

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 платформе Web of Science)

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций.

Свидетельство о регистрации
ПИ № ФС77-77676 от 29 января 2020 г.

ИЗДАТЕЛЬ:

ФБУН ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора

197101, Москва, ул. Новогиреевская,
д. 3А.

Тел.: +7(495) 974-96-46.

E-mail: crie@pcr.ru

Полные тексты статей журнала
доступны на сайтах

www.elibrary.ru,

www.virusjour.elpub.ru

и www.rucont.ru/efd/331542

К публикации принимаются
статьи, подготовленные
в соответствии с правилами
для авторов
(см. www.virusjour.elpub.ru).

Точка зрения авторов может не
совпадать с мнением редакции.

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.

Журнал публикует материалы
на условиях Creative Commons
Attribution License.

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2020

Учредители: ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора,
Всероссийское научно-практическое общество
эпидемиологов, микробиологов и паразитологов

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

1

Том 65 · 2020

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., член-корр. РАН)**

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)

Жирнов О.П. (д.б.н., проф., член-корр. РАН)

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

Зуев В.А. (д.м.н., проф.)

Иванова О.Е. (д.м.н., проф.)

Карганова Г.Г. (д.б.н., проф.)

Колобухина Л.В. (д.м.н., проф.)

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

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

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

Попова А.Ю. (д.м.н., проф., Главный санитарный врач РФ)

Урываев Л.В. (д.м.н., проф., член-корр. РАН)

Юминова Н.В. (д.б.н., проф.)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Акимкин В.Г. (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

Алипер Т.И. (д.б.н., проф.; Москва, Россия)

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

Бовин Н.В. (д.х.н., проф.; Москва, Россия)

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

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

Васин А.В. (д.б.н.; Санкт-Петербург, Россия)

Глотов А.Г. (д.в.н., проф.; пос. Краснообск, Новосибирская обл., Россия)

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

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

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

Иванов А.И. (ФКУЗ "Хабаровская ПЧС"; Хабаровск, Россия)

Корзая Л.И. (д.м.н., проф.; Сочи, Россия)

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

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

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

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

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

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

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

Манапова Э.Р. (д.м.н.; Казань, 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)

Панин А.Н. (д.в.н., проф., акад. РАН; 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)

Савельев С.И. (д.м.н., проф.; Липецк, Россия)

Сметанина С.В. (к.м.н.; Москва, Россия)

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

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

Чвала И.А. (к.в.н.; г. Владимир, Россия)

Чумаков П.М. (д.б.н., проф., член-корр. РАН; Москва, Россия)

Чучалин А.Г. (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

Шестопалов А.М. (д.б.н., проф.; Новосибирск, Россия)

Щелканов М.Ю. (д.б.н., проф.; Владивосток, Россия)

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

МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

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

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

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

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

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

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

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

Oxford J. (DSc; London, UK)

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

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

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

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

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

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

Webby R. (PhD; Memphis, USA)

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

Founders: Central Research Institute for 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 65 • 1 • 2020

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,

Corresponding Member of RAS

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; **Zhirnov O.P.** – Doctor of Biological Sciences, Prof., Corresponding Member of RAS; **Zverev 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; **Popova A.Yu.** – MD, PhD, DSc, Prof., Chief Sanitary Doctor of the Russian Federation; **Uryvaev L.V.** – 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)

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

Bovin N.V. – Sc.D., Prof. (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)

Vasin A.V. – Sc.D. (Saint-Petersburg, Russia)

Glotov A.G. – Sc.D., Prof. (Krasnoobsk, Russia)

Glupov V.V. – Sc.D., Prof. (Novosibirsk, 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)

Korzaya L.I. – MD, PhD, DSc (Sochi, 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)

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

Lukashev A.N. – MD, PhD, DSc, Prof., Corr. Member of RAS (Moscow, Russia)

Makarov V.V. – Sc.D., Prof. (Moscow, Russia)

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

Manapova E.R. – MD, PhD, DSc (Kazan, 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)

Panin A.N. – Sc.D., Prof., Academician of RAS (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)

Savel'ev S.I. – MD, PhD, DSc, Prof. (Lipetsk, Russia)

Smetanina S.V. – PhD (Moscow, Russia)

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

Tutel'yan A.V. – MD, PhD, DSc, Prof., Corr. Member of RAS (Moscow, Russia)

Chvala I.A. – PhD (Vladimir, Russia)

Chumakov P.M. – Sc.D., 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)

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

INTERNATIONAL EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

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

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

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

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

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

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

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

Oxford J. (DSc; London, UK)

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

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

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

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

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

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

Webby R. (PhD, Memphis, USA)

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

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

Львов Д.К., Альховский С.В., Колобухина Л.В., Бурцева Е.И.

Этиология эпидемической вспышки COVID-19 в г. Ухань (провинция Хубэй, Китайская Народная Республика), ассоциированной с вирусом 2019-nCoV (*Nidovirales, Coronaviridae, Coronavirinae, Betacoronavirus*, подрод *Sarbecovirus*): уроки эпидемии SARS-CoV 6

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гараев Т.М., Одноров А.И., Кириллова Е.С., Бурцева Е.И., Финогенова М.П., Мукашева Е.А., Гребенникова Т.В.

Производные адамантана, способные ингибировать репродукцию резистентного к римантадину штамма вируса гриппа А(H1N1)pdm09 (*Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae*) 16

Иванов А.П., Клеблеева Т.Д., Иванова О.Е.

Опыт применения IgY-технологии для лабораторной диагностики вирусных инфекций 21

Соломай Т.В., Семенов Т.А.

Вирусные гепатиты В, С и инфекционный мононуклеоз: эпидемиологическое сходство и различия 27

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

Характеристика В1-клеток в процессе экспериментального лейкомогенеза 35

Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Лосич М.А., Елаков А.Л., Гулюкин А.М., Метлин А.Е.

Сравнительная молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса бешенства (*Rabies lyssavirus, Lyssavirus, Rhabdoviridae*), циркулировавших на территории Российской Федерации в период с 1985 по 2016 год 41

Бауэр Т.В., Трегубчак Т.В., Максютюв А.З., Колосова И.В., Максютюв Р.А., Гаврилова Е.В.

Разработка препарата онколитической иммунотерапии на основе вируса осповакцины (*Vaccinia virus, Orthopoxvirus, Chordopoxvirinae, Poxviridae*) против рака молочной железы. 49

CONTENTS

REVIEWS

Lvov D.K., Alkhovsky S.V., Kolobukhina L.V., Burtseva E.I.

