород. *Российская сельскохозяйственная наука*. 2016; (1): 42-4.
- Глазко В.И., Косовский Г.Ю., Глазко Т.Т., Донник И.М. Клеточные и Надклеточные уровни взаимодействия ретровирусов с хозяином на примере вируса бычьего лейкоза. Сообщение I. Проникновение в клетку и интеграция в геном хозяина. *Сельскохозяйственная биология*. 2018; (53)6: 1093-106. Doi: <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2018.6.1093rus>
- Герловский Д.О. Прикладные аспекты иммунологии: Курс лекций. Минск; 2016.
- Жижонкова А.В., Гугушвили Н.Н., Инюкина Т.А., Инюкин А.Ф., Лапшанков С.Г., Лысенко А.А. Состояние гуморального иммунитета при лейкозе. В кн.: «Научное обеспечение агропромышленного комплекса»: Материалы X Всероссийской конференции молодых ученых. Краснодар; 2017: 187-8.
- Ездакова И.Ю., Капустина О.В. Определение В-клеток в крови крупного рогатого скота методом иммунопероксидазного окрашивания. *Российская сельскохозяйственная наука*. 2018; (3): 40-3.
- Bartlett P.C., Sordillo L.M., Byrem T.M., Norby B., Grooms D.L., Swenson C.L., et al. Options for the control of bovine leukemia virus in dairy cattle. *Am. Vet. Med. Assoc.* 2014; 244(8): 914-22. Doi: <https://doi.org/10.2460/javma.244.8.914>
- Panel E.A. Scientific opinion on enzootic bovine leukosis. *EFSA Journal*. 2015; 13(7): 4188.
- Gulyukin M.I., Valikhov A.F., Nakhmanson V.M., Ivanova L.A., Grek K.P., Lopunov S.V. Features of the infectious process induced by cattle leukemia virus. *Veterinary Consultant*. 2008; (19): 7-9. (in Russian)
- World Animal Health Information Database. OIE. Enzootic bovine leukosis. Available at: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
- Aida Y., Murakami H., Takahashi M., Takeshima S.N. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus. *Front. Microbiol.* 2013; 4: 328. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00328>
- Olaya N., Corredor A., Gutierrez M.F. Bovine Leukemia: Zoonosis Associated with Breast Cancer in Humans? *J. Med. Surg. Pathol.* 2016; (1): 2-4.
- Klimov E.A., Kosovskiy G.Yu. To the question of the possibility of human infection with the cattle leukemia virus. *Veterinarnaya meditsina*. 2012; (2): 9-10. (in Russian)
- Dvoeglazov N. G., Khramtsov V.V., Agarkova T.A., Osipova N.A. A comparative analysis of the use of ELISA and RID in the diagnosis of cattle leukemia. *Sibirskiy vestnik sel'skokhozyaystvennoy nauki*. 2015; (1): 89-93. (in Russian)
- Trono K.G., Pérez-Filgueira D.M., Duffy S., Borca M.V., Carrillo C. Seroprevalence of bovine leukemia virus in dairy cattle in Argentina: Comparison of sensitivity and specificity of different detection methods. *Vet. Microbiol.* 2001; 83(3): 235-48. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(01\)00420-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(01)00420-5)
- Ezdakova I.Yu., Eremina M.A., Popova E.V. Monitoring the state of immunity in bulls producing dairy and meat breeds. *Rossiyskaya sel'skokhozyaystvennaya nauka*. 2016; (1): 42-4. (in Russian)
- Mason D.Y., Cordell J.L., Tse A.G.D., van Dongen J.J., van Noesel C.J., Micklem K., et al. The IgM-associated protein mb-1 as a marker of normal and neoplastic B cells. *J. Immunol.* 1991; 147(11): 2474-82.
- Barrett J. Antibody darts on target for acute myelogenous leukemia A. *Ann. Transl. Med.* 2017; 5(4): 80. Doi: <https://doi.org/10.21037/atm.2017.01.54>
- Wu D., Takahashi K., Murakami K., Tani K., Koguchi A., Asahina M., et al. B-1a, B-1b and conventional B cell lymphoma from enzootic bovine leukosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1996; 55(1-3): 63-72. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(96\)05631-0](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(96)05631-0)
- Baumgarth N. B1 cell heterogeneity and the regulation of natural and antigen induced IgM production. *Front. Immunol.* 2016; 7: 324. Doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00324>
- Gutiérrez G., Alvarez I., Fondevila N., Politzki R., Lomónaco M., Rodríguez S., et al. Detection of bovine leukemia virus specific antibodies using recombinant p24-ELISA. *Vet. Microbiol.* 2009; 137(3-4): 224-34. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.022>
- Glazko V.I., Kosovskii G.Yu., Glazko T.T., Donnik I.M. Cellular and extracellular levels of retrovirus-host interactions on the example of the bovine leukose virus. I. Cell penetration and integration into the host genome. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2018; (53)6: 1093-106. (in Russian) Doi: <https://doi.org/10.15389/agrobiol.2018.6.1093eng>
- Gerlovskiy D.O. *Applied Aspects of Immunology: Lecture Course [Priladnye aspekty immunologii: Kurs lektiy]*. Minsk; 2016. (in Russian)
- Choi K.Y., Liu R.B., Buehring G.C. Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immunosorbent assay, and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle. *J. Virol. Methods*. 2002; 104(1): 33-9. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(02\)00040-x](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(02)00040-x)
- Zhizhonkova A.V., Gugushvili N.N., Inyukina T.A., Inyukin A.F., Lapshankov S.G., Lysenko A.A. The state of humoral immunity in leukemia. In: «Scientific Support of the Agro-Industrial Complex»: Materials of the X All-Russian Conference of Young Scientists [«Nauchnoe obespechenie agropromyshlennogo kompleksa»: Materialy X Vserossiyskoy konferentsii molodykh uchenykh]. Krasnodar; 2017: 187-8. (in Russian)
- Gillet N.A., Gutiérrez G., Rodríguez S.M., de Brogniez A., Renotte N., Alvarez I., et al. Massive Depletion of Bovine Leukemia Virus Proviral Clones Located in Genomic Transcriptionally Active Sites during Primary Infection. *PLoS Pathog.* 2013; 9(10): e1003687. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003687>
- Naessens J. Surface Ig on B lymphocytes from cattle and sheep. *Int. Immunol.* 1997; 9(3): 349-54. Doi: <https://doi.org/10.1093/intimm/9.3.349>
- Khvastunova, A.N., Kuznetsova S.A., Al-Radi L.S., Vylegzhanina A.V., Zakirova A.O., Fedyanina O.S., et al. Anti-CD antibody microarray for human leukocyte morphology examination allows analyzing rare cell populations and suggesting preliminary diagnosis in leukemia. *Sci. Rep.* 2015; 5: 12573. Doi: <https://doi.org/10.1038/srep12573>
- Ezdakova I.Yu., Kapustina O.V. Determination of b cells in the blood of cattle by immunoperoxidase staining. *Rossiyskaya sel'skokhozyaystvennaya nauka*. 2018; (3): 40-3. (in Russian)

Поступила 14.06.19

Принята в печать 10.10.19

Нефедченко А. В.<sup>1</sup>, Южаков А.Г.<sup>2</sup>, Котенева С.В.<sup>1</sup>, Глотова Т.И.<sup>1</sup>, Гловов А.Г.<sup>1</sup>,  
Забережный А.Д.<sup>3</sup>

## ВЫЯВЛЕНИЕ ДНК ГЕРПЕСВИРУСА ЧЕТВЕРТОГО ТИПА У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА ПРИ ПОМОЩИ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

<sup>1</sup>ФГБУН Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН (СФНЦА РАН), Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, 630501, Новосибирская обл., Новосибирский район, пос. Краснообск, Россия;

<sup>2</sup>Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

<sup>3</sup>ФГБНУ ФНЦ Институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко, 109428, г. Москва, Россия

**Введение.** В аспекте экономически значимых инфекций герпесвирус крупного рогатого скота (КРС) 4-го типа (BoHV-4) слабо изучен. Данных о циркуляции вируса среди животных и его роли в инфекционной патологии в России недостаточно.

Цели и задачи исследования: разработка полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени для обнаружения ДНК вируса и изучение частоты его выявления в пробах биоматериала от животных с различной клинической патологией в моноварианте и в ассоциациях с другими вирусами.

**Материал и методы.** Мишенью для амплификации служили нуклеотидные последовательности гена гликопротеина L. Для анализа и конструирования праймеров использовали последовательности референтных штаммов, опубликованные в GenBank. Исследования проводили в 3 регионах Западной Сибири на 5 крупных молочных комплексах.

**Результаты.** 27,7% проб биоматериала содержали геном вируса. Вирус присутствовал в моноварианте в смывах из носовой полости телят (80,0%), лёгких (46,2%) и бронхиальных лимфатических узлах (38,5%) при пневмониях. При диареях вирус выявили в 20% проб, а у коров с гинекологической патологией – в 10,0% проб. При респираторных болезнях телят вирус выявляли в ассоциации с вирусами инфекционного ринотрахеита КРС (BoHV-1) (21,6%) и коронавируса КРС (BoCV) (20,3%), а при гинекологической патологии коров – с вирусом вирусной диареи КРС 1-го типа (BVDV1) (6%).

**Обсуждение.** По результатам филогенетического анализа, из 5 выявленных изолятов вируса, четыре принадлежали к Американской ветви штаммов и один – к Европейской. Американские штаммы циркулировали на территории Республики Казахстан (1), Тюменской (1) и Новосибирской (2) областей, а европейский изолят был выделен от животных в Новосибирской области.

**Заключение.** При интенсивном развитии молочного животноводства в России актуальны поиск вирусных агентов, участвующих в этиологии инфекционной патологии животных, а также изучение генетического разнообразия вирусов, циркулирующих на конкретной ферме, в том числе завезённых из других стран.

**Ключевые слова:** крупный рогатый скот; герпесвирус 4-го типа; гликопротеин L; ПЦР в режиме реального времени; филогенетический анализ.

**Для цитирования:** Нефедченко А.В., Южаков А.Г., Котенева С.В., Глотова Т.И., Гловов А.Г., Забережный А.Д. Выявление ДНК герпесвируса четвертого типа у крупного рогатого скота при помощи ПЦР в режиме реального времени. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(4):178-184. DOI:<https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-178-184>

### Информация об авторах:

Нефедченко А.В., <http://orcid.org/0000-0002-4181-4268>

Южаков А.Г., <http://orcid.org/0000-0002-0426-9678>

Котенева С.В., <http://orcid.org/0000-0003-2649-7505>

Глотова Т.И., <http://orcid.org/0000-0003-3538-8749>

Гловов А.Г., <http://orcid.org/0000-0002-2006-0196>

Забережный А.Д., <http://orcid.org/0000-0001-7635-2596>

**Для корреспонденции:** Гловов Александр Гаврилович, д-р вет. наук, профессор, зав. лабораторией биотехнологии – диагностический центр СФНЦА РАН, 630501, Новосибирская обл., Новосибирский район, пос. Краснообск.  
E-mail: [glotov\\_vet@mail.ru](mailto:glotov_vet@mail.ru)

Nefedchenko A.V.<sup>1</sup>, Yuzhakov A.G.<sup>2</sup>, Koteneva S.V.<sup>1</sup>, Glotova T.I.<sup>1</sup>, Glotov A.G.<sup>1</sup>, Zaberezhny A.D.<sup>3</sup>

## DETECTION OF BOVINE HERPESVIRUS 4 DNA IN CATTLE BY REALTIME PCR

<sup>1</sup>Siberian Federal Scientific Centre of Agro-Biotechnologies of the Russian Academy of Science, Institute of Experimentally Veterinary Medicine of Siberia and Far East, Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501, Russian Federation;

<sup>2</sup>D.I. Ivanovsky Institute of Virology «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 109428, Russian Federation;

<sup>3</sup>All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after Ya.R. Kovalenko, Moscow, 109428, Russian Federation

**Introduction.** BoHV-4 is poorly understood. Data on the circulation of the virus among animals and its role in infectious diseases insufficient.

**Aims and goals.** Development of real-time PCR for detecting the BoHV-4 and studying the frequency of its presence in samples from sick animals.

**Material and methods.** The nucleotide sequences of the glycoprotein L gene served as a target for amplification. The sequences of reference strains published in GenBank were used to analyze and design the primers. Studies were conducted in 3 regions of Western Siberia on 5 large dairy farms.

**Results.** 27.7% of samples contained the virus. The virus was present as a monoagent in nasal cavity of calves (80.0%), lungs (46.2%) and bronchial lymph nodes (38.5%) in pneumonia. In the cases of diarrhea the virus was detected in 20%, and in cows with gynecological pathology in 10.0%. In respiratory diseases of calves the virus was detected in association with BoHV-1 (21.6%) and BoCV (20.3%), and in gynecological pathology of cows with BVDV1 (6%).

**Discussion.** According to the phylogenetic analysis of 5 identified virus isolates, four belonged to the American branch and one to the European branch. The circulation of American strains occurred in the territory of the Republic of Kazakhstan (1), Tyumen (1) and Novosibirsk (2) regions, and the European - in the Novosibirsk region.

**Conclusion.** The search for viruses involved to the infectious pathology, as well as studying the genetic diversity of viruses circulating on a particular farm including imported from other countries, is relevant.

**Keywords:** cattle; herpes virus type 4; glycoprotein L; real-time PCR; phylogenetic analysis.

**For citation:** Nefedchenko A.V., Yuzhakov A.G., Koteneva S.V., Glotova T.I., Glotov A.G., Zaberezhny A.D. Detection of bovine herpesvirus 4 DNA in cattle by realtime PCR. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(4):178-184. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-178-184>

**For correspondence:** Alexander G. Glotov, Dr. Sci. Veter., Professor, Head of laboratory Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Science, Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501, Russian Federation. E-mail: [glotov\\_vet@mail.ru](mailto:glotov_vet@mail.ru)

#### Information about authors:

Nefedchenko A.V., <http://orcid.org/0000-0002-4181-4268>

Yuzhakov A.G., <http://orcid.org/0000-0002-0426-9678>

Koteneva S.V., <http://orcid.org/0000-0003-2649-7505>

Glotova T.I., <http://orcid.org/0000-0003-3538-8749>

Glotov A.G., <http://orcid.org/0000-0002-2006-0196>

Zaberezhny A.D., <http://orcid.org/0000-0001-7635-2596>

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

**Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

Received 24 January 2019

Accepted 09 April 2019

## Введение

Вирусные инфекции широко распространены во всём мире и наносят значительный экономический ущерб животноводству, особенно при интенсивном типе ведения [1–5]. В этиологии так называемых экономически значимых инфекций принимают участие многие вирусы, среди которых значительная роль принадлежит вирусам семейства *Herpesviridae* [6]. Относительно слабо изучен в этом аспекте герпесвирус крупного рогатого скота (КРС) 4-го типа (BoHV-4).

Согласно современной классификации, BoHV-4 относится к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Gammaherpesvirinae*, роду *Rhadinovirus* и отличается от большинства изолятов герпесвирусов, выделенных от жвачных животных [6]. Впервые вирус был выделен в Венгрии от телят с респираторной и глазной патологиями [7, 8]. Впоследствии агент был выделен во многих странах от животных при абортках, эндометритах, пневмониях, диарее, респираторных инфекциях, пустулёзном дерматите вымени, а также от клинически здоровых животных [9–11]. Воспроизвести болезнь экспериментально удавалось не всегда, поэтому роль вируса в инфекционной патологии КРС до сих пор неясна [10]. Подобно другим герпесвирусам, BoHV-4 способен устанавливать латентное состояние (персистентную инфекцию) после первичной её острой формы. Несмотря на то, что BoHV-4 был идентифицирован во многих тканях во время персистирующей инфекции, накопленные данные свидетельствуют о том, что преимущественным сайтом персистенции являются клетки линии моноцитов / макрофагов [11].

В литературе описаны ассоциации этого вируса с другими патогенами при метритах, в том числе с бактериями [12–15].

Кроме крупного рогатого скота BoHV-4 может инфицировать широкий спектр жвачных животных, включая американского бизона, американского буйвола, овец и коз [10].

В СССР выделение вируса впервые было описано Н.Н. Крюковым и соавт. [16], а выявление его генома при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) – Л.Б. Прохвятиловой и соавт. [17].

Данных о циркуляции вируса среди КРС и его роли в инфекционной патологии в нашей стране недостаточно.

В связи с этим целью настоящего исследования была разработка ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) для обнаружения ДНК BoHV-4 и изучение частоты его выявления в пробах биоматериала от животных с различной клинической патологией в моноварианте и в ассоциациях с другими вирусами.

## Материал и методы

В качестве мишени для амплификации выбрали нуклеотидные последовательности гена гликопротеина L BoHV-4. Для анализа и конструирования праймеров использовали последовательности штаммов JN133502.1, Z79634.1, M90787.1, KC999113.1, AF318573.1, опубликованные в международной базе данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Сравнительный анализ и выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с использованием пакетов программ Mega 6.06. Дизайн

олигонуклеотидов и праймеров выполняли с помощью программы PerlPrimer v1.1.21 и VectorNTI 8.