Etiology of epidemic outbreaks COVID-19 on Wuhan, Hubei province, Chinese People Republic associated with 2019-nCoV (*Nidovirales*, *Coronaviridae*, *Coronavirinae*, *Betacoronavirus*, Subgenus *Sarbecovirus*): lessons of SARS-CoV outbreak 6

ORIGINAL RESEARCH

Garaev T.M., Odnovorov A.I., Kirillova E.S., Burtseva E.I., Finogenova M.P., Mukasheva E.A., Grebennikova T.V.

Adamantan derivatives capable of inhibiting the reproduction of a Rimantadine resistant strain of influenza A(H1N1)pdm09 virus (*Influenza A virus*, *Alphainfluenzavirus*, *Orthomyxoviridae*). 16

Ivanov A.P., Klebleeva T.D., Ivanova O.E.

Experience of application of IgY-technology for laboratory diagnostics of viral infections. 21

Solomay T.V., Semenenko T.A.

Viral hepatitis B, C and infectious mononucleosis: epidemiological similarities and differences. 27

Ez dakova I.Yu., Kapustina O.V., Gulyukin M.I., Stepanova T.V.

Characterization of B1-cells during experimental leukomogenesis 35

Zaykova O.N., Grebennikova T.V., Losich M.A., Elakov A.L., Gulyukin A.M., Metlin A.E.

Comparative molecular and genetic characterization of rabies viruses (*Rabies lyssavirus*, *Lyssavirus*, *Rhabdoviridae*) circulated in the Russian Federation in 1985–2016. 41

Bauer T.V., Tregubchak T.V., Maksyutov A.Z., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V.

Development of the drug oncolytic immunotherapy based on vaccinia viruses (*Vaccinia virus*, *Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*) against breast cancer 49

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020



Этиология эпидемической вспышки COVID-19 в г. Ухань (провинция Хубэй, Китайская Народная Республика), ассоциированной с вирусом 2019-nCoV (*Nidovirales*, *Coronaviridae*, *Coronavirinae*, *Betacoronavirus*, подрод *Sarbecovirus*): уроки эпидемии SARS-CoV

Львов Д.К., Альховский С.В., Колобухина Л.В., Бурцева Е.И.

Институт вирусологии им. Д.И. Иванова ФГБУ «Национальный центр эпидемиологии и микробиологии им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия

Результаты сравнительного филогенетического, вирусологического, эпидемиологического, экологического и клинического изучения тяжёлого острого респираторного синдрома (ТОРС) (SARS-2002), ближневосточного респираторного синдрома (БВРС) (MERS-2012) и эпидемической вспышки острого респираторного заболевания (COVID-19) в 2019–2020 гг. в г. Ухань (Хубэй, Китайская Народная Республика, КНР) позволили сделать следующие выводы:

- этиологическим агентом COVID-19 является коронавирус (вирус 2019-CoV), филогенетически близкий к возбудителю ТОРС (вирус SARS-related human CoV) и родственным ему коронавирусам, изолированным от летучих мышей (вирусы SARS-related bat CoV). Эти вирусы относятся к подроду *Sarbecovirus* рода *Betacoronavirus*, подсемейства *Orthocoronavirinae*, семейства *Coronaviridae* (*Coronavirinae*: *Nidovirales*). Следовательно, эпидемическая вспышка острого респираторного заболевания COVID-19 является вариантом ТОРС (КНР, 2002) и отличается от БВРС (Саудовская Аравия, 2012), вызванного другим коронавирусом, относящимся к подроду *Merbecovirus* того же рода;
- согласно результатам филогенетического анализа 35 различных бетакоронавирусов (*Betacoronavirus*), изолированных в 2002–2019 гг. от людей и из природных источников, природным резервуаром коронавируса 2019-nCoV, также как и вируса SARS-related human CoV, являются летучие мыши рода *Rhinolophus* (*Rhinolophidae*), но, возможно, и представители других родов. Дополнительным резервуаром вируса могут служить употребляемые в пищу промежуточные виды животных (змеи, циветты, ежи, барсуки и т.д.), заражение которых происходит при поедании инфицированных летучих мышей. SARS-подобные вирусы циркулировали среди летучих мышей в межэпидемическом периоде (2003–2019 гг.);
- сезонные коронавирусы (подрод *Duvinacovirus*, род *Alphacoronavirus*) циркулируют в настоящее время (ноябрь 2019 г. – январь 2020 г.) в Европейской части, на Урале, в Сибири и на Дальнем Востоке России, наряду с вирусами гриппа А (H1N1)pdm09, А (H3N2) и В, а также другими шестью вирусами, вызывающими острые респираторные вирусные инфекции (вирус парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус, адено-, рино-, бока-, и метапневмовирусы).

Ключевые слова: обзор; коронавирус; *Betacoronavirus*; ТОРС, БВРС, SARS-CoV; MERS-CoV; 2019-nCoV; COVID-19, летучие мыши; экология; секвенирование; филогенетика.

Для цитирования: Львов Д.К., Альховский С.В., Колобухина Л.В., Бурцева Е.И. Этиология эпидемической вспышки COVID-19 в г. Ухань (провинция Хубэй, Китайская Народная Республика), ассоциированной с вирусом 2019-nCoV (*Nidovirales*, *Coronaviridae*, *Coronavirinae*, *Betacoronavirus*, подрод *Sarbecovirus*): уроки эпидемии SARS-CoV. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(1): 6-15.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-6-15>

Для корреспонденции: Львов Дмитрий Константинович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, руководитель отдела экологии вирусов с научно-практическим центром по экологии и эпидемиологии гриппа, Институт вирусологии им. Д.И. Иванова ФГБУ «Национальный центр эпидемиологии и микробиологии им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: dk_lvov@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 20.01.20

Принята в печать 29.01.20

Etiology of epidemic outbreaks COVID-19 in Wuhan, Hubei province, Chinese People Republic associated with 2019-nCoV (*Nidovirales*, *Coronaviridae*, *Coronavirinae*, *Betacoronavirus*, Subgenus *Sarbecovirus*): lessons of SARS-CoV outbreak

Lvov D.K., Alkhovsky S.V., Kolobukhina L.V., Burtseva E.I.