Исследования проводили в 3 регионах Западной Сибири: в Тюменской, Новосибирской областях и в Республике Казахстан на 5 крупных молочных комплексах с поголовьем 800 дойных коров и более со среднегодовой продуктивностью 7000–10000 л и выше.

Пробы биоматериала отбирали от телят с респираторными и желудочно-кишечными болезнями, а также от коров с гинекологической патологией. При респираторной патологии исследовали смывы из носовой полости, пробы слизистой трахеи, лёгких, бронхиальных лимфатических узлов, крови; при желудочно-кишечной патологии – лёгких, селезёнки, бронхиальных и брыжеечных лимфатических узлов, кишечника; при гинекологической патологии у коров – выделения из влагалища и матки.

Всего исследовали 292 пробы биоматериала, отобранные от животных посмертно и при жизни. Для выявления ассоциации BoHV-4 с другими возбудителями, участвующими в этиологии изучаемой патологии, проводили исследования на наличие в биоматериале вирусов инфекционного ринотрахеита (BHV-1), вирусной диареи (BVDV), парагриппа-3 (PIV-3), респираторно-синцитиального (BRSV) и коронавируса (CoV) крупного рогатого скота методом ПЦР-РВ.

Суспензии внутренних органов готовили путём растирания в ступке с кварцевым песком с последующим разведением 1 : 10 фосфатно-солевым буфером (рН 7,4). Для выделения суммарной нуклеиновой кислоты из суспензий органов использовали коммерческий набор «РИБО-Преп» (ЦНИИЭ, Россия) согласно инструкции производителя.

ПЦР-РВ с детекцией флуоресценции на канале FAM проводили на амплификаторе CFX96 Touch (Biorad, США). Концентрацию нуклеиновых кислот в контрольных материалах определяли спектрофотометрически с помощью флуориметра «Qubit 2.0» (Invitrogen, США). В качестве контроля амплификации использовали штамм «Mova» BoHV-4. Оптимизировали ПЦР с использованием в качестве ДНК-матрицы рекомбинантной плазмиды pCR 2.1 (Invitrogen, США) со вставкой фрагмента гена-мишени гликопротеина L.

Для подтверждения результатов реакции определяли нуклеотидную последовательность фрагмента гена гликопротеина L. Секвенирование осуществляли по методу Сэнгера с помощью набора реагентов BigDy v.3.1 на автоматическом секвенаторе «ABI Prism 3130xl DNA analyzer» (Applied Biosystems, США). Сравнивали установленные нуклеотидные

последовательности с представленными в базе данных GenBank с использованием поисковой системы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

*Анализ последовательностей.* Анализировали нуклеотидные последовательности синтезируемых фрагментов методами выравнивания с опубликованными последовательностями других штаммов вируса с помощью программ BioEdit 7.0.0 и Lasergene 7.1.0. Построение дендрограмм проводили при помощи метода наибольшего правдоподобия (ML – maximum likelihood) в программе MEGA v.7 [18]. Для оценки достоверности топологии использовали бутстрэп-тест (1000 репликаций) [19].

### Результаты

Для конструирования праймеров и зонда был выбран наиболее консервативный ген gL, кодирующий гликопротеин L вируса [6].

При конструировании олигонуклеотидов учитывали следующие требования: отсутствие протяжённых участков повторяющихся нуклеотидов, а также комплементарных последовательностей длиной более 3 оснований внутри олигонуклеотидов, высокое содержание gc-оснований (не менее 50%).

В результате выбрали пару праймеров длиной 22 и 25 нуклеотидов, а также ДНК-зонд длиной 20 нуклеотидов. Последовательности праймеров и зонда приведены в табл. 1.

В качестве положительного контрольного образца в ПЦР использовали рекомбинантную плазмидную ДНК pCR2.1, содержащую нуклеотидную последовательность фрагмента гена gL. Амплификацию проводили в 30 мкл реакционной смеси, включавшей набор реагентов BioMaster UDG HS-qPCR (ООО «Биолаб-микс», Россия), 10 pM каждого праймера и зонда, а также 5 мкл ДНК.

Экспериментально подобрали оптимальные временные промежутки инкубации (временной диапазон для стадий денатурации, отжига праймеров и элонгации варьировал от 10 до 40 с шагом в 5 с). В ходе исследования выбрали оптимальный протокол проведения ПЦР: 50 °C – 2 мин, 95 °C – 5 мин, 10 циклов 95 °C – 15 с, 60 °C – 20 с, 72 °C – 20 с, далее 45 циклов: 95 °C – 15 с, 57 °C – 1 мин. Учёт реакции проводили на канале FAM при шаге циклирования 57. Результат считали положительным при величине порогового цикла (Ct) не выше 30.

Результаты оценки аналитической чувствительности ПЦР представлены на рис. 1. Минимальная аналитическая чувствительность составила 53 геномных эквивалента на реакцию.

Таблица 1

Структура праймеров и зонда для детекции генетического материала BoHV-4 по участку гена gL

Показатель		Последовательность (5' → 3')	Размер ампликона, п.н.	Положение*
Праймеры	F	5- ACATCACAГTAAACCCATTGGC -3	156	60 494 – 60 648
	R	5- ACTCCTTCTGTGTTAACSTATCAG -3		
Зонд	Z	5(FAM)- CAATTGGAATGTGCTGTGGT -3(BHQ1)		

Примечание. \* нумерация дана по полной последовательности изолята FMV09-1180503 (номер в GenBank KC999113.1).

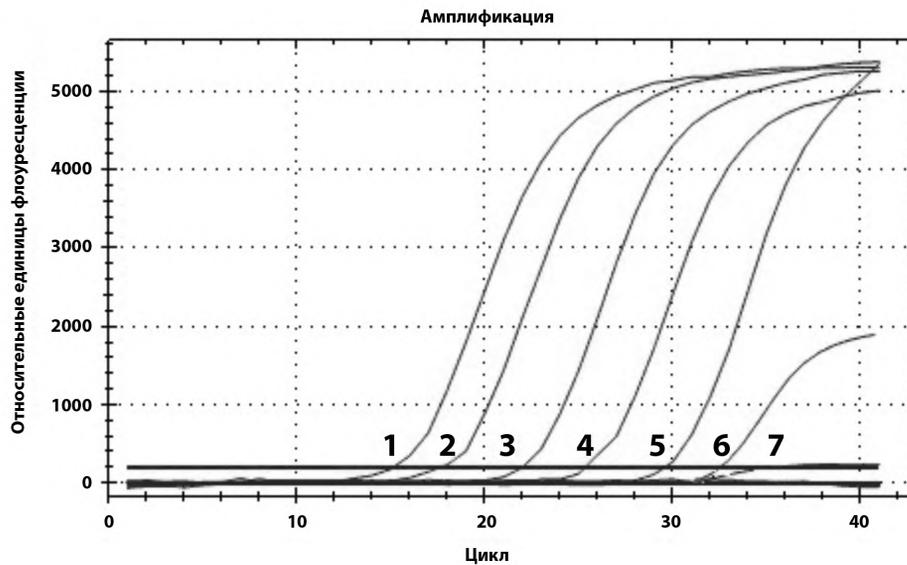


Рис. 1. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации рекомбинантной плазмиды в реакции.

Цифрами обозначены 10-кратные разведения плазмиды от  $5,3 \cdot 10^5$  до  $5,3 \cdot 10^{-1}$  геномных эквивалентов на реакцию. Данные получены на приборе «CFX96 Touch» (Biorad, США).

Специфичность реакции определяли с использованием референтных штаммов близкородственных герпесвирусов, вирусов других семейств и ДНК культуры клеток MDBK: ВоHV-4 (штамм «Movar»), ВоHV-1 (штамм «Оренбург»), ВоHV-2 (штамм «М»), SuHV-1 (штамм «Арский»), ВAdV-1 (штамм BV-10), BRAV (штамм «SD-1»). Отрицательные результаты ПЦР с

каждым из вышеперечисленных образцов позволили определить специфичность тест-системы как 100%.

Для оценки возможности применения разработанной ПЦР для анализа проб биологического материала от КРС исследовали 292 пробы биоматериала от животных с респираторной и гинекологической патологией (табл. 2).

По результатам ПЦР 81 (27,7%) из 292 исследованных проб биоматериала от животных содержала геном вируса ВоHV-4. В результате ДНК ВоHV-4 выявили у животных с респираторными, желудочно-кишечными и гинекологическими заболеваниями. Чаще всего его обнаруживали в смывах из носовой полости (80,0% положительных проб), реже в пробах из тканей лёгких (46,2%) и бронхиальных лимфатических узлов (38,5%), отобранных от телят в возрасте 2-3 мес с респираторными заболеваниями. При желудочно-кишечных болезнях вирус выявили у 2 из 10 телят в лёгких и бронхиальных лимфатических узлах. У коров с гинекологической патологией вирус удалось выявить в 10,0% проб.

Для изучения потенциальной этиологической роли вируса в развитии респираторных, желудочно-кишечных и гинекологических болезней сравнили частоту выявления этого вируса с другими возбудителями вирусных болезней КРС. Виды ассоциаций ВоHV-4 с другими вирусами, участвующими в этиологии изучаемой патологии животных, приведены в табл. 3.

Из данных табл. 3 следует, что чаще всего ДНК ВоHV-4 выявляли в моноварианте. Так, при респираторных болезнях телят в моноварианте он присутствовал в 43 (58,1%) пробах, в 16 (21,6%) пробах его выявили в ассоциации с ВHV-1, а ещё в 15 (20,3%) – с ВоCV. Ассоциаций ВоHV-4 и других патогенов вирусной природы при желудочно-кишечных болезнях телят не установили.

Таблица 2

**Частота выявления ВоHV-4 в органах животных с различной клинической патологией**

Вид материала	Количество исследованных проб	Количество положительных проб, абс. / %
<i>Респираторные болезни телят в возрасте 2-3 мес</i>		
Смывы из носовой полости	20	16 / 80,0
Слизистая трахеи	52	12 / 23,1
Лёгкие	52	24 / 46,2
Бронхиальные лимфатические узлы	52	20 / 38,5
Кровь	36	2 / 5,6
Итого...	212	74 / 34,9
<i>Желудочно-кишечные болезни телят в возрасте до 20 дней</i>		
Лёгкие	10	2 / 20,0
Селезёнка	10	0
Бронхиальные лимфатические узлы	10	2 / 20,0
Брыжеечные лимфатические узлы	10	0
Кишечник	10	0
Итого...	50	4 / 8,0
<i>Гинекологическая патология коров</i>		
Вагинальные и маточные выделения	30	3 / 10,0
Всего исследовано проб	292	81 / 27,7

Таблица 3

Ассоциации ВоНВ-4 с другими возбудителями вирусных болезней КРС

Статус по ВоНВ-4	Количество проб	Количество положительных проб				
		BHV-1	BVDV	BPIV	BRSV	ВоСV
<i>Респираторные болезни телят в возрасте 2-3 мес</i>						
ВоНВ-4 положительно	74	16	0	0	0	15
ВоНВ-4 отрицательно	138	27	9	0	7	11
Всего...	212	43	9	0	7	26
<i>Желудочно-кишечные болезни телят в возрасте до 20 дней</i>						
ВоНВ-4 положительно	10	–	0	–	–	0
ВоНВ-4 отрицательно	40	–	11	–	–	0
Всего...	50	–	11	–	–	0
<i>Гинекологическая патология коров</i>						
ВоНВ-4 положительно	3	0	2	–	–	–
ВоНВ-4 отрицательно	27	9	5	–	–	–
Всего...	30	9	7	–	–	–

Примечание. Прочерк означает, что исследование не проводилось.

При исследовании проб биоматериала от коров с гинекологической патологией (задержание последа, метриты и эндометриты) ВоНВ-4 выявили в 3 из 30 исследованных проб, 2 из них содержали также геном BVDV1.

Для оценки специфичности выявления вируса в пробах биоматериала от животных определяли первичные нуклеотидные последовательности амплифицированных фрагментов ДНК вируса и проводили их филогенетический анализ (рис. 2).

Филогенетический анализ участка гена гликопротеина L ВоНВ-4 показал, что в России встречаются штаммы как Европейской (Movar-like, генотип 1), так и Американской (DN 599-like, генотип 2) ветвей данного вируса (см. рис. 1). Из 5 исследованных образцов 4 изолята были отнесены к Американской ветви и один к Европейской.

**Обсуждение**

По данным зарубежной литературы, в качестве мишеней для выявления ДНК ВоНВ-4 чаще используют праймеры на ген тимидинкиназы или гликопротеина В [20]. Ген gВ имеет высокую степень гомологии с gВ вируса Эпштейна–Барр и герпесвируса Саймири [21]. Поэтому для его выявления иногда используют общие праймеры [22]. В нашем исследовании в качестве контроля для амплификации использованы последовательности гена гликопротеина L вируса. Результаты показали высокую чувствительность и специфичность выявления генома вируса как при исследовании референтных штаммов, так и проб биологического материала от животных.

Известно, что штаммы ВоНВ-4 могут быть разделены на 3 группы: европейские, американские и штаммы, выделенные от африканских буйволов [23]. Опубликовано сообщение о выделении новой – Ар-

гентинской группы штаммов вируса [20]. Есть мнение, что Европейская и Американская ветви вируса разошлись около 260 000 лет назад [23].

В данной работе нам удалось выявить 5 изолятов вируса, четыре из которых (Kz19/18, T24/18, N26/18, N29/18) по результатам филогенетического анализа были отнесены к Американской ветви штаммов, и один (N31/18) – к Европейской. Циркуляция американских штаммов происходила на территории Республики Казахстан (1), Тюменской (1) и Новосибирской (2) областей, а европейский изолят был выделен от животных в Новосибирской области.

Изолят Kz19/18 был получен от коровы с гинекологической патологией, изоляты T24/18 и N29/18 – от телят, больных диареей, а N26/18 и N31/18 – от телят с респираторными болезнями. Таким образом, на территории Новосибирской области циркулируют изоляты вируса обеих подгрупп.

В настоящее время установить происхождение циркулирующих среди животных штаммов вируса сложно, для этого нужны дополнительные исследования. Возможно, в Сибири распространена именно Американская ветвь, и вирус был завезён в Сибирь в 1970–1980-х годах с импортированными из США животными, либо присутствовал в популяции сибирского скота длительное время. Определённое заключение можно сделать только в отношении изолятов Kz19/18, T24/18, так как они были выделены от животных голштино-фризской породы, завезённых из США в 2008–2012 гг. Изолят N31/18 был выделен от животных, завезённых из Германии. Происхождение изолятов N26/18, N29/18 установить сложно, так как они были выделены от животных из хозяйств, куда завоз импортных животных не осуществлялся. Для получения ответов на данные вопросы требуются дополнительные исследования.

Как указывалось выше, роль вируса в качестве основного этиологического агента эндометритов, желудочно-кишечной и респираторной патологии КРС до конца не изучена, несмотря на то, что он был выделен от животных при абортках, эндометритах, пневмонии, диарее, респираторных инфекциях, пу-стулёзном дерматите вымени. Описаны случаи его выделения и от клинически здоровых животных [25].

В последние годы обсуждается этиологическая роль вируса в возникновении эндометритов у коров. Считается, что вирус играет потенциальную роль в качестве вторичного этиологического агента [24, 25]. В литературе описаны ассоциации этого вируса с другими патогенами при метритах, а также в случае обострения бактериального метрита у персистентно инфицированных коров [25].

D. Ageda и соавт. [26] изучали возможность распространения и факторы риска инфицирования животных ВоНВ-4, а также генетический профиль и доминирующие генотипы вируса в двух регионах штата

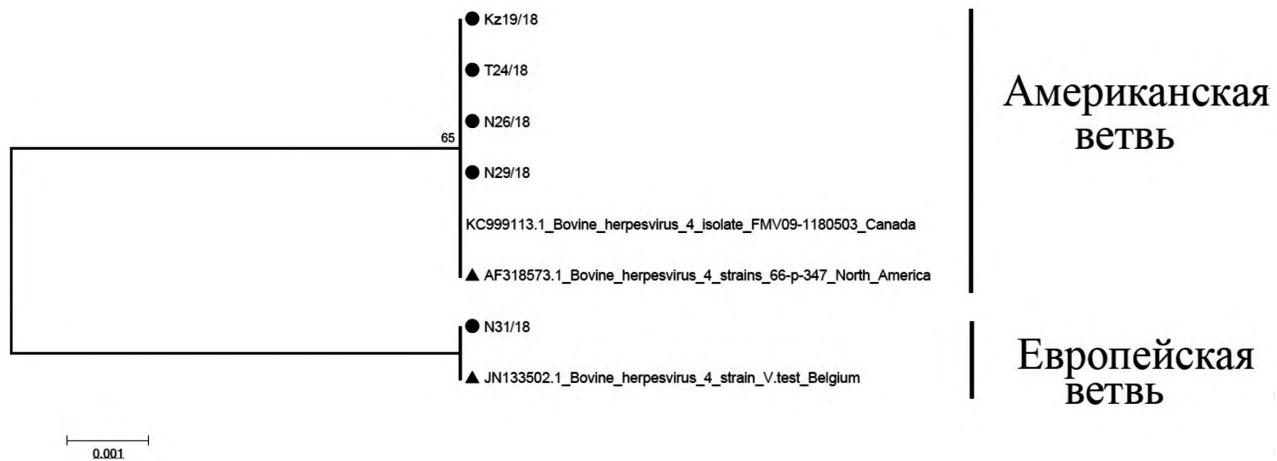


Рис. 2. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе участка гена гликопротеина L герпесвируса крупного рогатого скота 4-го типа.