D.I. Ivanovsky Institute of Virology of National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia

Results of analysis of phylogenetic, virological, epidemiological, ecological, clinical data of COVID-19 outbreaks in Wuhan, China (PRC) in comparison with SARS-2002 and MERS-2012 outbreaks allow to conclude:

- the etiological agent of COVID-19 is coronavirus (2019-CoV), phylogenetically close to the SARS-CoV, isolated from human, and SARS-related viruses isolated from bats (SARS-related bat CoV viruses). These viruses belong to the *Sarbecovirus* subgenus, *Betacoronavirus* genus, *Orthocoronavirinae* subfamily, *Coronaviridae* family (*Cornidovirineae*: *Nidovirales*). COVID-19 is a variant of SARS-2002 and is different from MERS-2012 outbreak, which were caused by coronavirus belonged to the subgenus *Merbecovirus* of the same genus;
- according to the results of phylogenetic analysis of 35 different betacoronaviruses, isolated from human and from wild animals in 2002-2019, the natural source of COVID-19 and SARS-CoV (2002) is bats of *Rhinolophus* genus (*Rhinolophidae*) and, probably, some species of other genera. An additional reservoir of the virus could be an intermediate animal species (snakes, civet, hedgehogs, badgers, etc.) that are infected by eating of infected bats. SARS-like coronaviruses circulated in bats in the interepidemic period (2003-2019);
- seasonal coronaviruses (subgenus *Duvinacovirus*, *Alphacoronavirus*) are currently circulating (November 2019 – January 2020) in the European part of Russia, Urals, Siberia and the Far East of Russia, along with the influenza viruses A(H1N1)pdm09, A(H3N2), and B, as well as six other respiratory viruses (HPIV, HAdV, HRSV, HRV, HBoV, and HMPV)

Keywords: review; *Coronaviridae*; *Betacoronavirus*; SARS-CoV; MERS-CoV; 2019-nCoV; COVID-19, bats; ecology; sequencing; phylogenetic.

For citation: Lvov D.K., Alkhovsky S.V., Kolobukhina L.V., Burtseva E.I. Etiology of epidemic outbreaks COVID-19 on Wuhan, Hubei province, Chinese People Republic associated with 2019-nCoV (*Nidovirales*, *Coronaviridae*, *Coronavirinae*, *Betacoronavirus*, Subgenus *Sarbecovirus*): lessons of SARS-CoV outbreak. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2020; 65(1): 6-15.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-6-15>

For correspondence: Dmitry K. Lvov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Academician of RAS, Head of the Department of Ecology of Viruses, Head of Ecology and Epidemiology of Influenza Center, D.I. Ivanovsky Institute of Virology of National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia. E-mail: dk_lvov@mail.ru.

Information about authors:

Lvov D.K., <https://orcid.org/0000-0001-8176-6582>

Alkhovsky S.V., <https://orcid.org/0000-0001-6913-5841>

Kolobukhina L.V., <https://orcid.org/0000-0001-5775-3343>

Burtseva E.I., <https://orcid.org/0000-0003-2518-6801>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 20 January 2020

Accepted 29 January 2020

Введение

Коронавирусы (CoV; семейство *Coronaviridae*) принадлежат к отряду *Nidovirales*, который объединяет крупные оболочечные РНК-содержащие вирусы. На фотографиях, полученных с использованием криогенной электронной микроскопии, вирион коронавируса имеет практически сферическую форму (120–160 нм) с характерными выростами – пепломерами (15–20 нм), формирующими зубчатое обрамление вокруг вирионов (отсюда название: коронавирусы, от лат. *Corona*). Геном коронавируса представлен одноцепочечной РНК позитивной полярности длиной около 30 тыс. н.о., что является максимальным размером среди всех известных РНК-содержащих вирусов. Геном коронавируса имеет сложную генную организацию (рис. 1). Большую часть генома с 5'-стороны занимают гены 1a и 1b, которые транслируются в виде одного полипротеина pp1a1b (ORF1ab) и кодируют белки репликазного комплекса. Многочисленные гены, расположенные в оставшейся 3'-части генома, ко-

дируют структурные белки вириона и вспомогательные неструктурные белки. В настоящее время к отряду *Nidovirales* относятся три семейства. Современная таксономия семейства *Coronaviridae* включает два подсемейства и 8 родов [1–5]. Коронавирусы распространены повсеместно и инфицируют млекопитающих (включая человека), птиц, рыб, ракообразных и насекомых (табл. 1, см. рис. 1). Природным резервуаром ряда коронавирусов из родов *Alpha-* и *Betacoronavirus* являются летучие мыши (отряд рукокрылые, *Chiroptera*) родов *Chaerophon*, *Eptesicus*, *Glossophaga*, *Myotis*, *Miniopterus*, *Nyctalus*, *Pipistrellus*, *Rhinolophus*, *Rousettus*, *Tylonycteris*.

Коронавирусы человека (штамм HCoV229E, *Alphacoronavirus*) впервые были выделены D. Tyrrell и M. Вуное в 1965 г. от больных острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ). Ряд вирусов родов *Alpha-* и *Betacoronavirus* вызывают тяжёлые инфекции животных: свиней (трансмиссивный гастроэнтерит, эпизоотическая диарея, торовирусная

Таблица 1. Таксономическая структура подсемейства *Orthocoronavirinae* семейства *Coronaviridae* (подотряд *Cornidovirineae*, отряд *Nidovirales*)

Table 1. Taxonomy of the subfamily *Orthocoronavirinae* (*Coronaviridae* family,suborder *Cornidovirineae*, order *Nidovirales*)

Род Genus	Подрод Subgenus	Вид Species	Вирусы Viruses	Хозяева Hosts
<i>Alphacoronavirus</i>	<i>Colacovirus</i>	<i>Bat coronavirus CDPHE15</i>	Bat coronavirus CDPHE15/USA/200	Млекопитающие (человек, летучие мыши, свиньи, собаки, кошки, лошади, мыши) Mammals (human, bats, pigs, dogs, cats, horses, mice)
		<i>Bat coronavirus HKU10</i>	Myotis lucifugus coronavirus Hipposideros bat coronavirus HKU10 Rousettus bat coronavirus HKU10	
	<i>Decacovirus</i>	<i>Rhinolophus ferrumequinum alphacoronavirus HuB-2013</i>	BtMs-AlphaCoV/GS2013 BtRf-AlphaCoV/HuB2013	
		<i>Human coronavirus 229E</i>	Alfa CoV1 HCoV229E-human coronavirus 229E	
	<i>Duvinacovirus</i>	<i>Lucheng Rn rat coronavirus</i>	Lucheng Rn rat coronavirus	
	<i>Luchacovirus</i>	<i>Ferret coronavirus</i>	Ferret enteric coronavirus	
	<i>Minacovirus</i>	<i>Mink coronavirus 1</i>		
	<i>Minunacovirus</i>	<i>Miniopterus bat coronavirus 1</i>	Mi-BatCoV1 (Miniopterus bat coronavirus 1)	
		<i>Miniopterus bat coronavirus HKU8</i>	Miniopterus bat coronavirus HKU8	
	<i>Myotacovirus</i>	<i>Myotis ricketti alphacoronavirus Sax-2011</i>	Nyctalus velutinus alphacoronavirus SC-2013	
	<i>Nyctacovirus</i>	<i>Nyctalus velutinus alphacoronavirus SC-2013</i>	Nyctalus velutinus alphacoronavirus SC-2013	
	<i>Pedacovirus</i>	<i>Porcine epidemic diarrhea virus</i>	PEDV (porcine epidemic diarrhea virus) и др.	
		<i>Scotophilus bat coronavirus 512</i>	Bat coronavirus (BtCoV/512/2005)	
	<i>Rhinacovirus</i>	<i>Rhinolophus bat coronavirus HKU2</i>	Bat coronavirus HKU2	
	<i>Setracovirus</i>	<i>Human coronavirus NL63</i>	Human coronavirus 1196/2001/NL	
		<i>NL63-related bat coronavirus strain BtKYNL63-9b</i>	NL63-related bat coronavirus	
<i>Tegacovirus</i>	<i>Alphacoronavirus 1</i>	Canine coronavirus Feline coronavirus Swine enteric coronavirus Transmissible gastroenteritis virus		
<i>Betacoronavirus</i>	<i>Embecovirus</i>	<i>China Rattus coronavirus HKU24</i>	Rat coronavirus HKU24	Млекопитающие (человек, крупный рогатый скот, верблюды, лошади, свиньи, барсуки, циветты, мыши, летучие мыши) Mammals (human, cattle, camels, horses, pigs, badgers, civets, mice, bats)
		<i>Human coronavirus HKU</i>	Human coronavirus OC 43,	
		<i>Murine coronavirus</i>	Murine coronavirus	
	<i>Hibecovirus</i>	<i>Bat Hp-betacoronavirus Zhejiang2013</i>	Bat Hp-betacoronavirus Zhejiang2013	
	<i>Merbecovirus</i>	<i>Hedgehog coronavirus 1</i>	Betacoronavirus Erinaceus/VMC/DEU/2012	
		<i>Middle East respiratory syndrome-related coronavirus</i>	MERS-CoV MERS-CoV-related bat Pipistrellus kuhlii Italy 2011, MERS-CoV-related Bat Hypsigo savii Italy 2011, MERS-CoV-related Camelus dromedaries Saudi Arabia 2013 и др.	
	<i>Nobecovirus</i>	<i>Pipistrellus bat coronavirus HKU5</i>	Bat coronavirus HKU5-1	
		<i>Tylonycteris bat coronavirus HKU4</i>	Bat coronavirus HKU4-1	
		<i>Rousettus bat coronavirus GCCDC1</i>	Rousettus bat coronavirus	
	<i>Sarbecovirus</i>	<i>Rousettus bat coronavirus HKU9</i>	Bat coronavirus HKU9-1	
<i>Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus</i>		Wuhan seafood market coronavirus 2019-nCoV SARS-related human coronavirus Urbani, SARS-related Rhinolophus bat coronavirus Rp3/2004, SARS-related Rhinolophus bat coronavirus RF1/2007, SARS-related Rhinolophus bat coronavirus Rm1/2005, SARS-related Rhinolophus bat coronavirus HKU3/24/2005, SARS-related palm civet coronavirus SZ/2003, SARS-related Chinese ferret badger coronavirus, CFB/Sz/94/03 и др.		

Продолжение табл. 1 см. на стр. 9

Род Genus	Подрод Subgenus	Вид Species	Вирусы Viruses	Хозяева Hosts
<i>Deltacoronavirus</i>	<i>Andecovirus</i>	<i>Wigeon coronavirus HKU20</i>	Infectious bronchitis virus Beaudette	Птицы Birds
		<i>Buldecovirus</i>	<i>Bulbul coronavirus HKU11</i>	
	<i>Coronavirus HKU15</i>	Porcine coronavirus HKU15		
	<i>Munia coronavirus HKU13</i>	Munia coronavirus HKU13		
	<i>White-eye coronavirus HKU16</i>	White-eye coronavirus HKU16		
	<i>Herdecovirus</i>	<i>Night heron coronavirus HKU19</i>	Night-heron coronavirus HKU19	
	<i>Moordecovirus</i>	<i>Common moorhen coronavirus HKU21</i>	Common-moorhen coronavirus HKU21	
<i>Gammacoronavirus</i>	<i>Cegacovirus</i>	<i>Beluga whale coronavirus SW1</i>	Beluga whale coronavirus SW1	Киты Whales
	<i>Igacovirus</i>	<i>Avian coronavirus</i>	ACoV (avian coronavirus)	Птицы Birds

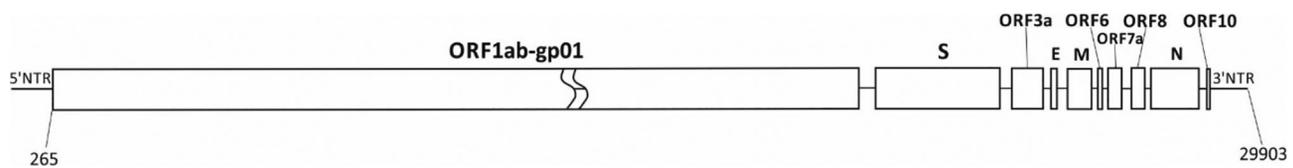


Рис. 1. Структура генома коронавируса 2019-nCoV. Геном представлен одноцепочечной РНК позитивной полярности. Большую часть генома с 5'-стороны занимают гены 1a и 1b, которые транслируются в виде одного полипротеина (ORF1ab) и кодируют белки репликазного комплекса (РНК-зависимая РНК-полимераза, протеаза, хеликаза, праймаза и др.). Многочисленные гены, расположенные в оставшейся 3'-части генома, кодируют структурные белки вириона (S, E, M, N) и вспомогательные неструктурные белки.

Fig. 1. Genome organization of new 2019-nCoV virus. The genome of the virus is ss(+)RNA. The majority of the genome at the 5' part is occupied by 1a and 1b ORF, which are translated as a single polyprotein (ORF1ab) and encode proteins of the replicase complex (RNA-dependent RNA polymerase, protease, helicase, primase, etc.). The genes located in the 3' part of the genome encode structural proteins of the virion (S, E, M, N) and non-structural auxiliary proteins.

диарея), крупного рогатого скота (диарея, поражение респираторного тракта), лошадей (торовирусная инфекция Берне), собак (энтерит), кошек (инфекционный перитонит), мышей и крыс (инфекционный гепатит, сиалодакриоаденит), птиц (инфекционный бронхит кур) [1–8]. Неклассифицированный коронаподобный вирус Рунде (RNDV) был изолирован в 1977 г. из клещей *Ixodes uriae*, собранных в гнездовых колониях морских птиц на о. Рунде (север Норвегии) [9].

Сезонная коронавирусная инфекция у людей регистрируется в течение года, преимущественно среди детей младшего возраста, с эпидемическим подъёмом зимой и ранней весной. Коронавирусная инфекция ассоциирована с несколькими вирусами (HCoV229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43) рода *Alphacoronavirus* (см. табл. 1) [2]. Среди других возбудителей ОРВИ коронавирусная инфекция составляет до 10% и часто является причиной внутригоспитальных вспышек в детских клиниках. Как правило, сезонные коронавирусы поражают эпителий верхних дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта, обладая также нейротропностью. Инкубационный период – 2–3 сут; начало острое, с сухим кашлем, першением в горле, лихорадкой, ринитом, иногда с диареей с благоприятным исходом [10, 11].