Выравнивание последовательностей проведено с использованием ClustalW метода. Бутстреп-поддержка указана около каждого узла дендрограммы. Штаммы, исследуемые в данной работе, отмечены черным кругом (●). Референтные штаммы отмечены чёрным треугольником (▲). Для штаммов из базы данных GenBank указаны название и идентификационный номер.

Калифорния. Методом ПЦР-РВ на гены гликопротеина В и тимидинкиназы исследовали вагинальные и маточные выделения 48 отелившихся коров из 11 молочных ферм. Филогенетический анализ 10 полученных в ходе работы изолятов показал циркуляцию вируса двух генотипов и изменчивость гликопротеина В вируса первого генотипа (Movar-like) и гена тимидинкиназы вируса второго генотипа (DN 599-like). Авторы считают, что высокая генетическая изменчивость ВоНВ-4 свидетельствует о возможной инфекции животных несколькими его генотипами. Распространённость инфекции составила 22,3% (33/148), послеродовой метрит выявляли в 33,8% случаев (48/142). Обнаружили сильную зависимость между инфекцией ВоНВ-4 и количеством лактаций, стадиями лактаций и наличием послеродовых метритов.

В работе S. Klamminge и соавт. [27] показано, что инфекция вирусом отрицательно влияет на плодотворность искусственного осеменения животных, снижая его эффективность, особенно в ассоциации с бактерией *Trueperella pyogenes*. В литературе описаны случаи абортос, вызванных вирусами ВоНВ-1 и ВВДВ1, однако при исследовании проб биоматериала от 81 абортосированных плодов ВоНВ-4 не выявлено [28].

В нашей работе присутствие вируса в моноварианте установлено в 27,7% исследованных проб, полученных от телят при вспышках желудочно-кишечных и респираторных болезней, а также от коров с гинекологической патологией.

Из 74 положительных на ВоНВ-4 проб биоматериала от телят с респираторным дистрессом 15 проб содержали геном коронавируса КРС. В пробах, полученных от телят с признаками диареи, ВоНВ-4 присутствовал как моноагент. В двух из 3 положительных на ВоНВ-4 проб присутствовал генетический материал вируса ВВДВ1. Наличие у животного одновременно

двух вирусов может способствовать усилению тяжести течения патологического процесса за счёт их синергетического взаимодействия [2, 3]. Исследования в этом направлении необходимо продолжить.

### Заключение

Если учесть, что в России меняется стратегия ведения животноводства, возрастает количество молочных «мегаферм», поиск и выявление вирусных агентов, участвующих в этиологии инфекционной патологии КРС, а также изучение генетического разнообразия вирусов, циркулирующих на конкретной ферме, весьма актуальны. В данной ситуации необходимо проводить исследования по молекулярной эпизоотологии вирусов, циркулирующих среди КРС на молочных комплексах, особенно с животными, завезёнными из других стран. Сопоставление данных о происхождении животных с результатами филогенетического анализа может оказать большую помощь в определении источников и путей заноса возбудителей в тот или иной регион, а также в выявлении и отслеживании новых и высоковирулентных штаммов вирусов. На основании филогенетического анализа на молочных комплексах Западной и Восточной Сибири нами установлена циркуляция ВоНВ-4 двух генотипов: американского и европейского, происхождение которых на территории Западной Сибири и Республики Казахстан установить сложно. Четыре из пяти изолятов по результатам филогенетического анализа были отнесены к Американской ветви штаммов (генотип 2) и один (N31/18) – к Европейской (генотип 1). Циркуляция американских штаммов происходила на территории Республики Казахстан (1), в Тюменской области (1; среди животных, завезённых из США), а также в Новосибирской области (2; среди местного скота). Изолят, принадлежащий к Европейской ветви вируса, был выделен в Новосибирской области

от местных животных. Изолят Kz19/18 был выделен от коровы с гинекологической патологией, изоляты T24/18 и N29/18 – от больных диареей телят, а N26/18 и N31/18 – от телят с респираторной патологией. Таким образом, на территории Новосибирской области циркулируют изоляты вируса обеих подгрупп.

Учитывая слабую изученность роли вируса в патологии респираторной и генитальной систем КРС, а также распространения инфекции в России, исследование в этом направлении будут продолжены.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2, 7-15, 18-28 см. REFERENCES)

3. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Петрова О.Г., Нефедченко А.В., Татарчук А.Т., Котенева С.В. и др. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота. *Ветеринария*. 2002; (3): 17-21.
4. Глотов А.Г., Глотова Т.И. *Респираторные болезни телят вирусно-бактериальной этиологии*. Новосибирск; 2008.
5. Гулюкин М.И., Юров К.П., Глотов А.Г., Донченко Н.А. Стратегия борьбы с вирусной диареей – болезнью слизистых крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах Российской Федерации. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(6): 13-8.
6. Шабунин С.В., Шахов А.Г., Черницкий А.Е., Золотарев А.И., Рецкий М.И. Респираторные болезни телят: современный взгляд на проблему. *Ветеринария*. 2015; (5): 3-13.
16. Крюков Н.Н. Герпесвирусы и их роль в инфекционной патологии. *Бюллетень ВИЭВ*. 1971; (11): 7-10.
17. Прохвятилова Л.Б., Гусев А.А. Использование полимеразной цепной реакции для выявления герпесвируса КРС 4 типа в патологическом материале. В кн.: *Болезни сельскохозяйственных животных вирусной и других этиологий и меры борьбы с ними: Материалы научно-практической конференции*. Новосибирск: Ревик-К; 2001: 25-6.

#### REFERENCES

1. Andrews A.H. Respiratory disease. In: Andrews A.H., Blowey R., Boyd H., Eddy R., eds. *Bovine Medicine: Diseases and Husbandry of Cattle*. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 2004: 286-3.
2. Glotov A.G., Glotova T.I., Petrova O.G., Nefedchenko A.V., Tatarchuk A.T., Koteneva S.V., et al. The spread of viral respiratory diseases of cattle. *Veterinariya*. 2002; (3): 17-21. (in Russian)
3. Glotov A.G., Glotova T.I. *Respiratory Diseases of Calves of Viral-Bacterial Etiology [Respiratornye bolezni telyat virusno-bakterial'noy etiologii]*. Novosibirsk; 2008. (in Russian)
4. Gulyukin M.I., Yurov K.P., Glotov A.G., Donchenko N.A. Strategy to combat viral diarrhea - a disease of the mucous membranes of cattle in livestock farms of the Russian Federation. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(6): 13-8. (in Russian)
5. Shabunin S.V., Shakhov A.G., Chernitskiy A.E., Zolotarev A.I., Retzkiy M.I. Respiratory diseases of calves: a modern look at the problem. *Veterinariya*. 2015; (5): 3-13. (in Russian)
6. Davison A.J. Herpesvirus systematics. *Vet. Microbiol.* 2010; 143(1): 52-69. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.02.014>
7. Bartha A., Juhasz M., Liebermann H. Isolation of a bovine herpesvirus from calves with respiratory disease and keratoconjunctivitis. A preliminary report. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 1966; 16(3): 357-8.
8. Mohanty S.B., Hammond R.C., Lillie M.G. A new bovine herpesvirus and its effect on experimentally infected calves. Brief report. *Arch Gesamte Virusforsch.* 1971; 33(3): 394-5. Doi: <https://doi.org/10.1007/bf01254696>
9. Dubuisson J., Thiry E., Thalasso F., Bublot M., Pastoret P.P. Biological and biochemical comparison of bovid herpesvirus-4 strains. *Vet. Microbiol.* 1988; 16(4): 339-49. Doi: [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(88\)90015-6](https://doi.org/10.1016/0378-1135(88)90015-6)
10. Thiry E., Bublot M., Dubuisson J., Pastoret P.P. Bovine herpesvirus-4

- (BHV-4) infection in cattle. In: Wittmann G., ed. *Herpesvirus Diseases of Cattle, Horses and Pigs*. Boston: Kluwer; 1989: 96-5.
11. Donofrio G., Van Santen V.L. A bovine macrophage cell line supports bovine herpesvirus 4 persistent infection. *J. Gen. Virol.* 2001; 82(Pt. 5): 1181-5. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-5-1181>
  12. Donofrio G., Flammini C.F., Scatozza F., Cavarani S. Detection of bovine herpesvirus 4 (BoHV-4) DNA in the cell fraction of milk of dairy cattle with history of BoHV-4 infection. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(12): 4668-71.
  13. Czaplicki G., Thiry E. An association exists between bovine herpesvirus-4 seropositivity and abortion in cows. *Prev. Vet. Med.* 1998; 33(1): 235-40.
  14. Frazier K., Pence M., Mauel M.J., Liggett A., Hines M.E., Sangster L., et al. Endometritis in postparturient cattle associated with bovine herpesvirus-4 infection: 15 cases. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2001; 13(6): 502-8. Doi: <https://doi.org/10.1177/104063870101300608>
  15. Frazier K.S., Baldwin C.A., Pence M., West J., Bernard J., Liggett A., et al. Seroprevalence and comparison of isolates of endometriotropic bovine herpesvirus-4. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2002; 14(6): 457-62. Doi: <https://doi.org/10.1177/104063870201400602>
  16. Kryukov N.N. Herpes viruses and their role in infectious diseases. *Byulleten' VIEV*. 1971; (11): 7-10. (in Russian)
  17. Prokhvatilova L.B., Gusev A.A. The use of polymerase chain reaction for the manifestation of herpesvirus cattle type 4 in the pathological material. In: *Diseases of Agricultural Animals of Viral and Other Etiologies and Measures to Combat Them: Materials of the Scientific-Practical Conference [Bolezni sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh virusnoy i drugikh etiologiy i mery bor'by s nimi: Materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii]*. Novosibirsk: Revik-K; 2001: 25-6. (in Russian)
  18. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 33(7): 1870-4. Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
  19. Felsenstein J. Phylogenies and the Comparative Method. *Am. Nat.* 1985; 125(1): 1-15.
  20. Verna A.E., Manrique J.M., Pérez S.E., Leunda M.R., Pereyra S.B., Jones L.R., et al. Genomic analysis of bovine herpesvirus type 4 (BoHV-4) from Argentina: high genetic variability and novel phylogenetic groups. *Vet. Microbiol.* 2012; 160(1-2): 1-8. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.039>
  21. Goltz M., Broll H., Mankertz A., Weigelt W., Ludwug H., Buhk H.J., et al. Glycoprotein B of bovine herpesvirus type 4: its phylogenetic relationship to gB equivalents of the herpesviruses. *Virus Genes*. 1994; 9(1): 53-9.
  22. Palmeira L., Machiels B., Lété C., Vanderplasschen A., Gillet L. Sequencing of bovine herpesvirus 4 v.test strain reveals important genome features. *Virology J.* 2011; 8: 406. Doi: <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-406>
  23. Dewals B., Thirion M., Markine-Goriaynoff N., Gillet L., de Fays K., Minner F., et al. Evolution of bovine herpesvirus 4: Recombination and transmission between African buffalo and cattle. *J. Gen. Virol.* 2006; 87(Pt. 6): 1509-19. Doi: <https://doi.org/10.1099/vir.0.81757-0>
  24. Donofrio G., Cavarani S., van Santen V., Flammini C.F. Potential Secondary Pathogenic Role for Bovine Herpesvirus 4. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(7): 3421-6. Doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3421-3426.2005>
  25. Chastant-Maillard S. Impact of Bovine Herpesvirus 4 (BoHV-4) on Reproduction. *Transbound Emerg. Dis.* 2015; 62(3): 245-51. Doi: <https://doi.org/10.1111/tbed.12155>
  26. Areda D., Chigerwe M., Crossley B. Bovine herpes virus type-4 infection among postpartum dairy cows in California: risk factors and phylogenetic analysis. *Epidemiol. Infect.* 2018; 146(7): 904-12. Doi: <https://doi.org/10.1017/S0950268818000791>
  27. Klamlinger S., Prunner L., Giuliodori M.J., Drillich M. Uterine infection with bovine herpesvirus type 4 in dairy cows. *Reprod. Domest. Anim.* 2017; 52(1): 115-21. Doi: <https://doi.org/10.1111/rda.12865>
  28. Tuncer-Göktuna P., Alpay G., Öner E.B., Yeşilbaş K. The role of herpesviruses (BoHV-1 and BoHV-4) and pestiviruses (BVDV and BDV) in ruminant abortion cases in western Turkey. *Trop. Anim. Health Prod.* 2016; 48(5): 1021-7. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1050-5>

Поступила 24.01.19

Принята в печать 09.04.19

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Карамендин К.О., Саятов М.Х., Кыдырманов А.И., Касымбеков Е.Т., Асанова С.Е., Даулбаева К.Д., Хан Е.Я.

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ AVIAN AVULAVIRUS 20, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ДИКИХ ПТИЦ

НПЦ микробиологии и вирусологии, Республика Казахстан, 050010, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 103

**Введение.** В 2013–2014 гг. на территории Казахстана от диких птиц были выделены ранее не описанные в науке штаммы парамиксовирусов, впоследствии идентифицированные как представители нового вида – *Avian avulavirus 20*.

**Цель и задачи** исследований заключались в молекулярно-генетической характеристике изолятов новых авулавирусов и определении их филогенетических взаимоотношений.

**Материал и методы.** Биологическими образцами в виде клоакальных и трахеальных смывов от диких птиц заразили развивающиеся куриные эмбрионы с последующим выделением культуры вирусов. Полные нуклеотидные последовательности геномов вирусов получены методом массового параллельного секвенирования нуклеиновых кислот вирусов с биоинформационной обработкой результатов.

**Результаты.** При первичном заражении куриных эмбрионов пробами от 179 диких птиц, относящихся к семействам утиные, чайковые, бекасовые и ржанковые, выделены 19 гемагглютинирующих агентов, из которых 5 впоследствии оказались представителями новых видов парамиксовирусов. Исследование секвенированных последовательностей их геномов выявило их идентичность по размерам, но значительную генетическую вариабельность внутри вида. Выявлены 2640 нуклеотидных замен, из них 273 оказались несинонимическими, т.е. оказывали влияние на белковую структуру вирусов. Показано, что изоляты *Avian avulavirus 20*/озёрная чайка/Балхаш/5844/2013 и *Avian avulavirus 20*/черноголовый хохотун/Атырау/5541/2013 оказались на 86 и 95% соответственно идентичны ранее описанному референсному штамму, что свидетельствует о значительной эволюционной дивергенции внутри вида.

**Обсуждение.** Авторы предполагают существование двух независимых линий – Каспийской, представленной референсным Актау/5976 и Атырау/5541, а также географически значительно отдалённой Балхашской линии.

**Заключение.** Проведённые исследования подтверждают, что птицы семейства чайковые являются основным резервуаром *Avian avulavirus 20* в орнитофауне, играют ключевую роль в поддержании авулавирусов в биосфере и представляют потенциальный источник возникновения новых вариантов. Непрерывное наблюдение за ними в дикой природе – одна из важнейших задач при обеспечении безопасности птицеводства.

**Ключевые слова:** парамиксовирус; секвенирование; *Avian avulavirus 20*; серотип; эволюция; дикая птица; Казахстан; чайка.

**Для цитирования:** Карамендин К.О., Саятов М.Х., Кыдырманов А.И., Касымбеков Е.Т., Асанова С.Е., Даулбаева К.Д., Хан Е.Я. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Avian avulavirus 20*, выделенных от диких птиц. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(4):185-192. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-185-192>

### Информация об авторах:

Карамендин К.О., <https://orcid.org/0000-0003-0829-3330>

Саятов М.Х., <https://orcid.org/0000-0003-4740-9156>

Кыдырманов А.И., <https://orcid.org/0000-0002-8374-6128>

Касымбеков Е.Т., <https://orcid.org/0000-0002-8773-4984>

Асанова С.Е., <https://orcid.org/0000-0002-7259-5539>

Даулбаева К.Д., <https://orcid.org/0000-0001-5618-3385>

Хан Е.Я., <https://orcid.org/0000-0002-6279-3419>

**Для корреспонденции:** Карамендин Кобей Омертаевич, канд. вет. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологии вирусов НПЦ микробиологии и вирусологии, Республика Казахстан, 050010, г. Алматы, ул. Богенбай батыра, 103. E-mail: [kobey.karamendin@gmail.com](mailto:kobey.karamendin@gmail.com)

Karamendin K.O., Sayatov M.Kh., Kydyrmanov A.I., Kasymbekov E.T., Asanova S.E., Daulbayeva K.D., Khan E.Ya.

## MOLECULAR-GENETIC CHARACTERIZATION OF AVIAN AVULAVIRUS 20 STRAINS ISOLATED FROM WILD BIRDS

SPC for Microbiology and Virology, Almaty, 050010, Kazakhstan

**Introduction.** Previously unknown paramyxovirus strains were isolated from wild birds in 2013–2014 in Kazakhstan and subsequently identified as representatives of the novel *Avian avulavirus 20* species. The aims and tasks were molecular genetic characterization of novel avulaviruses and investigation of their phylogenetic relationships.