Тяжёлый острый респираторный синдром (ТОРС, SARS)

Возбудитель ТОРС (вирус SARS-related human coronavirus Urbani – SARS-CoV) относится к роду *Betacoro-*

navirus (см. табл. 1). Заболевание, впервые возникшее в ноябре 2002 г. в китайской провинции Гуандун, было описано итальянским врачом С. Urbani, заразившимся и погибшим в процессе лечения пациентов. Прототипный штамм выделенного вируса получил название в его честь [12]. Источником заражения людей, вероятно, стали употребляемые в пищу гималайские цветоты *Paguma larrata* [13], а также енотовидные собаки *Nyctereutes procyonoides*, бирманские хорьковые барсуки *Melogale personata* и др. [1, 14, 15]. Однако дальнейшие исследования показали, что природные очаги вируса SARS-CoV, как и многих других коронавирусов, связаны с представителями отряда рукокрылых (*Chiroptera*), в первую очередь с летучими мышами. От летучих мышей SARS-CoV-подобные вирусы изолировали, в основном от подковоносов *Rhinolophus*, а также от видов, принадлежащих к другим родам, в Азии (прежде всего в Китае), Африке, Австралии, Европе, Америке [1, 2, 14, 16–23]. Популяционный транзит SARS-CoV-подобных коронавирусов происходит от летучих мышей (природные очаги) к мелким млекопитающим, употребляющим их в пищу (экологически связанным с ними) с дальнейшим распространением среди людей, главным образом респираторным путём, реже – алиментарным.

По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), к августу 2003 г. было зарегистрировано 8098 случаев ТОРС с 4–11% летальностью [24]. Наибольшее количество заболевших выявлено в Китайской Народной Республике (КНР), Сингапу-

ре и Канаде. Распространение вируса происходило из Юго-Восточной Азии по международным авиалиниям в связи с коротким инкубационным периодом (2–3 сут) [24–27]. Распространение заболевания происходило в основном в госпитальных условиях. Один больной в среднем заражал трёх-четырёх контактных лиц [28]. 60% всех летальных случаев пришлось на медицинских работников. При тяжёлых формах с пневмонией развивается диффузное поражение альвеол за счёт нарушения целостности их стенок, повышения проницаемости капиллярной мембраны с последующим отёком лёгких, развиваются гипоксия, артериальная гипоксемия, респираторный ацидоз и алкалоз [26, 29, 30]. В основе патогенеза острого повреждения лёгких лежит пропотевание плазмы и форменных элементов крови в альвеолы и интерстиций лёгких.

Начало болезни острое: озноб, температура тела 38–39 °С, головная боль, слабость, мышечные боли, кашель, боли в горле, ринит [29]. На 3-й – 7-й день болезни развивается респираторная фаза с признаками поражения нижних дыхательных путей, с усилением кашля, появлением одышки, чувства нехватки воздуха. При аускультации на фоне ослабленного дыхания прослушиваются влажные хрипы. Нарастают гипоксия и гипоксемия. На рентгенограмме выявляются мультифокальные, имеющие тенденцию к сливной инфильтраты. В $\frac{1}{3}$ случаев появляются признаки поражения желудочно-кишечного тракта: тошнота, рвота, диарея. В 10% случаев развивается синдром острого повреждения лёгких с сухим кашлем, одышкой, тахипноэ и тахикардией, высокой температурой, снижением артериального давления, угнетённым дыханием, сменой алкалоза на ацидоз, нарастанием отёка лёгких, острой дыхательной недостаточностью с неблагоприятным исходом. Хотя специфических противовирусных препаратов в настоящее время не разработано, в нескольких исследованиях показано, что коронавирусы чувствительны к высоким дозам интерферона (препараты Вэллферон, Бетаферон, интерферон альфа-2b и др.) и рибавирина [31, 32].

Ближневосточный респираторный синдром (БВРС, MERS-CoV)

Первые случаи заболевания БВРС у людей были зарегистрированы в восточной части Саудовской Аравии в сентябре 2012 г. Завозные случаи выявлены в других странах Ближнего Востока (Иордания, Катар, Объединённые Арабские Эмираты), в Северной Африке (Тунис), в Европе (Франция, Германия, Великобритания, Италия) и в Америке (США, Канада) [33]. Эпизодические случаи отмечены и в Саудовской Аравии. На декабрь 2019 г. подтверждены 2484 случая, из которых 857 (34,5%) закончились летальным исходом.

Заражение происходит через продукты жизнедеятельности летучих мышей, являющихся природным резервуаром вируса, а также, возможно, через промежуточных хозяев – верблюдов [34, 35]. Среди людей установлена прямая передача, особенно медицин-

ским работникам, тесно контактирующим с больными. Клиническая картина при БВРС принципиально не отличается от ТОРС. Возбудитель БВРС (вирус MERS-CoV) также относится к роду *Betacoronavirus*, подроду *Merbecovirus* (см. табл. 1).

Следует иметь в виду, что ряд видов отряда рукокрылых (*Chiroptera*), подобно птицам, осуществляют ежегодные сезонные миграции, зимую в том числе в пределах ареала природных очагов вируса БВРС [36]. Таким образом, вирус, помимо экспорта с инфицированными людьми, может попасть на территорию РФ и с летучими мышами. Не случайно все эпидемические вспышки возникали осенью, в период миграции летучих мышей. Такая же ситуация характерна для вспышек новых вариантов гриппа птиц, которые происходят во время или после массовой миграции, когда наблюдаются высокая концентрация животных в местах зимовок и перемешивание популяций.

Новый коронавирус 2019-nCoV (COVID-19)

Вспышка заболевания зарегистрирована в декабре 2019 г. в г. Ухань (провинция Хубэй, КНР) [37], хотя первые случаи были зафиксированы ещё в ноябре 2019 г. Вспышка имеет тенденцию к распространению на другие 30 городов КНР, включая Пекин и Шанхай [38]. Инфицированные пациенты выявлены не менее чем в 40 странах Азии, Америки, Европы и Австралии; в Российской Федерации выявлены два случая. В КНР и ряде других стран к 01.03.2020 зарегистрировано более 80 тыс. случаев с 2,0% летальностью. В Ухане и ещё в 17 городах объявлен карантин, туда направлено дополнительно порядка 4000 медицинского персонала, включая 450 военных врачей, за 2 нед построены две современные боксированные больницы, каждая на 1000 коек. В КНР предприняты быстрые и жёсткие меры, направленные на ограничение распространения инфекции и минимизацию последствий. Между тем Минсельхоз КНР объявил о новой вспышке гриппа А (H5N1) среди домашних птиц в провинции Хунань, пограничной с Хубэй (случаев заболевания людей пока не выявлено). ВОЗ на 30.01.2020 объявила чрезвычайную медицинскую ситуацию на международном уровне.