**Material and methods.** Embryonated chicken eggs were inoculated with cloacal and tracheal swabs from wild birds with subsequent virus isolation. The complete nucleotide sequences of viral genomes were obtained by massive parallel sequencing with subsequent bioinformatics processing.

**Results.** By initial infection of chicken embryos with samples from 179 wild birds belonging to the *Anatidae*, *Laridae*, *Scelopacidae* and *Charadriidae* families, 19 hemagglutinating agents were isolated, and five of them were identified as representatives of new viral species. The study of their sequenced genomes revealed their similarity in size, but there was a significant genetic variability within the species. 2,640 nucleotide substitutions were identified and 273 of them were non-synonymous, influencing the protein structure of viruses. It was shown that isolates *Avian avulavirus 20*/black-headed gull/Balkhash/5844/2013 and *Avian avulavirus 20*/great black-headed gull/Atyrau/5541/2013 were 86% and 95% respectively identical to the previously described reference strain, indicating a significant evolutionary divergence within species.

**Discussion.** The authors suggest the existence of two independent lineages - the Caspian, represented by the reference strain Aktau/5976 and Atyrau/5541, as well as the second, geographically significantly distant Balkhash lineage.

**Conclusion.** The study confirms the role of the birds of the *Laridae* family as the main reservoir of Avian avulavirus 20 in the avifauna that plays a key role in maintaining viruses of the genus *Avulavirus* in the biosphere and is a potential natural source for the emergence of new viral variants. Continuous surveillance of them in the wild is one of the most important tasks in ensuring the safety of the poultry industry.

**Keywords:** paramyxovirus; sequencing; Avian avulavirus 20; serotype; evolution; wild bird; Kazakhstan; gull.

**For citation:** Karamendin K.O., Sayatov M.Kh., Kydyrmanov A.I., Kasymbekov E.T., Asanova S.E., Daulbayeva K.D., Khan E.Ya. Molecular-genetic characterization of Avian avulavirus 20 strains isolated from wild birds. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(4): 185-192. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-185-192>

**For correspondence:** Kobey O. Karamendin, PhD, DVM, Leading researcher, Laboratory of Viral Ecology, SPC for Microbiology and Virology, SPC for Microbiology and Virology, Almaty, 050010, Kazakhstan. E-mail: [kobey.karamendin@gmail.com](mailto:kobey.karamendin@gmail.com)

**Information about authors:**

Karamendin K.O., <https://orcid.org/0000-0003-0829-3330>

Sayatov M.Kh., <https://orcid.org/0000-0003-4740-9156>

Kydyrmanov A.I., <https://orcid.org/0000-0002-8374-6128>

Kasymbekov E.T., <https://orcid.org/0000-0002-8773-4984>

Asanova S.E., <https://orcid.org/0000-0002-7259-5539>

Daulbayeva K.D., <https://orcid.org/0000-0001-5618-3385>

Khan E.Ya., <https://orcid.org/0000-0002-6279-3419>

**Acknowledgments.** This work was supported by grants from the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan: AP05131549 «Research of the virome of migratory birds as a source of transcontinental transmission of the human and animal infectious diseases pathogens» and AP0513370 «Molecular evolution of novel for science paramyxoviruses circulating among wild birds in Kazakhstan».

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

Received 07 September 2018

Accepted 31 October 2018

## Введение

Парамиксовирусы птиц (ПМВ) – РНК-содержащие вирусы, относящиеся к роду *Avulavirus* в составе семейства *Paramyxoviridae*, способные вызывать заболевания с различными клиническими проявлениями у диких и домашних птиц. До недавнего времени они включали 9 антигенно отличающихся серотипов (ПМВ-1 – ПМВ-9) [1], которые в последнее годы дополнены 11 новыми серотипами ПМВ-10 – ПМВ-20.

ПМВ-1, известный как вирус болезни Ньюкасла (ВБН), является высокопатогенным агентом, вызывающим массовые заболевания и гибель среди поголовья птиц во всём мире. Другие серотипы вызывают респираторные и другие заболевания меньшей степени тяжести у различных представителей орнитофауны [2]. Экспериментальные исследования и практические наблюдения показывают, что ПМВ-2, -3, -6 и -7 способны вызывать заболевания с разной патогенностью у домашних птиц [3–5]. Так, штаммы ПМВ-6 связаны с заболеваниями органов дыхания лёгкой степени и со снижением яйценоскости у индеек [6]. ПМВ-3 и -5 (вирус *Kunitachi*) вызывали болезни лёгких с тяжёлыми проявлениями у диких птиц [7,8]. ПМВ-4, -8, -9 и -10 были выделены от уток, водоплавающих и других диких видов птиц, у которых отсутствовали какие-либо клинические признаки заболевания [9–11]. ПМВ-4 выделен в основном от диких птиц отряда пластинчатоклювых [12], домашних уток и гусей, предположительно заразившихся в результате непосредственного контакта с их дикими сородичами [13]. Экспериментальная инфекция кур ПМВ-4 и 6 показала умеренную дыхательную патоло-

гию и возможность передачи вируса от дикой птицы к домашней [14].

ПМВ-1 – ПМВ-9 были выделены и охарактеризованы в 1970-х годах. В результате совершенствования технологий секвенирования с 2001 г. было обнаружено 11 новых серотипов. Вирус, выделенный от хохлатого пингвина в 2007 г., антигенно и генетически отличался от всех известных к тому времени серотипов и стал представителем новой группы – ПМВ-10 [15]. Следующий новый изолят (ПМВ-11) был выделен во Франции от бекаса в 2010 г. [16]. ПМВ-12 был изолирован в Северной Италии в 2005 г. от утки свиязи [17]. Сразу 3 публикации, вышедшие примерно в одно время, описывают ПМВ-13, независимо выделенный в трёх отдельных регионах Евразии – в Японии, Казахстане и Украине [18–20]. В 2017 г. было объявлено о 6 новых серотипах ПМВ: от уток в Японии [21] и Корею [22], от кулика в Бразилии [23]. Ещё 3 новых серотипа были одновременно выделены от антарктических пингвинов [24]. С 2013 по 2014 г. в Казахстане выявлен новый для науки серотип ПМВ-20 [25], чьё генетическое разнообразие и экология ранее не были описаны и который охарактеризован как вирус – представитель чайковой линии. Приведённые данные показывают, что ПМВ птиц широко распространены в диких популяциях и высока вероятность появления новых генетически различных вариантов.

Следует отметить, что, согласно новой утверждённой классификации Международного комитета по таксономии вирусов, ПМВ птиц серотипов 1–20, получили новое видовое наименование «*Avian avulavirus 1–20*». Далее в тексте будем придерживаться новой классификации.

**Целью** настоящей работы было изучение молекулярно-генетических свойств изолятов нового вида *Avian avulavirus* 20, выделенных в разные годы в удалённых друг от друга регионах Казахстана и провести их сравнительные филогенетические исследования. В предыдущей работе [25] показаны сравнительные характеристики изолята *Avian avulavirus* 20 с существующими видами рода *Avulavirus* по морфологии, патогенности, ростовым свойствам, а также их филогенетические взаимоотношения. Данная статья описывает молекулярную эволюцию внутри данного вида, содержит более детальное описание структуры генома вирусов, а также подтверждает роль чаек как основного резервуара в орнитофауне.

### Материал и методы

Биологические материалы в виде клоакальных и трахеальных смывов получены от диких птиц, согласно требованиям Международного эпизоотического бюро [26]. Пробы до проведения исследований хранили в жидком азоте (-196 °C).

Изоляцию вирусов и восстановительные пассажи проводили путём инокуляции каждой пробы вируса в 9-10-дневные развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ) и последующей инкубации их при температуре 36 °C в течение 48 ч по сертифицированным методикам, рекомендованным ВОЗ [27].

Вирусные РНК выделены с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя.

Полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией проводили с использованием праймеров к консервативному фрагменту L-гена, общему для всех ПМВ [28]. Реакцию проводили в термоциклере «Eppendorf Gradient» при следующих параметрах: обратная транскрипция при 48 °C 45 мин, начальная 2-минутная денатурация при 95 °C и амплификация в 30 циклов, включающая денатурацию (94 °C, 30 с), отжиг праймеров (55 °C, 30 с) и удлинение цепи (72 °C, 30 с) с последующей окончательной элонгацией при 72 °C, 10 мин.

Секвенирование продуктов ПЦР по Сенгеру проводили с использованием терминирующих дидеоксирибонуклеотидов на автоматическом 8-капиллярном секвенаторе «ABI 3500 DNA Analyzer» (Applied Biosystems, США).

Подготовку библиотек для массового параллельного секвенирования осуществляли с помощью набора NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina (NEB, США) согласно прилагаемому протоколу. Фрагментацию РНК проводили до размеров около 400–450 п.о. с применением ферментативного метода, используя двухвалентные катионы в составе набора. Качество приготовленных библиотек проверяли на приборе «Bioanalyzer 2100» (Agilent Technologies, Германия). Секвенирование проводили с использованием комплекта MiSeq Reagent v.3 (Illumina, США) на секвенаторе нового поколения «MiSeq» (Illumina, США).

Биоинформационный анализ полученных в результате секвенирования последовательностей проведён с

использованием компьютерной программы Geneious 11.0 (Biomatters, Новая Зеландия).

Выравнивание и филогенетический анализ секвенированных генов с нуклеотидными последовательностями из GenBank проводили с помощью компьютерной программы MEGA 6.0 методом максимального правдоподобия на основании 500 выборов, модель GTR [29].

### Результаты

**Выделение и идентификация вирусов.** Проведён вирусологический скрининг в РКЭ 204 биологических образцов в виде клоакальных и трахеальных смывов, собранных в 2013 г. в Западном, Юго-Восточном и Центральном Казахстане от 165 диких птиц водного и околоводного комплексов, относящихся к семействам утиные (*Anatidae*), чайковые (*Laridae*), бекасовые (*Scolopacidae*) и ржанковые (*Charadriidae*) из отрядов гусеобразные (*Anseriformes*) и ржанкообразные (*Charadriiformes*). В мае 2014 г. были собраны материалы в виде свежих фекалий от 14 чаек в Западном Казахстане.

В результате первичного заражения пробами 10-дневных РКЭ выделены 19 гемагглютинирующих агентов. Идентификация их в ПЦР с праймерами к консервативному участку L-гена, общему для всех ПМВ, позволила отнести 17 гемагглютинирующих агентов к этому семейству.

Осуществлено секвенирование продуктов амплификации L-гена методом Сенгера. При проведении BLAST-анализа в GenBank установлена принадлежность одного из изолятов к *Avian avulavirus* 1, шести – к *Avian avulavirus* 8, четырех – к *Avian avulavirus* 13 и ещё одного – к *Avian avulavirus* 6. Пять оставшихся неидентифицированными изолятов ПМВ 2013 и 2014 гг. выделения показали значительное генетическое расхождение по консервативному фрагменту L-гена с известными в науке видами рода *Avulavirus*. Это позволило предположить, что в Казахстане циркулируют новые, ранее неизвестные ПМВ.

С целью дальнейшей идентификации новых ПМВ осуществляли их массовое параллельное секвенирование на приборе «MiSeq» с последующим BLAST-анализом. В результате изоляты были идентифицированы и получили обозначение *Avian avulavirus* 20/черноголовый хохотун/Атырау/5541/2013 (№ MN844488 в GenBank) и *Avian avulavirus* 20/озёрная чайка/Балхаш/5844/2013 (№ MN844489 в GenBank). Ранее из этой группы были описаны штаммы *Avian avulavirus* 20/чайка/Актау/5976/2014 (№ MF033136 в GenBank), *Avian avulavirus* 20/чайка/Актау/5977/2014 и *Avian avulavirus* 20/чайка/Актау/5979/2014, при этом первый из них обозначен как референсный штамм для всего серотипа [25]. Таким образом, в трёх значительно удалённых друг от друга регионах Казахстана и в разное время выделены 5 штаммов – представителей нового вида *Avian avulavirus* 20.

**Полногеномное секвенирование изолятов *Avian avulavirus* 20.** В результате секвенирования на приборе Illumina «MiSeq» получены в общей сложности от 504 106

до 881 691 прочтений с обоих концов библиотек, которые впоследствии выравнивались на группу контрольных последовательностей, включающих все известные ПМВ птиц с дальнейшим формированием консенсуса.

Были получены полные нуклеотидные последовательности всех 6 генов изолятов *Avian avulavirus 20*/черноголовый хохотун/Атырау/5541/2013 и *Avian avulavirus 20*/озёрная чайка/Балхаш/5844/2013. Установлен следующий порядок их очерёдности: 3'-NP-R/V/W-M-F-HN-L-5', которые кодируют 8 белков: NP – 459 аминокислотных остатков (а.о.), Р – 431 а.о.; V – 263 а.о.; W – 165 а.о.; М – 376 а.о.; F – 537 а.о.; HN – 574 а.о. и L – 2242 а.о., что соответствует размерам генов референсного вируса *Avian avulavirus 20*/чайка/Актау/5976/2014.

Размеры геномов вновь полученных последовательностей вирусов *Avian avulavirus 20* были сопоставимы с таковой описанного эталонного штамма и включали 15 954 нуклеотидных основания (н.о.), что согласуется с «правилом шести», характерным для большинства ПМВ птиц.

Последовательности геномов новых казахстанских изолятов *Avian avulavirus 20*/черноголовый хохотун/Атырау/5541/2013 и *Avian avulavirus 20*/озёрная чайка/Балхаш/5844/2013 оказались на 95 и 86% соответственно идентичны референсному штамму. Выравнивание позволило обнаружить области со значительными нуклеотидными расхождениями, неравномерно распределёнными по всей протяжённости генома.

Как известно, геномная РНК ПМВ представляет собой единую нить, содержащую концевые участки: лидерный на 3'-конце (как правило, 55 н.о.) и трейлерный на 5'-конце (50–776 н.о.). У исследуемого изолята *Avian avulavirus 20* определена протяжённость 3'-лидерного концевой участка как 55 н.о., что является характерной длиной для всего семейства. Выявлены 2 нуклеотидные замены Т45С и G50А у изолята Балхаш/5844, а также уникальная замена С30Т у изолята Атырау/5541. Длина 5'-трейлерного концевой участка составила 248 н.о. и здесь также обнаружены 87 нуклеотидных замен. Следует отметить высокую степень комплементарности концевых участков между собой в 20 начальных нуклеотидов с обоих 3'- и 5'-концов, что свидетельствует о возможном наличии промотерных элементов в этих регионах.

В начале каждого гена присутствует консервативный участок, так называемый *gene-start*, функционирующий, как сигнал начала транскрипции. В конце нуклеотидной последовательности каждого гена имеется короткий полиуридилловый участок, так называемый *gene-end*, являющийся сигналом аденилирования и одновременно терминации синтеза мРНК. Установлена последовательность C<sub>5</sub>GCUGG стартового фрагмента гена, одинаковая для всех генов *Avian avulavirus 20*, и она оказалась сходной с таковой *Avian avulavirus 15*. При этом участок сигнала терминации оказался варибельным для разных генов *Avian avulavirus 20*: AAUUCU<sub>6</sub> для NP, F, HN и L-генов, AAUUUAU<sub>6</sub> для Р-гена, а также GAU<sub>8</sub> для М-гена.

Гены ПМВ птиц отделены друг от друга межген-

ными участками. Количество нуклеотидов в них у разных ПМВ варьирует, только лишь у вирусов родов *Respirovirus* и *Morbillivirus* каждый межгенный участок содержит одинаковое количество нуклеотидов (3). У *Avian avulavirus 20* межгенные участки содержали от 8 (между NP и Р) до 26 (между М и F) нуклеотидов.

*Сравнительный молекулярный анализ изолятов Avian avulavirus 20.* Казахские изоляты *Avian avulavirus 20* обнаружили значительную генетическую варибельность между собой и содержали в общей сложности 2640 нуклеотидных замен, из которых 273 оказались несинонимическими, т.е. изменяющими аминокислотную структуру.

Ген нуклеопротеина (NP) *Avian avulavirus 20* имеет в составе 1380 н.о. и кодирует 459 аминокислот. Выявлены аминокислотные замены в 13 позициях (см. таблицу). Все изоляты содержали аминокислотный фрагмент 324-FAPANYSTLYSYAMG-338, который соответствует консервативной последовательности F-X4-YX3-Ф-S-Ф-A-M-G (где X – любая аминокислота, а Ф – ароматическая аминокислота), обнаруживается у всех представителей семейства *Paramyxoviridae* и считается ответственным за N-N самосборку во время РНК-связывания [30].

Ген фосфопротеина (Р) длиной 1296 н.о. кодирует одноименный белок, состоящий из 431 аминокислоты. Казахский изолят Балхаш/5844 отличался от референсного штамма по 83 аминокислотным заменам, изолят Атырау/5541 имел отличия в 17 аминокислотных замен. По белковому составу фосфопротеина наблюдали наименьший процент сходства в 96% между исследуемыми и референсным штаммами, что позволило считать кодирующий его ген наиболее варибельным среди остальных.

Известно, что у большинства вирусов семейства *Paramyxoviridae* ген Р содержит информацию для синтеза нескольких белков, что достигается за счёт наличия в мРНК дополнительных рамок считывания или с помощью вставки дополнительных G-нуклеотидов при транскрипции.