Первичным источником инфекции на первом этапе исследований считали морепродукты на пищевом рынке, где продают много других продуктов животного происхождения, в частности змей (вторая гипотеза о первичном источнике). Однако, как показывает анализ данных по филогенетике выделенных штаммов, первичным природным резервуаром, подобно вирусам SARS-CoV и MERS-CoV, являются тяготеющие к жилью человека виды летучих мышей (рис. 2). Основное значение имеют подковоносы (*Rhinolophidae*, *Rhinolophus*), в том числе большой подковонос *R. ferrumequinum* (Schreber, 1775). Ареал большого подковоноса включает Европу, Крым, Кавказ, Среднюю Азию, Северную Африку, Северную Индию, Китай, Корею и Японию [36]. В Российской Федерации он распространён вплоть до 44°с.ш., образует колонии до 500 особей, обычно с трёхцветной ночницей

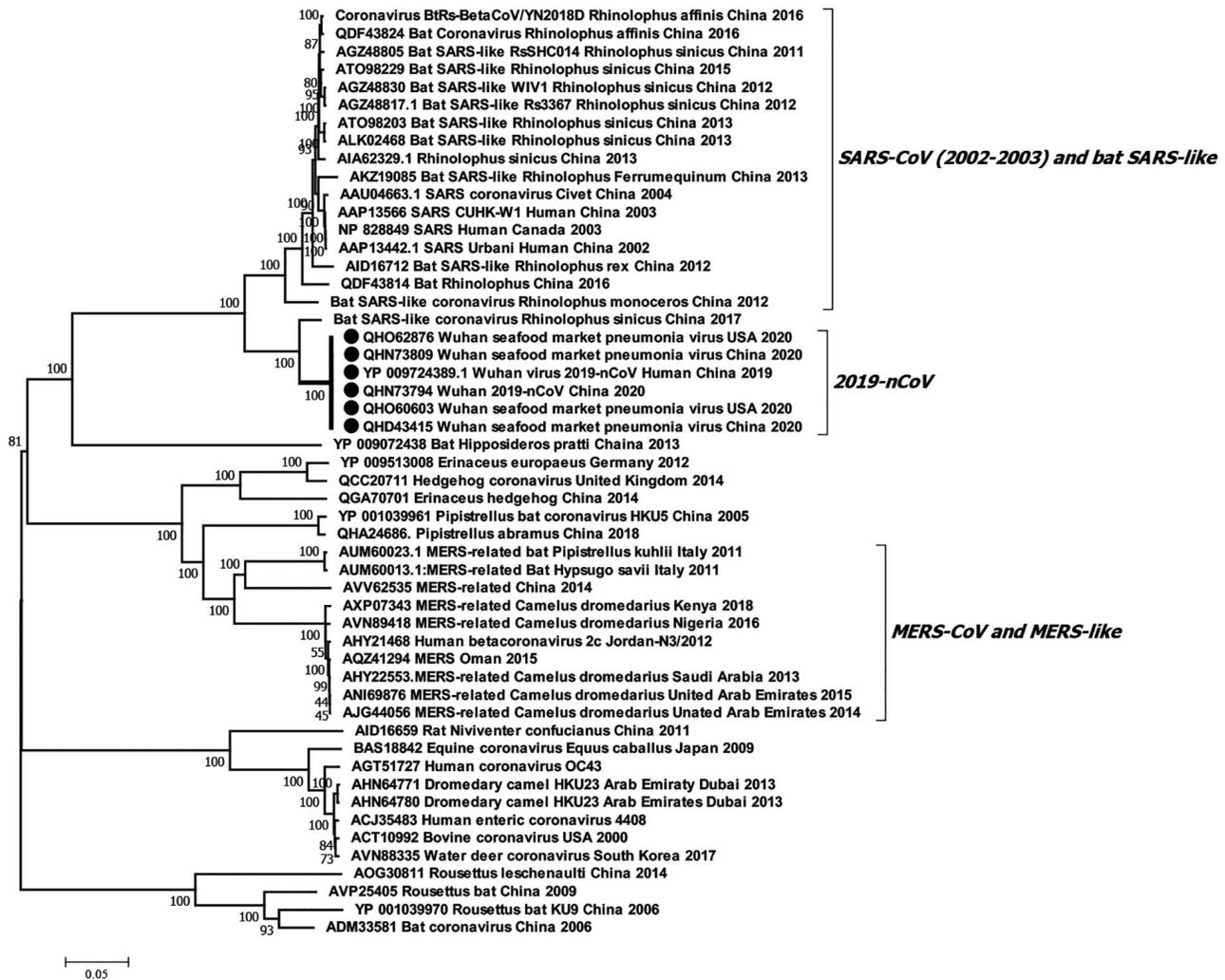


Рис. 2. Филогенетическая структура рода *Betacoronavirus* (*Coronaviridae: Nidovirales*) с указанием положения нового коронавируса 2019-nCoV.

Fig. 2. Phylogenetic tree of the *Betacoronavirus* genus. The strains of new coronavirus 2019-nCoV are marked with dots.

(*Myotis emarginatus*, E. Geoffroy, 1806), тяготеет к жилию человека, совершает сезонные миграции. В местах зимовок скапливается до 500 особей, половину из них составляет молодняк, не имеющий иммунитета к инфекциям. Вирусы выделены от летучих мышей в 2011 г. (1), в 2012 г. (4), в 2013 г. (4), в 2015 г. (1), в 2016 г. (2) и в 2017 г. (1). Это значит, что вирус продолжал циркулировать в КНР среди летучих мышей, главным образом среди видов рода *Rhinolophus* в межэпидемический период при отсутствии заболеваемости среди людей. В 2006–2014 гг. в КНР изолировали три штамма *Betacoronavirus* от летучих мышей рода *Rousettus* (см. рис. 2).

Европейское региональное бюро ВОЗ разработало ряд документов для обеспечения готовности стран региона к противодействию новой опасности в случае дальнейшего распространения вируса. Подготовлены оценка экспресс-рисков по состоянию на 22.01.2020; рекомендации по определению случаев заболевания для эпидемиологического надзора [39], клиническо-

му ведению тяжёлых больных, стандартному набору документации и медицинских изделий для противодействия болезни [40, 41]; руководство по снижению риска передачи инфекции от животных к человеку на рынках живых животных [39], по диагностическим процедурам [40–43]. Использование лабораторных методов (ОТ-ПЦР в реальном времени) абсолютно необходимо, поскольку выявлены случаи инapparантного течения болезни [44].