Ген Р исследуемых изолятов *Avian avulavirus 20* в позициях 2175–2183 содержал сайт AAAAGGGGG для вставки дополнительных нуклеотидов G. Выявлено, что мРНК без вставок у данного вида кодирует белок Р длиной 431 аминокислоты, а мРНК с вставкой одного остатка G кодирует белок V длиной 263 аминокислоты, вставка двух остатков G кодирует белок W длиной 165 аминокислот и у обоих С-концевая часть (начиная от места вставки) иная, чем у белка Р.

Матриксный ген (М) казахских изолятов *Avian avulavirus 20* имеет длину 1131 н.о. и кодирует одноименный белок в 376 аминокислот. По этому гену выявлены аминокислотные замены в 17 позициях. Наряду с NP он оказался наиболее консервативным с наименьшим количеством замен.

Ген белка слияния (F) имеет длину 1614 н.о. и кодирует одноименный белок в 537 аминокислот. Сайт расщепления белка имеет аминокислотную последовательность GEQQAR↓LIG, где отсутствуют основные аминокислоты, что характерно для непатогенных вариантов. По

этому гену выявлены аминокислотные замены в 40 позициях. Также данный белок характеризуется наличием сайтов гликозилирования, которые потенциально могут влиять на формирование вирусных частиц, связывание вируса с клеткой и патогенез. У изолята Атырау/5541 и референсного штамма Актау/5976 зарегистрированы 6 таких сайтов в позициях 61, 74, 432, 456, 467 и 483. На один сайт меньше у изолята Балхаш/5844 из-за аминокислотной замены Н467N.

Ген гемагглютинин-нейраминидазы (HN) имеет длину 1725 н.о. и кодирует одноименный белок в 574 аминокислот. Он содержит 6 консервативных аминокислот 234-N-R-K-S-C-S-239, ответственных за прикрепление к сиаловой кислоте на поверхности клетки [31]. По этому гену выявлены аминокислотные замены в 37 позициях.

Самый большой по размеру вирусный ген L, кодирующий РНК-зависимую РНК-полимеразу, имеет длину 6729 н.о. и кодирует одноименный белок в 2242 аминокислоты. По этому гену выявлены аминокислотные замены в 83 позициях. Он содержит 5 консервативных аминокислот 775-QGDNQ-779 в домене III, как и у многих минус-нитевых несегментированных РНК-вирусов, и считается принимающим участие в транскрипционной активности [32].

*Филогенетический анализ новых казахстанских штаммов Avian avulavirus 20.* С использованием компьютерной программы Mega 6.0 проведён филогенетический анализ генов новых изолятов между собой и в сравнении с другими из международной базы данных GenBank. Результаты представлены на рисунке.

Как видно из рисунка, казахстанские изоляты *Avian avulavirus 20* вместе с другими видами *Avian avulavirus 2, 8, 10 и 15* образовали отдельную монофилетическую группу. Внутри данной группы казахстанские ПМВ сформировали отдельный кластер, что свидетельствует об их значительной филогенетической отдалённости от других видов и ином эволюционном происхождении. Также видно, что изоляты из Северного Каспия: референсный штамм *Avian avulavirus 20/чайка/Актау/5976/2014* и изолят *Avian avulavirus 20/черноголовый хохотун/Атырау/5541/2013* – сформировали отдельную ветвь от изолята *Avian avulavirus 20/озёрная чайка/Балхаш/5844/2013*, выделенного в другом географически удалённом регионе Юго-Восточного Казахстана, что также подтверждает данные об их значительной генетической вариабельности.

### Обсуждение

Казахстан обладает огромной территорией, пересекаемой трансконтинентальными путями миграций птиц, которые концентрируются в естественных ландшафтах во время пролёта и гнездования [33].

Дикие птицы, преимущественно водоплавающие, известны как основные резервуары *Avian avulavirus 4, 6, 8 и 9* в природе [34, 35]. Несмотря на обширные исследования, проведенные с *Avian avulavirus 1* по всему миру, сведений о молекулярно-биологических свойствах и патогенности остальных видов рода *Avulavirus* недостаточно.

В Казахстане относительно широко изучены эволюционные взаимоотношения различных штаммов *Avian avulavirus 1*, выделенных в разные годы [36–39]. Авторами показано, что на территории республики среди домашних птиц одновременно циркулировали вирусы нескольких генотипов. О других видах в республике имелись лишь единичные сообщения, опубликованные в конце 1980-х годов, и они касаются только *Avian avulavirus 2* [40]. С развитием технологий массового параллельного секвенирования 5 видов рода *Avulavirus 4, 6, 8* и новые виды *Avian avulavirus 13* [18–20] и 20 [25] были выделены от диких птиц в последнее время в Казахстане.

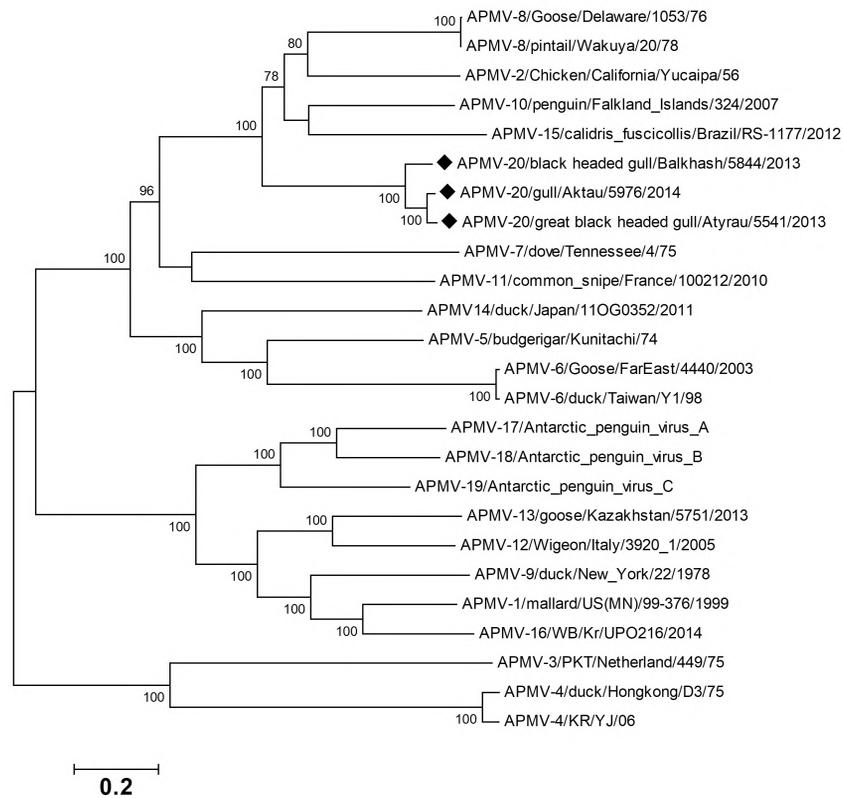
В статье представлены результаты молекулярно-генетических и филогенетических исследований изолятов нового вида *Avian avulavirus 20*, выделенных в разные годы в удалённых друг от друга регионах Казахстана. Анализ полученной полной нуклеотидной последовательности вирусов позволил обнаружить в её составе 6 открытых рамок считывания, которые кодируют 8 вирусных белков. Сопоставление между собой РНК штаммов *Avian avulavirus 20* показало их идентичность между собой по размерам, но выявлена значительная генетическая вариабельность внутри серотипа. В общей сложности выявлены 2640 нуклеотидных замен, из которых 273 оказались несинонимическими. Все нуклеотидные расхождения оказались распределёнными неравномерно по всей протяжённости генома. Наиболее консервативными на каждые 100 нуклеотидов генома оказались гены внутренних белков М, NP и L, что характерно для большинства известных вирусов.

Интересно, что наиболее генетически вариабельным на каждые 100 нуклеотидов оказался Р-ген, где выявлены 83 несинонимичные нуклеотидные замены. Подобную картину авторы данной статьи наблюдали при исследовании штамма *Avian avulavirus 16* (неопубликованные данные), похожий феномен выявлен при описании ВВН генотипа VI [41], где было высказано предположение, что существенная вариабельность в области Р-гена может объясняться участием продуцируемого им белка в процессе приспособления вируса к новым хозяевам за счёт эффективного преодоления внутренней защиты в виде выработки интерферона и апоптоза. В 2 раза меньшее количество несинонимических замен в генах F и HN, представляющих собой поверхностные гликопротеины оболочки вируса и являющиеся главной мишенью иммунного ответа хозяина, авторы объясняют как косвенное свидетельство незначительного влияния антигенного дрейфа в эволюции ПМВ.

Полногеномные последовательности новых казахстанских изолятов *Avian avulavirus 20/озёрная чайка/Балхаш/5844/2013* и *Avian avulavirus 20/черноголовый хохотун/Атырау/5541/2013* оказались на 86 и 95% соответственно идентичны референсному штамму, что свидетельствует о значительной эволюционной дивергенции внутри серотипа. В данном случае можно говорить о существовании двух независимых линий –

Аминокислотные замены в вирусных белках штаммов *Avian aviavirus 20*

Замена в позиции	Вирусный белок		Замена в позиции
	NP	P	
111	S	183	182
142	N	184	180
418	S	192	179
419	V	196	178
425	V	197	176
433	L	199	175
434	P	200	174
438	A	202	169
439	E	203	165
442	L	209	162
444	T	210	159
445	K	213	157
448	S	214	153
36	S	216	151
45	K	222	144
46	T	228	140
59	Q	230	126
60	A	234	120
62	G	235	116
63	P	243	113
64	S	248	109
66	K	250	102
68	V	251	101
69	V	252	100
72	S	274	98
77	P	341	96
80	T	352	95
81	N	355	94
85	N	366	92
86	E	373	91
87	E	378	87
91	E	382	86
92	L	409	85
100	T	84	80
101	T	196	78
102	C	215	77
109	T	249	72
113	S	253	69
116	I	302	68
120	M	305	66
126	S	341	64
140	V	343	63
144	F	350	62
151	I	366	60
153	N	370	59
157	N	375	56
159	I	2	55
162	R	3	54
165	I	4	53
169	T	5	52
174	H	8	51
175	S	12	50
176	H	13	49
178	I	15	48
179	P	16	47
180	P	57	46
182	A	79	45



Филогенетические взаимоотношения новых казахстанских *Avian avulavirus 20* между собой и в сравнении с другими серотипами из международной базы данных GenBank.

Каспийской, представленной референсным штаммом Актау/5976 и изолятом Атырау/5541, а также Балхашской линии, географически значительно отдалённой от первой.

Филогенетические исследования подтверждают разделение на 2 отдельные линии: на дендрограмме видно, что изоляты из Северного Каспия референсный штамм *Avian avulavirus 20*/чайка/Актау/5976/2014 и изолят *Avian avulavirus 20*/черноголовый хохотун/ Атырау/5541/2013 – сформировали отдельную ветвь от изолята *Avian avulavirus 20*/озёрная чайка/ Балхаш/5844/2013, выделенного в Юго-Восточном Казахстане.

Данное исследование также подтверждает приоритетную роль чайковых как основного носителя *Avian avulavirus 20* в природе, так как вирусы этого вида выделены исключительно от птиц этого семейства в разные годы и в удалённых друг от друга регионах.

Дикая фауна играет ключевую роль в поддержании вирусов рода *Avulavirus* в биосфере и является потенциальным источником возникновения новых вариантов. Экспериментальные исследования на примере ВБН показали, что дикие птицы способны распространять и заносить слабо- или непатогенные варианты в популяцию домашних птиц, которые через несколько пассажей *in vivo* зачастую приобретают высокопатогенные свойства [42]. По этой причине непрерывное наблюдение за вирусами рода *Avulavirus* в дикой природе является одной

из важнейших задач при обеспечении безопасности птицеводства.

Кроме этого, имеются скудные сведения о молекулярной биологии вирусов рода *Avulavirus* в популяциях диких птиц, и исследования в этом направлении имеют определённый эпидемиологический интерес, что важно для разработки вакцин в случае появления новых патогенных штаммов.

**Финансирование.** Данная работа профинансирована грантами Министерства образования и науки Республики Казахстан AP05131549 «Изучение виroma перелетных птиц как источников трансконтинентального переноса возбудителей инфекционных болезней человека и животных» и AP05133370 «Молекулярная эволюция новых для науки парамиксовирусов, циркулирующих среди диких птиц в Казахстане».

**Конфликт интересов.** Все авторы статьи заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-32, 34-37, 39-42 см. REFERENCES)

33. Полный список видов птиц Казахстана. Available at: <http://www.birds.kz/v2checklist.php?l=ru>
38. Коротецкий И.С., Богоявленский А.П., Прилипов А.Г., Усачев Е.В., Усачева О.В., Турмагамбетова А.С. и др. Молекулярно-генетическая характеристика велогенных изолятов вируса болезни Ньюкасла, выделенных на территории Российской Федерации, Украины, Казахстана и Киргизии. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55(4): 25-9.