В Российской Федерации на 4-й неделе 2020 г. (с 20 по 26 января) активно циркулировали вирусы гриппа А (H1N1)pdm09, H3N2 и В с единичными летальными исходами, а также другие возбудители ОРВИ: респираторно-синцициальный вирус, риновирусы, аденовирусы, вирус парагриппа, бокавирусы, метапневмовирусная и микоплазменная инфекции. Выявлены единичные находки сезонного представителя коронавирусов (*Alphacoronavirus*) (данные Центра экологии и эпидемиологии гриппа Национального центра по гриппу, сотрудничающего с ВОЗ, Ин-

Таблица 2. ПЦР-диагностика в базовых лабораториях с 1 ноября 2019 г. по 31 января 2020 г.
Table 2. PCR-diagnostic of influenza and ARVI in Collaborative Centers (01.11.2019-31.01.2020)

Регион Region	Федеральный округ Federal district	Сотрудничающий центр Collaborative Center	Грипп Influenza			всего положительных (total positive)	обследовано (investigated)	корона-вирусы* (Alpha-coronaviruses)	парагрипп (parainfluenza)	аденовирусы (Adeno, HAdV)	Острые респираторные вирусные инфекции ARVI					всего положительных (total positive)
			A	H1N1 Pdm2009	H3N2						B	респираторно-синциальный вирус (Respi. Syn., HRSV)	риновирусы (Rhino, HRV)	бока-вирусы (Boca, HBoV)	метапневмо-вирус (meta-pneumo, HMPV)	
Европейская часть РФ European part	Северо-Западный Northwestern	Великий Новгород Vilny Novgorod	299	2	-	3	5	86	-	-	5	-	-	-	-	5
		Центральный Central	469	10	113	4	127	254	3	1	2	6	9	5	26	
		Липецк Lipetsk	773	-	3	-	6	773	-	17	3	8	10	57		
		Владимир Vladimir	303	-	7	1	19	138	-	10	4	-	7	33		
		Ярославль Yaroslavl	285	-	7	2	8	250	6	9	23	20	16	105		
		Пенза Penza	271	-	41	-	7	114	5	1	1	11	-	18		
		Чебоксары Cheboksary	374	-	17	-	16	0	-	-	-	-	-	0		
Урал Ural	Уральский Ural	Оренбург Orenburg	1181	15	100	-	28	1181	25	13	4	45	13	180		
Сибирь Siberia	Западно-Сибирский Siberian	Томск Tomsk	174	-	3	-	6	180	16	19	10	11	6	94		
Дальний Восток Far East	Дальневосточный Far Eastern	Владивосток Vladivostok	1420	-	24	39	363	1420	1	21	11	13	3	140		
		Биробиджан Birobidzhan	614	-	5	6	3	614	3	55	5	6	26	200		
Итого: Total:	из числа обследованных, абс из числа положительных, % Positive, %	6163	25	322	52	583	982	4872	59	145	79	121	86	40	864	
			2,5	32,8	5,3	59,4	100	6,8	16,8	9,1	14,0	38,7	10,0	4,6	100	

Примечание. *все случаи коронавирусной инфекции связаны с сезонными вирусами рода *Alphacoronavirus*.
Note. * All cases of coronavirus infection are associated with seasonal viruses of the genus *Alphacoronavirus*.

Таблица 3. Сравнительные показатели заболеваемости и смертности людей от зоонозных вирусов, принадлежащих семействам *Coronaviridae* (*Betacoronavirus*) и *Orthomyxoviridae* (*Influenza A virus*), в 2002–2019 гг.**Table 3.** Morbidity and mortality of humans associated with zoonotic viruses (*Coronaviridae* (*Betacoronavirus*), and *Orthomyxoviridae* (*Influenza A virus*)) in 2002–2019

Семейство Family	Род Genus	Подрод Subgenus	Вирус Virus	Период, годы Period	Число заболевших Number of infected	Летальность, % Mortality, %	Район возникно- вения Place of origin	Природный резервуар Natural source
<i>Coronaviri- dae</i>	<i>Betacorona- virus</i>	<i>Merbeco- virus</i>	MERS-CoV	2012–2019	2,5 тыс. 2,5 ths	35	Саудовская Аравия + 26 стран Saudi Arabia + 26 countries	Летучие мыши (<i>Pip- istrellus</i> и др.) Bats (<i>Pipistrellus</i> and other)
			SARS-relat- ed CoV	2002–2003	8,5 тыс. 8,5 ths	11	КНР + 20 стран PRC + 20 coun- tries	Летучие мыши (<i>Rhino- lophus</i> и др.) Bats (<i>Rhinolophus</i> and other)
		COVID-19	2019–...	Более 90 тыс. More than 90 ths	3	КНР+ 70 стран PRC + 70 coun- tries	Летучие мыши Bats (<i>Rhinolophus</i> and other)	
<i>Orthomyxo- viridae</i>	<i>Influenza virus A</i>		H5N1	2003–2019	861	53	КНР + 17 стран PRC + 17 coun- tries	Птицы (водного комплекса) Water complex birds
			H5N6	2014–2019	24	29	КНР PRC	Птицы Birds
			H7N9	2013–2019	1568	39	КНР PRC	Птицы (водного ком- плекса) Water complex birds
			H9N2	2015–2019	28	0	КНР PRC	Птицы (водного ком- плекса) Water complex birds

ститут вирусологии им. Д.И. Ивановского, НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России (ЦЭЭГ)) (табл. 2).

Блестящая работа китайских вирусологов в кратчайшие сроки обеспечила изоляцию возбудителя и его молекулярно-генетическую характеристику после секвенирования полного генома (MN908947.3). Свободный доступ к этим результатам позволил немедленно разработать диагностические тест-системы, на основе ОТ-ПЦР в режиме реального времени. К концу января 2020 г. эти тест-системы, разработанные в вирусологическом центре «Вектор» Роспотребнадзора, уже широко использовались для скрининга подозрительных на 2019-nCoV больных. На конец января 2020 г. в Российской Федерации выявлено по одному заболевшему в Забайкалье и в Тюменской области. Решением Президента РФ В.В. Путина создан штаб по профилактике завоза 2019-CoV в Россию во главе с вице-премьером Т.А. Голиковой. В него вошли руководитель Роспотребнадзора, главный государственный санитарный врач РФ А.Ю. Попова, министр здравоохранения РФ М.А. Мурашко и др. Утверждены временные методические рекомендации по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции (2019-nCoV). Анализ филогенетических данных позволил отнести новый вирус 2019-nCoV к роду *Betacoronavirus*, подроду *Sarbecovirus* в группу SARS-related human coronavirus, куда входят и многочисленные штаммы, изолированные от летучих мышей (SARS related *Rhinolophus bat coronavirus* RF1 и др.) (см. табл. 1, рис. 2).