## REFERENCES

- Alexander D.J. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: *Diseases of Poultry*. Ames, IA, USA: Iowa State Press; 2003.
- Saif Y.M., Mohan R., Ward L., Senne D.A., Panigrahy B., Dearth R.N. Natural and experimental infection of turkeys with avian paramyxovirus-7. *Avian Dis.* 1997; 41(2): 326-9.
- Alexander D.J. Newcastle disease and other avian paramyxoviridae infections. In: *Diseases of Poultry*. Ames, IA, USA: Iowa State Press; 1997.
- Jung A., Grund C., Muller I., Rautenschlein S. Avian paramyxovirus serotype 3 infection in Neopsephotus, Cyanoramphus, and Neopheema species. *J. Avian Med. Surg.* 2009; 23(3): 205-8. Doi: <https://doi.org/10.1647/2008-022.1>
- Nerome K., Nakayama M., Ishida M., Fukumi H. Isolation of a new avian paramyxovirus from budgerigar (*Melopsittacus undulatus*). *J. Gen. Virol.* 1978; 38(2): 293-301. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-38-2-293>
- Gough R.E., Alexander D.J. Avian paramyxovirus type 4 isolated from a ringed teal (*Calonetta leucophrys*). *Vet. Rec.* 1984; 115(25-26): 653. Doi: <https://doi.org/10.1136/vr.115.25-26.653>
- Stallknecht D.E., Senne D.A., Zwank P.J., Shane S.M., Kearney M.T. Avian paramyxoviruses from migrating and resident ducks in coastal Louisiana. *J. Wildl. Dis.* 1991; 27(1): 123-8. Doi: <https://doi.org/10.7589/0090-3558-27.1.123>
- Alexander D.J., Hinshaw V.S., Collins M.S., Yamane N. Characterization of viruses which represent further distinct serotypes (PMV-8 and PMV-9) of avian paramyxoviruses. *Arch. Virol.* 1983; 78(1-2): 29-36. Doi: <https://doi.org/10.1007/bf01310856>
- Stanislawek W.L., Wilks C.R., Meers J., Horner G.W., Alexander D.J., Manvell R.J., et al. Avian paramyxoviruses and influenza viruses isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) in New Zealand. *Arch. Virol.* 2002; 147(7): 1287-302. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0818-2>
- Turek R., Gresiková M., Tůmová B. Isolation of influenza A virus and paramyxoviruses from sentinel domestic ducks. *Acta Virol.* 1984; 28(2): 156-8.
- Chang P.C., Hsieh M.L., Shien J.H., Graham D.A., Lee M.S., Shieh H.K. Complete nucleotide sequence of avian paramyxovirus type 6 isolated from ducks. *J. Gen. Virol.* 2001; 82(Pt. 9): 2157-68. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-9-2157>
- Miller P.J., Afonso C.L., Spackman E., Scott M.A., Pedersen J.C., Senne D.A., et al. Evidence for a new avian paramyxovirus serotype 10 detected in rockhopper penguins from the Falkland Islands. *J. Virol.* 2010; 84(21): 11496-504. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00822-10>
- Briand F.X., Henry A., Massin P., Jestin V. Complete genome sequence of a novel avian paramyxovirus. *J. Virol.* 2012; 86(14): 7710. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.00946-12>
- Terregino C., Aldous E.W., Heidari A., Fuller C.M., De Nardi R., Manvell R.J., et al. Antigenic and genetic analyses of isolate APMV/wigeon/Italy/3920-1/2005 indicate that it represents a new avian paramyxovirus (APMV-12). *Arch. Virol.* 2013; 158(11): 2233-43. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1735-2>
- Yamamoto E., Ito H., Tomioka Y., Ito T. Characterization of novel avian paramyxovirus strain APMV/Shimane67 isolated from migratory wild geese in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 2015; 77(9): 1079-85. Doi: <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0529>
- Karamendin K., Kydyrmanov A., Seidalina A., Asanova S., Sayatov M., Kasymbekov E., et al. Complete genome sequence of novel avian paramyxovirus (APMV-13) isolated from a wild bird in Kazakhstan. *Genome Announc.* 2016; 4(3): pii e00167-16. Doi: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00167-16>
- Goraichuk I., Sharma P., Stegnyy B., Muzyka D., Pantin-Jackwood M.J., Gerilovych A., et al. Complete genome sequence of an avian paramyxovirus representative of putative new serotype 13. *Genome Announc.* 2016; 4(4): pii e00729-16. Doi: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00729-16>
- Thampaisarn R., Bui V.N., Trinh D.Q., Nagai M., Mizutani T., Omatsu T., et al. Characterization of avian paramyxovirus serotype 14 a novel serotype isolated from a duck fecal sample in Japan. *Virus Res.* 2017; 228: 46-57. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.018>
- Lee H.J., Kim J.Y., Lee Y.J., Lee E.K., Song B.M., Lee H.S., et al. Novel Avian Paramyxovirus (Putative Serotype 15) Isolated from Wild Birds. *Front. Microbiol.* 2017; 8: 786. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00786>
- Thomazelli L.M., de Araújo J., Fabrizio T., Walker D., Reischak D., Ometto T., et al.
- Novel avian paramyxovirus (APMV-15) isolated from a migratory bird in South America. *PLoS One.* 2017; 12(5): e0177214. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177214>
- Neira V., Tapia R., Verdugo C., Barriga G., Mor S., Ng T.F.F., et al. Novel Avulaviruses in Penguins Antarctica. *Emerg. Infect. Dis.* 2017; 23(7): 1212-4. Doi: <https://doi.org/10.3201/eid2307.170054>
- Karamendin K., Kydyrmanov A., Kasymbekov Y., Asanova S., Daulbayeva K., Seidalina A., et al. Novel avian paramyxovirus isolated from gulls in Caspian seashore in Kazakhstan. *PLoS One.* 2017; 12(12): e0190339. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190339>
- Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Avian influenza. Available at: <https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
- WHO Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. Available at: [http://www.wpro.who.int/emerging\\_diseases/documents/docs/manualanimalaidiagnosisandsurveillance.pdf](http://www.wpro.who.int/emerging_diseases/documents/docs/manualanimalaidiagnosisandsurveillance.pdf)
- Tong S., Chern S.W., Li Y., Pallansch M., Anderson L.J. Sensitive and Broadly Reactive Reverse Transcription-PCR Assays to Detect Novel Paramyxoviruses. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(8): 2652-8. Doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.00192-08>
- Nei M., Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press; 2000.
- Morgan E.M. Evolutionary relationships of paramyxovirus nucleocapsid-associated proteins. In: Kingsbury D.W., ed. *The Paramyxoviruses*. New York: Plenum Press; 1991: 163-79.
- Paldurai A., Subbiah M., Kumar S., Collins P.L., Samal S.K. Complete genome sequences of avian paramyxovirus type 8 strains goose/Delaware/1053/76 and pintail/Wakuya/20/78. *Virus Res.* 2009; 142(1-2): 144-53. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.02.003>
- Xiao S., Subbiah M., Kumar S., De Nardi R., Terregino C., Collins P.L., et al. Complete genome sequences of avian paramyxovirus serotype 6 prototype strain Hong Kong and a recent novel strain from Italy: evidence for the existence of subgroups within the serotype. *Virus Res.* 2010; 150(1-2): 61-72. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.02.015>
- The Checklist of the Birds of Kazakhstan. Available at: <http://www.birds.kz/v2checklist.php?l=en>
- Karamendin K., Kydyrmanov A., Seidalina A., Asanova S., Daulbayeva K., Kasymbekov E., et al. Circulation of avian paramyxoviruses in wild birds of Kazakhstan in 2002-2013. *Virol. J.* 2016; 13: 23. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0476-8>
- Yamane N., Arikawa J., Odagira T., Ishida N. Characterization of avian paramyxoviruses isolated from feral ducks in northern Japan: the presence of three distinct viruses in nature. *Microbiol. Immunol.* 1982; 26(7): 557-68. Doi: <https://doi.org/10.1111/mim.1982.26.7.557>
- Bogoyavlenskiy A., Beresin V., Prilipov A., Usachev E., Lyapina O., Levandovskaya S., et al. Molecular Characterization of Virulent Newcastle Disease Virus Isolates from Chickens during the 1998 NDV Outbreak in Kazakhstan. *Virus Genes.* 2000; 31(1): 13-20. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11262-004-2195-2>
- Bogoyavlenskiy A., Beresin V., Prilipov A., Usachev E., Lyapina O., Korotetskiy I., et al. Newcastle disease outbreaks in Kazakhstan and Kyrgyzstan during 1998, 2000, 2001, 2003, 2004 and 2005 were caused by viruses of the genotypes VIIb and VIId. *Virus Genes.* 2009; 39(1): 94-101. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11262-009-0370-1>
- Korotetskiy I.S., Bogoyavlenskiy A.P., Prilipov A.G., Usachev E.V., Usacheva O.V., Turmagambetova A.S., et al. Molecular genetic characteristics of cyclic isolates of the Newcastle disease virus isolated on the territory of the Russian Federation, Ukraine, Kazakhstan, and Kyrgyzstan. *Voprosy virusologii.* 2010; 55(4): 25-9. (in Russian)
- Bogoyavlenskiy A., Beresin V., Prilipov A., Usachev E., Korotetskiy I., Zaitceva I., et al. Characterization of Pigeon Paramyxoviruses (Newcastle disease virus) Isolated in Kazakhstan in 2005. *Virol. Sin.* 2012; 27(2): 93-9. Doi: <https://doi.org/10.1007/s12250-012-3234-0>
- Kydyrmanov A., Panshin A., Shihmanter E., Sayatov M. Monoclonal antibody analysis of avian paramyxovirus serotype 1 (NDV) and serotype 2 (APMV2) strains isolated in Kazakhstan. In: *News. The Annual Meeting of the Israel Society for Microbiology*. Tel Aviv: Tel Aviv University Press; 1997.
- Munir M., Linde A.M., Zohari S., Ståhl K., Baule C., Engström B., et al. Whole genome sequencing and characterization of a virulent Newcastle disease virus isolated from an outbreak in Sweden. *Virus Genes.* 2011; 43(2): 261-71. Doi: <https://doi.org/10.1007/s11262-011-0636-2>
- Shengqing Y., Kishida N., Ito H., Kida H., Otsuki K., Kawaoka Y., et al. Generation of velogenic Newcastle disease viruses from a nonpathogenic waterfowl isolate by passaging in chickens. *Virology.* 2002; 301(2): 206-11. Doi: <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1539>

Поступила 07.09.18

Принята в печать 31.10.18

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Мазлум Али, Жуков И.Ю., Аронова Е.В., Иголкин А.С., Власова Н.Н.

**ОСОБЕННОСТИ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ В ПРИСУТСТВИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ CD2v, pX69R И pE248R**

ФГБУ «ВНИИЗЖ» федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных», 600901, Владимирская область, г. Владимир, микрорайон Юрьевец, Россия

**Введение.** Африканская чума свиней (АЧС) является особо опасной геморрагической болезнью свиней, которую вызывает крупный ДНК-содержащий вирус семейства *Asfviridae*. Поскольку нет эффективных и безопасных вакцин против АЧС, актуально изучение функций белков вируса путём анализа особенностей репликации вируса АЧС в присутствии рекомбинантных белков *in vitro*.

**Цель** – изучить функции и степень влияния CD2v, pE248R и pX69R на скорость и уровень репродукции вируса АЧС *in vitro* для разработки подходов к созданию вакцины против АЧС.

**Материал и методы.** Использовали вирус АЧС изолят Krasnodar 07/17 и штамм АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1. Гены X69R, EP402R и E248R клонировали в векторе pJET1.2/blunt в клетках *E. coli* JM-109. Локализацию рекомбинантных белков в клетках CV-1 изучали в реакции прямой иммунофлюоресценции с использованием ФИТЦ-конъюгата поликлональных антител. Уровень репродукции вируса АЧС оценивали в реакции гемадсорбции и в полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

**Результаты.** Сконструированы экспрессирующие рекомбинантные плазмиды pCI-neo/E248R, pCI-neo/EP402R и pCI-neo/X69R. Определена локализация и подтверждена специфичность полученных белков CD2v, pE248R и pX69R, для которых установлено, что они повышают уровень накопления вируса АЧС на 3–5-е сутки эксперимента на  $\sim 1,2-1,5 \text{ IgГАдE}_{50}/\text{см}^3$  по сравнению с отрицательным контролем.

**Обсуждение.** В результате анализа установлена важная роль белков CD2v, pX69R и pE248R в репродукции вируса, поскольку они влияют на её уровень. Функция белка pX69R неизвестна, однако в проведённых экспериментах определено его влияние на репродукцию вируса АЧС, проявившееся в увеличении уровня его накопления.

**Заключение.** Данная методология позволяет изучить характер влияния белков с неизвестной функцией на репликацию вируса АЧС.

**Ключевые слова:** вирус африканской чумы свиней; рекомбинантные белки; уровень накопления вируса; репродукция вируса.

**Для цитирования:** Мазлум Али, Жуков И.Ю., Аронова Е.В., Иголкин А.С., Власова Н.Н. Особенности репликации вируса африканской чумы свиней в присутствии рекомбинантных белков CD2v, pX69R и pE248R. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(4): 193-200. DOI:<https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-193-200>

**Информация об авторах:**Мазлум Али, <https://orcid.org/0000-0002-5982-8393>Жуков И.Ю., <https://orcid.org/0000-0002-3817-2129>Аронова Е.В., <https://orcid.org/0000-0002-2072-6701>Иголкин А.С., <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>Власова Н.Н., <https://orcid.org/0000-0001-8707-7710>

**Для корреспонденции:** Мазлум Али, канд. биол. наук, ведущий ветеринарный врач, ФГБУ «ВНИИЗЖ», 600901, Владимирская область, г. Владимир, микрорайон Юрьевец. E-mail: [ali.mazloum6@gmail.com](mailto:ali.mazloum6@gmail.com)

Mazloum Ali, Zhukov I.U., Aronova E.B., Igolkin A.S., Vlasova N.N.

**ASF VIRUS REPLICATION FEATURES IN THE PRESENCE OF RECOMBINANT PROTEINS CD2v, pX69R AND pE248R**

FGBI «ARRIAH» Federal State Budgetary Institution «Federal Center for Animal Health» Vladimir region, Vladimir city, Yuryevets microdistrict, 600901, Russian Federation

**Introduction.** African swine fever (ASF), severe hemorrhagic disease of swine caused by a large DNA virus of the *Asfviridae* family.

Since there are no effective and safe vaccines against ASF yet, it is urgent to study the functions of its proteins, which is applicable by analyzing the features of ASF virus replication in the presence of recombinant proteins *in vitro*.

**Purpose.** To study the effect of ASFV recombinant proteins CD2v, pE248R and pX69R on the speed and level of reproduction of ASF virus *in vitro*. Thus, obtain the necessary knowledge to develop approaches for creating a vaccine against ASF.

**Materials and methods.** ASFV isolate Krasnodar 07/17 and strain ASF/ARRIAH/CV-1 were used. Cloning of X69R, EP402R, and E248R genes was performed in the pJET1.2 / blunt vector and pCI-neo in *E. coli* JM-109 cells, according to the manufacturer's manual. Localization of recombinant proteins in CV-1 cell line carried out by direct immunofluorescence reaction (DIF) using polyclonal antibodies conjugated to FITC.

The ASF virus reproduction level was assessed by hemadsorption reaction and qPCR kit (Central Research Institute of Epidemiology).

**Results.** Recombinant plasmids pCI-neo / E248R, pCI-neo / EP402R and pCI-neo / X69R were constructed.

The localization and the specificity of the obtained recombinant proteins CD2v, pE248R and pX69R was confirmed. It was established that these recombinant proteins induce the level of ASF virus reproduction on days 3-5 of the experiment by  $\sim 1.2-1.5 \text{ IgHADU}_{50}/\text{cm}^3$  in comparison with the negative control.

**Discussion.** The data obtained demonstrate the important role of CD2v, pX69R and pE248R proteins in the reproduction of the virus, since they significantly affect its level. The exact function of pX69R protein was not determined, however, in

the experiments its positive effect on ASF virus reproduction was established, manifested in an increase in its reproduction level.

**Conclusion.** This methodology allows us to study the nature of the effect of proteins with unknown function on ASF virus replication.

**Keywords:** *african swine fever virus; recombinant proteins; level of viral accumulation; virus reproduction.*

**For citation:** Mazloun Ali, Zhukov I.U, Aronova E.B, Igolkin A.S., Vlasova N.N. ASF virus replication features in the presence of recombinant proteins CD2v, pX69R and pE248R. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(4):193-200. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-193-200>

**For correspondence:** Mazloun Ali, Ph.D, FGBI «ARRIAH» Federal State Budgetary Institution «Federal Center for Animal Health», Vladimir region, Vladimir city, Yuryevets microdistrict, 600901, Russian Federation.  
E-mail: [ali.mazloun6@gmail.com](mailto:ali.mazloun6@gmail.com)

**Information about authors:**

Mazloun Ali, <https://orcid.org/0000-0002-5982-8393>

Zhukov I.U, <https://orcid.org/0000-0002-3817-2129>

Aronova E.B, <https://orcid.org/0000-0002-2072-6701>

Igolkin A.S., <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>

Vlasova N.N. <https://orcid.org/0000-0001-8707-7710>

**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.

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

Received 23 August 2019  
Accepted 10 October 2019

## Введение

Африканская чума свиней (АЧС) – особо опасная геморрагическая вирусная болезнь, которую вызывает крупный нуклеоцитопатический ДНК-содержащий вирус, единственный представитель семейства *Asfarviridae*.

Эпизоотология АЧС сложна и значительно варьирует по динамике и факторам распространения в зависимости от территориального расположения и уровня социально-экономического развития стран. Характер течения эпизоотии также зависит от свойств циркулирующего вируса, наличия и роли в распространении вируса векторов передачи и природных резервуаров.

До недавнего времени АЧС была в основном эндемичной в странах Африки к югу от Сахары, с очагами эпизоотий в Португалии, Испании (1957–1995 гг.) и на Сардинии (с 1978 г.). Однако с начала 2000-х годов ситуация кардинально изменилась и число стран, официально сообщивших о вспышках АЧС, возросло до 25.

В результате заноса вируса АЧС из Восточной Африки в Грузию в 2007 г. болезнь быстро распространилась по всему Кавказу и проникла на тысячи километров на северо-запад РФ [1, 2]. Дальнейшее распространение болезни привело к её появлению в 2012 г. на Украине, в 2013 г. в Беларуси и в начале 2014 г. в Литве и Польше. В этом же году вирус АЧС проник в Эстонию и Латвию, поражая как домашних, так и диких животных [3, 4].

Серьёзность нарастания угрозы АЧС подтверждается зарегистрированными спорадическими вспышками болезни в Молдове в сентябре 2016 г. [5], в Чехии и Румынии в 2017 г. [6], в Венгрии, Китае, Бельгии [7] и Монголии в 2018 г., во Вьетнаме и Лаосе в 2019 г.

Кроме того, в Африке к югу от Сахары, в Кот-д'Ивуаре и Кабо-Верде, были вновь зарегистрированы вспышки АЧС после более чем 15-летнего отсутствия [8].

Несмотря на предпринимаемые меры борьбы, распространение АЧС принимает глобальный характер. Поэтому необходимость создания эффективной безопасной вакцины против АЧС остаётся главной целью исследователей и способом защиты от пандемии.

Для создания эффективной вакцины необходимо знать о структуре и функциях как протективных белков, так и белков, ответственных за вирулентность вируса АЧС и «ускользание» от иммунного ответа организма. В настоящее время реализуются различные подходы к изучению функций этих белков: от получения рекомбинантных белков и антител к ним до конструирования делеционных мутантов вируса АЧС и изучения их биологических свойств [9, 10].

Различными исследователями показано, что гены X69R, A179L, E248R, 1215L и DP96R, кодирующие белки pX69R, pA179L, pE248R, убиквитин-конъюгирующий фермент E2 и UK играют важную роль в поддержании вирусной инфекционности, вирулентности возбудителя АЧС и выраженности клинических признаков болезни.

**Ген EP402R** кодирует белок CD2v, названный так из-за сходства с CD2 лейкоцитов свиньи [11, 12]. Транскрипция EP402R происходит на поздней стадии репликации вируса. Отсутствие фрагмента длиной 354 п.н. в EP402R не приводит к снижению скорости роста вируса *in vitro*, но нарушает способность вируса АЧС индуцировать гемадсорбцию.

Участвуя в клеточной адгезии, CD2v способствует повышению вирулентности вируса и модуляции иммунного ответа. В экспериментах на животных продемонстрирована его ведущая роль в патогенезе инфекции, тканевом тропизме, уклонении от эффекторов иммунной системы и усилении репликации вируса [13].

**Ген E248R**, расположенный в левой концевой вариабельной области генома вируса АЧС, кодирует белок pE248R, который имеет молекулярную массу 28 кДа.

Изучение репродукции делеционного мутанта вируса АЧС, лишённого гена E248R, показало, что белок pE248R не участвует в интернализации или адгезии вируса, а начинает функционировать после проникновения в клетку, участвуя в «раздевании» и транспортировке вируса в цитоплазме [14].

Белок pE248R необходим для образования инфекционного потомства вируса, но его репрессия не блокирует сборку вируса и на электронно-микроскопическом уровне зрелые вирионы, образовавшиеся при отсутствии этого белка, морфологически неотличимы от вирионов дикого типа. Тем не менее инфекционная активность делетированного по гену E248R вируса АЧС была по меньшей мере в 100 раз меньше, чем у вируса дикого типа [14].

Функция белка pX69R, кодируемого геном X69R, неизвестна, однако программа Vaxign, основанная на анализе нуклеотидных последовательностей генов, позволила позиционировать данный белок в качестве возможного компонента вакцины против АЧС [15, 16].

**Цель работы** – изучение функции и степени влияния вышеуказанных белков на скорость и уровень репродукции вируса АЧС *in vitro* для разработки подходов к созданию вакцины против АЧС.

#### Материал и методы

В качестве источника геномной ДНК использовали вирус АЧС изолят Krasnodar 07/17, выделенный в июле 2017 г. из пробы селезёнки павшей домашней свиньи (Краснодарский край).

Накопление вируса осуществляли путём последовательного пассирования в первичной культуре клеток селезёнки свиньи в течение 2–3 пассажей.

Вирусную ДНК из вирусосодержащей суспензии 2-го – 3-го пассажей выделяли с помощью набора «ДНК-сорб-Б» (ООО «НекстБио», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Клонирование генов X69R, EP402R и E248R проводили в векторе pJET1.2/blunt с использованием клеток *E. coli* штамма JM-109, согласно руководству CloneJET PCR Cloning Kit (ThermoFisher) [17]. Рестриктию и лигирование донорной плазмиды (pJET1.2) и плазмиды pCI-neo проводили, как описано J. Sambrook (2006) [18].

Для изучения локализации рекомбинантных белков pX69R, CD2v, pE248R, их накопления и исследования влияния на репродукцию вируса АЧС *in vitro*, использовали перевиваемую культуру клеток почки африканской зелёной мартышки (CV-1). Клетки CV-1 были трансфицированы плазмидами pCI-neo/X69R, pCI-neo/E248R и EP402R, согласно руководству к набору Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, США). Очистку рекомбинантного белка CD2v проводили согласно методу очистки немаркированных белков из геля SDS-PAGE по протоколу R. Burgess (2009 г.) [19].

Экспрессию генов вируса АЧС, специфичность рекомбинантных белков и их локализацию в клетках CV-1 оценивали с помощью реакции прямой иммунофлюоресценции (РПИФ) с использованием ФИТЦ-

конъюгата поликлональных антител к АЧС. Результаты РПИФ учитывали на люминисцентном микроскопе (Olympus, Япония).

Уровень репродукции вируса АЧС в культуре клеток оценивали в реакции гемадсорбции и с помощью тест-системы «АЧС» для выявления вируса африканской чумы свиней методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя; уровень репродукции вируса в культуре клеток определяли согласно методическим рекомендациям [20, 21].

Статистическая обработка цифровых данных, полученных в результате экспериментальных исследований, выполнена с использованием стандартных программ Statistica 10.0 (Stat Soft. Inc., США).

#### Результаты

В 2018 г. на основе изолята Krasnodar 07/17 была сконструирована клонотека, содержащая рекомбинантные плазмиды: pJET1.2-X69R со встройкой размером 1140 п.н., pJET1.2-A179L со встройкой размером 679 п.н.; pJET1.2-E248R со встройкой размером 759 п.н.; pJET1.2-I215L со встройкой размером 717 п.н.; pJET1.2-DP96R со встройкой размером 404 п.н.; pJET1.2-EP402R со встройкой размером 1109 п.н.; pJET1.2-O61R со встройкой размером 421 п.н. [17].

Поскольку белки pX69R, pE248R и CD2v вируса АЧС являются гликопротеинами, для получения рекомбинантных белков, не отличающихся по своим антигенным свойствам от вирусных, их синтезировали в эукариотической системе экспрессии.

С этой целью для реклонирования гена E248R провели рестриктию ДНК рекомбинантной плазмиды клона pJET1.2-E248R и реципиентной плазмиды pCI-neo по сайтам XhoI и XbaI и переклонировали реперный ген в экспрессирующий вектор pCI-neo. Ген EP402R был реклонирован в pCI-neo по сайтам NotI и XbaI, а для гена X69R использовали сайты рестриктии EcoRI и XbaI.

Полученные клоны использовали для выделения плазмид pCI-neo/E248R, pCI-neo/EP402R и pCI-neo/X69R. Для определения наличия и размера соответствующей вставки проводили их рестрикционный анализ.

Результаты рестрикционного анализа и электрофоретического разделения в 1% агарозном геле представлены на рис. 1.

Таким образом, после рестриктии плазмиды pCI-neo/E248R по сайтам XhoI и XbaI получили 2 фрагмента: один около 5400 п.н. (соответствует размеру pCI-neo), второй – 717 п.н., что соответствует размеру гена E248R. Для плазмиды pCI-neo/EP402R после рестриктии NotI и XbaI также получили 2 фрагмента: один около 5400 п.н., второй – 1129 п.н., соответствующий размеру гена EP402R. Рестрикционный анализ pCI-neo/X69R (см. рис. 1Б) также позволил выявить 2 фрагмента: один около 5400 п.н., второй – 350 п.н., что соответствует размеру клонированного фрагмента, содержащего ген X69R (207 п.н.).

*Анализ экспрессии генов вируса АЧС в клетках CV-1*

Специфичность рекомбинантных белков и их локализацию в клетках CV-1 определяли с помощью РПИФ с использованием поликлонального ФИТЦ-конъюгата.

Для этого культуру клеток CV-1, трансфицированную соответствующей плазмидой, культивировали при 37 °С в CO<sub>2</sub> инкубаторе в течение 24 ч, фиксировали и исследовали при помощи флюоресцентной микроскопии. Анализ наличия и специфичности изучаемых рекомбинантных белков и определение их локализации представлены на рис. 2.

Результаты изучения локализации рекомбинантных белков в клетках CV-1 показали:

– в цитоплазме клеток CV-1, трансфицированных плазмидой pCI-neo/E248R, наблюдается равномерное диффузное специфическое свечение в результате взаимодействия белка pE248R и антител к АЧС, меченых ФИТЦ (см. рис. 2Б);

– в цитоплазме клеток CV-1, трансфицированных плазмидой pCI-neo/EP402R, белок CD2v распределён в цитоплазме неравномерно и локализован в непосредственной близости к клеточной мембране (см. рис. 2В);

– в цитоплазме клеток CV-1, трансфицированных плазмидой pCI-neo/X69R, белок pX69R также локализован в непосредственной близости к клеточной мембране, однако его комплексы с АЧС-ФИТЦ-антителами выявляли в виде скопления гранул разного размера (см. рис. 2Г).

Подобного специфического свечения не отмечали ни в отрицательном контроле (культура клеток CV-1, трансфицированная плазмидой pCI-neo без встройки) (см. рис. 2А), ни в ядре и/или перинуклеарной зоне трансфицированных клеток линии CV-1 (см. рис. 2).

Накопление и очистка рекомбинантного белка CD2v

Культуру клеток линии CV-1, трансфицированную плазмидой pCI-neo/EP402R и pCI-neo без встройки (отрицательный контроль), инкубировали в течение 48 ч при 37 °С. Для выявления синтеза белка и оценки уровня его накопления готовили лизат клеток.

С этой целью клетки монослоя, снятые с поверхности культуральных флаконов Т-25 с помощью трипсин-версена, центрифугировали при 2000 об/мин в течение 30 мин. Осадок клеток дважды отмывали забуференным физиологическим раствором, ресуспендировали в 200 мкл раствора с ингибитором протеаз (PMSF Sigma, Германия) до концентрации 1мМ и обрабатывали ультразвуком (6 циклов по 30 сек при 20 МГц). Клеточный детрит осаждали центрифугированием при 12500 об/мин в течение 30 мин при +4 °С. В качестве контроля использовали осветленный лизат клеток, трансфицированных плазмидой pCI-neo без встройки.

Наличие рекомбинантного белка CD2v в осветлённом лизате трансфицированных клеток CV-1 определяли с помощью SDS-PAGE электрофореза. Результаты представлены на рис. 3.

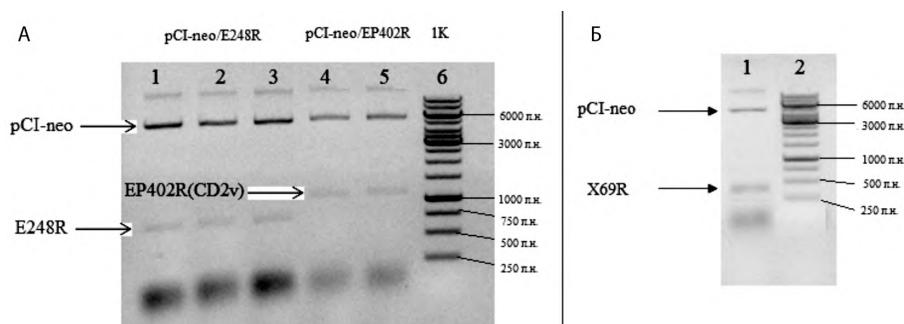


Рис. 1. Электрофореграммы продуктов рестрикции рекомбинантных плазмид pCI-neo/E248R, pCI-neo/EP402R (А) и pCI-neo/X69R (Б).

Рестрикционный анализ плазмид для определения наличия и размера встройки: А – треки 1, 2 и 3 – электрофорез pCI-neo/E248R после рестрикции; треки 4 и 5 – pCI-neo/EP402R после рестрикции; трек 6 – маркер 1к (Thermo Fisher Scientific) с линейкой фрагментов от 10 000 до 250 п.н.; Б – трек 1 – pCI-neo/X69R после рестрикции; трек 2 – маркер 1к (Thermo Fisher Scientific).

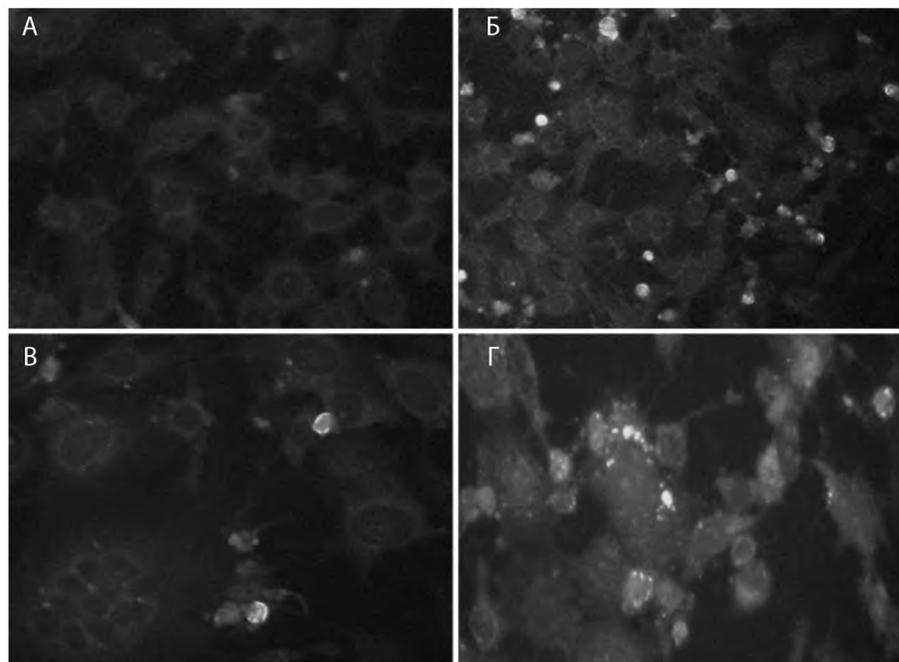


Рис. 2. Результаты реакции прямой иммунофлюоресценции – клетки CV-1 через 24 ч после трансфекции плазмидами.

А – pCI-neo без встройки – отрицательный контроль; Б – pCI-neo/E248R; В – pCI-neo/EP402R; Г – pCI-neo/X69R (ув. × 200).

На данной электрофореграмме в треках 2, 3, 4 и 5 с осветлённым лизатом клеток, трансфицированных плазмидой pCI-neo/EP402R, чётко регистрируется одна дополнительная мажорная полоса, соответствующая белку с молекулярной массой ~90 кДа, что совпадает с молекулярной массой вирусного белка CD2v. Аналогичная полоса отсутствует на треке 1 с осветлённым лизатом клеток, трансфицированных плазмидой pCI-neo.

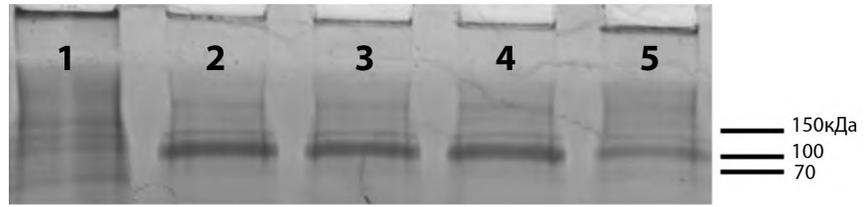


Рис. 3. Электрофореграмма лизатов клеток продуцента pCI-neo/EP402R. Трек 1 – лизат клеток продуцента pCI-neo; треки 2, 3, 4 и 5 – лизат клеток с pCI-neo/EP402R.

Далее выделяли рекомбинантный белок CD2v из ПААГ-SDS геля [19] в конечной концентрации 620 нг.

*Изучение влияния рекомбинантного белка CD2v вируса АЧС на репродукцию вируса in vitro*

Для определения характера влияния CD2v на репродукцию вируса АЧС *in vitro* рекомбинантный белок также вносили в культуру клеток селезёнки свиньи в дозе 50, 100, и 150 нг на культуральный флакон Т-25. Для каждой дозы проводили исследование в 4 параллелях. Для улучшения адсорбции из флаконов с клетками удаляли питательную среду и вносили полученный CD2v белок в 1 мл питательной среды без сыворотки. Далее флаконы инкубировали на шейкере при 37 С в течение 1 ч.

После инкубации в каждый флакон добавляли питательную среду до 10 мл и инфицировали культуру клеток вирусом АЧС изолята Краснодар 07/17 в дозе 100 гемадсорбирующих единиц (ГАДЕ) на флакон (~0,01 ГАДЕ на клетку). В качестве контроля культуры использовали интактную культуру клеток, а в качестве отрицательного контроля – культуру клеток, заражённую вирусом, но с добавлением 100 нг альбумина.

Все пробы инкубировали в течение 7 сут при 37 °С, появление гемадсорбции регистрировали с помощью светового микроскопа. С 2-х по 7-е сутки из каждого флакона отбирали пробы культуральной жидкости для исследования в реакции гемадсорбции и методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Такой же метод был использован ранее при изучении влияния рекомбинантных белков р30 и р54 на репродукцию вируса АЧС *in vitro* [22].

Поскольку ПЦР-РВ применяется как количественный метод, ранее с помощью набора ФБУН «ЦНИИ» Эпидемиологии Роспотребнадзора определили минимальное

количество копий генома вируса АЧС, выявляемого в образцах. Установили корреляцию между значениями порогового цикла (Ct) ПЦР-РВ, титра вируса в образцах и количества копий генома, в результате чего получили формулу для расчёта титра вируса по значению Ct, на основе которой рассчитали титр вируса в пробах [23]:

$$(\lg \text{ Титр }) = \frac{1,655 - \lg Ct}{0,0988},$$

где Ct – значение порогового цикла (определяется как цикл, на котором происходит пересечение флюоресцентной кривой с пороговой линией).

Для подтверждения достоверности полученных результатов пробы, отобранные на 3, 5 и 7-е сутки, были исследованы параллельно в реакции гемадсорбции (РГАд) (см. таблицу).

По данным таблицы, увеличение титра вируса в пробах с добавлением CD2v на 0,3–1,0 lg ГАДЕ<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>, определённое в РГАд, совпадает с полученными в ПЦР-РВ результатами и доказывает усиливающее влияние CD2v на репродукцию вируса АЧС *in vitro*.

Результаты эксперимента по изучению влияния разных количеств белка CD2v на уровень репродукции вируса *in vitro* также представлены на графике, построенном по данным определения титра вируса в реакции ПЦР-РВ (рис. 4).

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что внесение 50 и 100 нг CD2v приводит к равнозначному эффекту в изменении уровня репродукции вируса АЧС с 3-х по 6-е сутки эксперимента, т.е. к повышению уровня накопления вируса АЧС по сравнению с отрицательным контролем (при разнице в Ct от 1,5 до 2 циклов на 3-и сутки и 1 цикл на 6-е сутки). Однако на 7-е сутки значения титров сравнялись с отрицательным контролем.

**Оценка влияния концентрации вносимого рекомбинантного белка CD2v на уровень репродукции вируса африканской чумы свиней (n=4)**

Количество добавленного белка, нг	Титр (lg ГАДЕ <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> )					
	3-и сутки		5-е сутки		7-е сутки	
	РГАд	Рассчитанный на основе ПЦР-РВ	РГАд	Рассчитанный на основе ПЦР-РВ	РГАд	Рассчитанный на основе ПЦР-РВ
CD2v / 50	4,25±0,06	3,86±0,14	4,50±0,04	4,29±0,18	4,9±0,06	4,61±0,09
CD2v / 100	4,10±0,08	3,90±0,10	4,60±0,06	4,52±0,19	5,10±0,04	4,69±0,15
CD2v / 150	4,50±0,06	4,17±0,11	5,50±0,03	5,43±0,17	6,25±0,05	6,13±0,10
Альбумин / 100	3,85±0,06	3,54±0,10	4,45±0,08	4,13±0,07	5,30±0,06	5,00±0,16

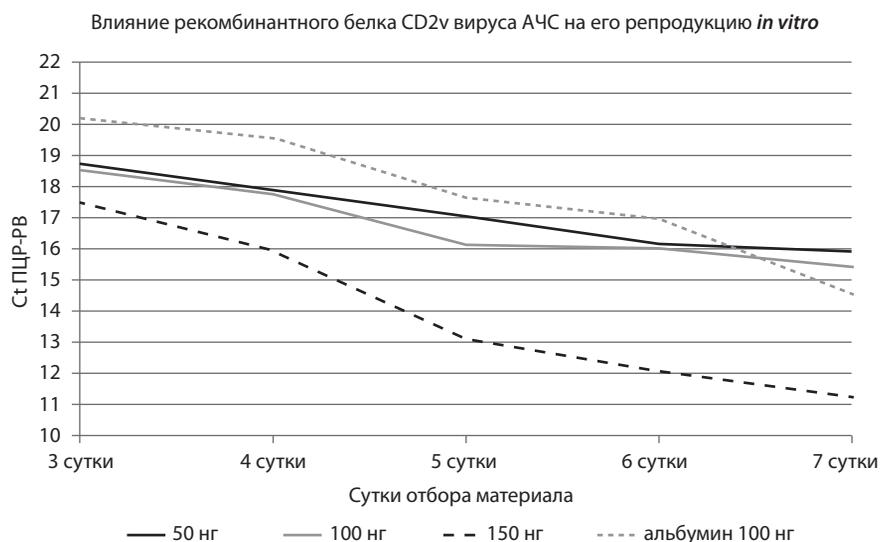


Рис. 4. График изменения уровня репродукции вируса африканской чумы свиней (АЧС) *in vitro* под воздействием белка CD2v.

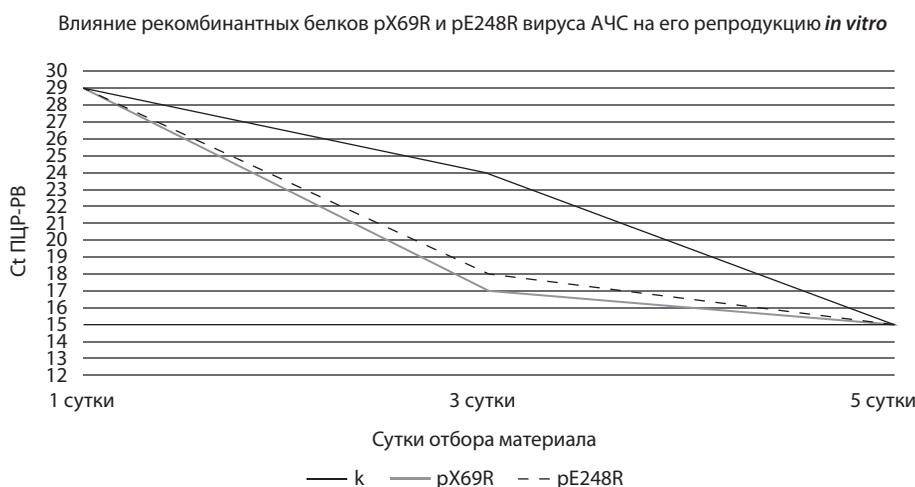


Рис. 5. График изменения уровня репродукции вируса африканской чумы свиней (АЧС) *in vitro* под воздействием белков рХ69R и рЕ248R.

*Изучение влияния рекомбинантных гликопротеинов рХ69R и рЕ248R вируса АЧС на его репродукцию in vitro*

Для индукции синтеза рекомбинантных белков рХ69R и рЕ248R в CV-1 и определения характера их влияния на репродукцию вируса АЧС *in vitro* рекомбинантные плазмиды рCI-neo/Х69R и рCI-neo/Е248R использовали для трансфекции с Lipofectamine 3000 перевиваемой линии клеток CV-1. Через 24 ч культивирования для определения наличия синтеза белка пробы исследовали методом РПИФ.

После установления наличия синтеза белка культуру клеток остальных параллельных проб инфицировали вирусом АЧС штамма «АЧС/ВНИИЗЖ/CV-1» в дозе 100 ГАДЕ на флакон (~0,01 ГАДЕ на клетку). Использование в работе этого штамма вируса АЧС обусловлено его способностью к репродукции в перевиваемой культуре клеток CV-1 и наличием детальной

характеристики его культуральных свойств [24].

В качестве отрицательного контроля использовали заражённую вирусом культуру клеток, трансфицированную плазмидой рCI-neo без встройки. Каждый опыт проводили в 6 параллелях.

Все пробы инкубировали в течение 7 сут при 37 °С, с 1-х по 7-е сутки из каждого флакона отбирали пробы культуральной жидкости для исследования с помощью метода ПЦР-РВ. Все результаты были статистически обработаны ( $p < 0,05$ ) и представлены на рис. 5.

На рис. 5 показано, что через 1 сут после заражения значение Ct ПЦР-РВ для всех проб составило 29 (~2 lg ГАДЕ<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>), а на 3-и сутки наблюдали значительную разницу уровня накопления вируса: Ct в отрицательном контроле составляло 24 цикла (~2,8 lg ГАДЕ<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>), Ct в пробах с рХ69R и рЕ248R – 17 (~4,3 lg ГАДЕ<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>) и 18 циклов (~4,0 lg ГАДЕ<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>), соответственно. На

5-е сутки Сt ПЦР-РВ во всех пробах сравнялось и составило 15 циклов ( $\sim 4,8 \lg \text{ГАдЕ}_{50}/\text{см}^3$ ).

### Обсуждение

Полученные данные демонстрируют важную роль белков CD2v, рХ69R и рЕ248R в репродукции вируса АЧС, но они в разной степени влияют на уровень и сроки его накопления.

Минимальные различия в значениях титра вируса АЧС на 7-е сутки могут быть связаны с тем, что рекомбинантный белок CD2v ускоряет его репродукцию, которая приводит к резкому уменьшению количества выживших клеток. В то время как в контрольных пробах происходит более медленное, постепенное нарастание титра вируса и, соответственно, уровня гибели инфицированных клеток, что приводит к снижению разницы в титрах 6–7-е сутки репродукции.

Интродукция 150 нг CD2v приводила к более выраженному различию в накоплении вируса в экспериментальных и контрольных пробах, так как с 3-х по 7-е сутки при добавлении 150 нг CD2v уровень накопления вируса был отличимо ( $p < 0,05$ ) выше, чем в пробах с 50 и 100 нг белка, а к 7-м суткам эта разница в Сt ПЦР-РВ достигала значения 3,5 цикла, т.е. около 0, 75–1 lg ГАдЕ<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

Исследования Rodriguez I. и соавт. (2009 г.) показали, что белок рЕ248R начинает функционировать непосредственно после проникновения вируса в клетку, участвуя в транспортировке вируса в цитоплазме [14]. Вследствие этого присутствие в клетках рЕ248R перед началом репликативного цикла инфекции, возможно, играет вспомогательную роль при транспортировке вируса в цитоплазме, что ускоряет его накопление.

Функция белка рХ69R до сих пор не была определена, однако в проведенных экспериментах удалось установить его влияние на репродукцию вируса АЧС, проявившееся в существенном ( $\sim 1,5 \lg \text{ГАдЕ}_{50}/\text{см}^3$  на 3-и сутки) увеличении его уровня накопления.

В данном эксперименте феномен влияния рекомбинантных белков на репродукцию вируса *in vitro*, проявившийся в увеличении титра накопления, имел непродолжительный характер, поскольку наблюдался только до 3-х суток эксперимента.

Интерпретировать полученный результат можно в нескольких вариантах:

1) синтез указанных белков происходит при экспрессии генов, встроенных в рСI-нео, но имеет непродолжительный характер (24–96 ч);

2) общеизвестно, что при репродукции в клетках вируса АЧС его белки способны выключать синтез клеточных мРНК и активировать синтез собственных мРНК, транскрибируемых с вирусного генома, т.е. при репликации вируса АЧС блокируется синтез хозяйских белков. В данном случае блокируется синтез белков, закодированных в плазмиде;

3) указанные белки могут оказывать влияние только на ранней стадии репродукции вируса АЧС (например, рЕ248R принимает активное участие в «раздевании» вируса и не является необходимым для дальнейших этапов его репродукции);

4) рекомбинантные белки обладают разной устойчивостью к внутриклеточным протеолитическим ферментам, поэтому могут иметь короткий период жизни (полураспада). Следовательно, белки присутствуют и действуют в короткий срок эксперимента. Когда белки разрушаются или теряют свою активность, их действие в эксперименте непродолжительно.

### Заключение

Сравнительный анализ влияния рекомбинантных белков с изученной и неизвестной функцией позволяет получить дополнительные характеристики для белков и установить, в каком этапе репродукции вируса участвует каждый белок. Функция белка CD2v хорошо известна, однако сравнительный анализ локализации CD2v и белка рХ69R с неизвестной функцией даёт дополнительную информацию о функциональных особенностях рХ69R. Вероятно, это трансмембранный белок, необходимый для репликации вируса на ранних этапах, что было продемонстрировано в ходе сравнительного анализа результатов трансфекции клеток CV-1 плазмидными конструкциями рСI-нео/EP402R и рСI-нео/Х69R.

Поскольку белок рЕ248R играет важную роль в «раздевании» вируса АЧС в цитоплазме клетки, его экспрессия в культуре клеток ускоряет этот процесс и, следовательно, репродукцию вируса. рХ69R – неизученный белок с неизвестной функцией и локализацией, поэтому представленная работа является первой, в которой были определены локализация белка в клетках и его влияние на репродукцию вируса АЧС.

Очевидно, что использованная методология позволяет выявить влияние на репликацию и других белков вируса АЧС с неизвестной функцией, что необходимо для определения основных протективных белков, а также для установления оптимальных иммунных механизмов, обуславливающих надёжную защиту от АЧС.

Таким образом, в результате проделанной работы было достоверно установлено, что рекомбинантные белки CD2v, рЕ248R и рХ69R повышают уровень репродукции вируса АЧС на 3–5-е сутки эксперимента, причём уровень его накопления на  $\sim 1,2–1,5 \lg \text{ГАдЕ}_{50}/\text{см}^3$  выше, чем у отрицательного контроля, при  $p < 0,05$  и 95% доверительном интервале.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования – Мазлум Али, Власова Н.Н.; лабораторное исследование – Мазлум Али, Жуков И.Ю., Аронова Е.В.;

сбор и обработка материала – Мазлум Али, Власова Н.Н.; статистическая обработка – Мазлум Али, Жуков И.Ю.; написание текста – Мазлум Али, Жуков И.Ю., Аронова Е.В., Власова Н.Н., Иголкин А.С.; редактирование – Власова Н.Н., Иголкин А.С.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1 – 8, 10 – 16, 18, 19  
см. REFERENCES)

9. Болгова М.В., Балышев В.М., Пономарев В.Н., Неверовская Н.С. Паспортизация изолята «Девис» вируса африканской чумы свиней. В кн.: *Материалы международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы контроля инфекционных болезней животных». Часть 1*. Покров; 2014: 43-7.
17. Мазлум А., Зиняков Н.Г., Иголкин А.С., Власова Н.Н. Клонирование генов, кодирующих трансмембранные белки и белки, ответственные за вирулентность вируса африканской чумы свиней. *Ветеринария сегодня*. 2018; (2): 3-7. Doi: <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-2-25-3-7>
20. Мазлум А., Шарыпова Д.В., Гаврилова В.Л. и др. *Методические рекомендации по выделению и титрованию вируса африканской чумы свиней в культуре клеток селезенки свиней*. Владимир; 2019.
21. Мазлум А. и др. *Методические рекомендации по оценке уровня репродукции вируса африканской чумы свиней с использованием полимеразной цепной реакции в режиме реального времени*. Владимир; 2019.
22. Мазлум А., Жуков И.Ю., Першин А.С., Иголкин А.С., Власова Н.Н. Влияние рекомбинантного белка р30 на репродукцию вируса африканской чумы свиней in vitro. *Ветеринария сегодня*. 2018; (3): 3-7. Doi: <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-3-26-3-7>
23. Мазлум А., Власова Н.Н., Аронова Е.В., Иголкин А.С., Кривонос Р.А., Черных О.Ю. Определение корреляции показателя Ct и титра вируса африканской чумы свиней в биологических жидкостях. *Ветеринария Кубани*. 2018; 24(6): 4-7.
24. Власова Н.Н., Жуков И.Ю., Мазлум А., Шарыпова Д.В., Першин А.С., Иголкин А.С. Штамм «АЧС/ВНИИЗЖ/ CV-1» вируса африканской чумы свиней, со сниженной вирулентностью для свиней, для вирусологических, диагностических, молекулярно-генетических и мониторинговых исследований. Патент РФ № 2675535; 2019.
10. Galindo I., Hernaez B., Díaz-Gil G., Escibano J.M., Alonso C. A179L, a viral Bcl-2 homologue, targets the core Bcl-2 apoptotic machinery and its upstream BH3 activators with selective binding restrictions for Bid and Noxa. *Virology*. 2008; 375(2): 561-72. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.01.050>
11. Rodríguez J.M., Yáñez R.J., Almazán F., Viñuela E., Rodríguez J.F. African swine fever virus encodes a CD2 homolog responsible for the adhesion of erythrocytes to infected cells. *J. Virol*. 1993; 67(9): 5312-20.
12. Galindo I., Almazán F., Bustos M.J., Viñuela E., Carrascosa A.L. African swine fever virus EP153R open reading frame encodes a glycoprotein involved in the hemadsorption of infected cells. *Virology*. 2000; 266(2): 340-51. Doi: <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0080>
13. Rowlands R.J., Duarte M.M., Boinas F., Hutchings G., Dixon L.K. The CD2v protein enhances African swine fever virus replication in the tick vector, *Ornithodoros erraticus*. *Virology*. 2009; 393(2): 319-28. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.040>
14. Rodríguez I., Nogal M.L., Redrejo-Rodríguez M., Bustos M.J., Salas M.L. The African swine fever virus virion membrane protein pE248R is required for virus infectivity and an early postentry event. *J. Virol*. 2009; 83(23): 12290-300. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.01333-09>
15. Xiang Z., Mobley H.L.T. Vaxign: the first web-based vaccine design program for reverse vaccinology and applications for vaccine development. *J. Biomed. Biotechnol*. 2010; 2010: 297505. Doi: <https://doi.org/10.1155/2010/297505>
16. Xiang Z., He Y. Genome-wide prediction of vaccine targets for human herpes simplex viruses using Vaxign reverse vaccinology. *BMC Bioinformatics*. 2013; 14(Suppl. 4): S2. Doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-S4-S2>
17. Mazloun A., Zinyakov N.G., Igolkin A.S., Vlasova N.N. Cloning of genes encoding transmembrane proteins and proteins responsible for african swine fever virus virulence. Cloning of genes encoding transmembrane proteins and proteins responsible for african swine fever virus virulence. *Veterinariya segodnya*. 2018; (2): 3-7. Doi: <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-2-25-3-7> (in Russian)
18. Sambrook J., Russell D.W. *The Condensed Protocols from Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor; 2006.
19. Burgess R.R. Elution of proteins from gels. *Methods Enzymol*. 2009; 463: 565-72. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63032-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63032-9)
20. Mazlum A., Sharypova D.V., Gavrilova V.L., et al. *Guidelines for the Isolation and Titration of African Swine Fever Virus in a Culture of Pig Spleen Cells [Metodicheskie rekomendatsii po vydeleniyu i titrovaniyu virusa afrikanskoy chумы sviney v kul'ture kletok selezhenki sviney]*. Vladimir; 2019. (in Russian)
21. Mazlum A., et al. *Guidelines for Assessing the Level of Reproduction of African Swine Fever virus Using Real-Time Polymerase Chain Reaction [Metodicheskie rekomendatsii po otsenke urovnya reproduktsiyu virusa afrikanskoy chумы sviney s ispol'zovaniem polimeraznoy tsepnoy reaktsii v rezhime real'nogo vremeni]*. Vladimir; 2019. (in Russian)
22. Mazloun A., Zhukov I.Y., Pershin A.S., Igolkin A.S., Vlasova N.N. The effect of recombinant proteins p30 on African swine fever virus reproduction in vitro. *Veterinariya segodnya*. 2018; (3): 3-7. Doi: <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2018-3-26-3-7> (in Russian)
23. Mazlum A., Vlasova N.N., Aronova E.V., Igolkin A.S., Krivonos R.A., Chernykh O.Yu. Determination of the correlation of Ct and titer of African swine fever virus in biological fluids. *Veterinariya Kubani*. 2018; 24(6): 4-7. (in Russian)
24. Vlasova N.N., Zhukov I.Yu., Mazlum A., Sharypova D.V., Pershin A.S., Igolkin A.S. The strain «ASF / ARRIAH / CV-1» of the virus of African swine fever, with reduced virulence for pigs, for virological, diagnostic, molecular genetic and monitoring studies. Patent RF № 2675535; 2019. (in Russian)

## REFERENCES

Поступила 23.08.19

Принята в печать 10.10.19