Обсуждение

Анализ данных по филогенетике возбудителей ТОРС (SARS), БВРС (MERS) и COVID-19 позволяет расценивать возникшую в декабре 2019 г. в Ухане коронавирусную инфекцию как вариант ТОРС со сравнимыми показателями вирулентности, развития эпидемической ситуации и особенностями клинических проявлений. Генетическая близость вируса COVID-19 с SARS-подобными вирусами летучих мышей (SARS-related human coronavirus и SARS-related *Rhinolophus bat coronavirus* RF1), изолированными от нескольких видов рода *Rhinolophus*, позволяет предположить их основную роль в сохранении вирусных популяций в природных очагах. Другие позвоночные, имеющие непосредственные экологические связи с летучими мышами (циветты, змеи и др., поедающие летучих мышей), служат в качестве промежуточных хозяев. В случае их использования в пищевых целях они могут стать источниками заражения людей.

С представителями отряда рукокрылых (*Chiroptera*; подотряд летучих мышей *Microchiroptera*) тесно связаны коронавирусы рода *Betacoronavirus* (SARS-CoV, COVID-19 из подрода *Sarbecovirus*, MERS-CoV из подрода *Merbecovirus*), а также ряд представителей рода *Alphacoronavirus* (подрода *Colacovirus*, *Dacacovirus*, *Minunacovirus*, *Myotacovirus*, *Nyctacovirus*, *Rhinacovirus*) (см. табл. 1). Наряду с отсутствием острых клинических проявлений инфекции это свидетельствует о древних (возможно, с эпох палеоцена –

эоцена, 60–70 млн лет назад) тесных экологических связях летучих мышей и вирусов подсемейства *Orthocoronavirinae*. Такая связь установлена с нетопырями (*Pipistrellus*) у MERS-related вирусов (*Merbecovirus*), а у SARS-related и COVID-19 – с подковоносами (*Rhinolophidae*, *Rhinolophus*).

Принятые в Российской Федерации меры по профилактике завоза вируса, безусловно, важны. Вместе с тем они не могут полностью предотвратить случаи заноса вируса инфицированными людьми, во время инкубационного периода, или имеющими стёртые и иннапаратные формы заболевания. Задача осложняется и тем, что события разворачиваются на фоне сезонной эпидемии гриппа с одновременной циркуляцией вирусов гриппа А (H1N1)pdm09, H3N2) и В, вызывающих в том числе и тяжёлые формы заболевания с летальным исходом, а также 8 других респираторных вирусов, включая сезонный коронавирус (*Alphacoronavirus*) (см. табл. 2).

В 2002–2019 гг. в мире зарегистрировано по крайней мере 7 эпидемических ситуаций (в основном в КНР), связанных с зоонозными коронавирусами (*Coronaviridae*, *Betacoronavirus*) и вирусами гриппа (*Orthomyxoviridae*, *Influenza A virus*). Число заболевших превысило 100 тыс., летальность варьировала от 2 до 50% (табл. 3), отмечена угроза возникновения пандемий [45]. Очевидно, что подобные ситуации будут возникать и в обозримом будущем [46–49]. Это требует объединения международных действий для комплексной разработки специалистами (эпидемиологами, экологами, вирусологами, клиницистами, организаторами здравоохранения) планов в целях минимизации последствий возникновения новых и вновь возвращающихся (emerging-reemerging) инфекций.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 3-10, 12-24, 27-31, 33-35, 37-45, 48, 49 см. REFERENCES)

- de Groot R.J., Baker S.C., Baric R., Enjuanes L., Gorbalenya A.E., Holmes K.V., et al. Family Coronaviridae. In: King A.M., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier; 2012: 806-28.
- L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu. Coronavirusy (Coronaviridae). In: L'vov D.K., ed. *Virology Guide. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii. Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013: 211-8. (in Russian)
- Perlman S., Gallagher T., Snijder E.J. *Nidoviruses*. Washington: ASM press; 2008.
- Woo P.C., Lau S.K., Huang Y., Yuen K.Y. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. 2009; 234(10): 1117-27. DOI: <http://doi.org/10.3181/0903-MR-94>
- Cowley J.A., Dimmock C.M., Spann K.M., Walker P.J. Gill-associated virus of *Penaeus monodon* prawns: an invertebrate virus with ORF1a and ORF1b genes related to arteri- and coronaviruses. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(Pt. 6): 1473-84. DOI: <http://doi.org/10.1099/0022-1317-81-6-1473>
- Decaro N., Buonavoglia C. An update on canine coronaviruses: viral evolution and pathobiology. *Vet. Microbiol.* 2008; 132(3-4): 221-34. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.06.007>
- Cavanagh D. Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathol.* 2005; 34(6): 439-48. DOI: <http://doi.org/10.1080/03079450500367682>
- Chu D.K., Leung C.Y., Gilbert M., Joyner P.H., Ng E.M., Tse T.M., et al. Avian coronavirus in wild aquatic birds. *J. Virol.* 2011; 85(23): 12815-20. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.05838-11>
- Traavik T., Mehl R., Kjeldsberg E. "Runde" viurs, a coronavirus-like agent associated with seabirds and ticks. *Arch. Virol.* 1977; 55(1-2): 25-38. DOI: <http://doi.org/10.1007/bf01314476>
- Gagneur A., Vallet S., Talbot P.J., Legrand-Quillien M.C., Picard B., Payan C., et al. Outbreaks of human coronavirus in a pediatric and neonatal intensive care unit. *Eur. J. Pediatr.* 2008; 167(12): 1427-34. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00431-008-0687-0>
- Kolobukhina L.V., L'vov D.K. Koronavirusnaya infektsiya, tyazhelyy ostryy respiratornyy sindrom. In: L'vov D.K., ed. *Virology Guide. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii. Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013: 588-92. (in Russian)
- Xu J., Hu J., Wang J., Han Y., Hu Y., Wen J., et al. Genome organization of the SARS-CoV. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2003; 1(3): 226-35. DOI: [http://doi.org/10.1016/s1672-0229\(03\)01028-3](http://doi.org/10.1016/s1672-0229(03)01028-3)
- Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J.H., et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science.* 2005; 310(5748): 676-9. DOI: <http://doi.org/10.1126/science.1118391>
- Woo P.C., Lau S.K., Lam C.S., Lau C.C., Tsang A.K., Lau J.H., et al. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus. *J. Virol.* 2012; 86(7): 3995-4008. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.06540-11>
- Guan Y., Zheng B.J., He Y.Q., Liu X.L., Zhuang Z.X., Cheung C.L., et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science.* 2003; 302(5643): 276-8. DOI: <http://doi.org/10.1126/science.1087139>
- Annan A., Baldwin H.J., Corman V.M., Klose S.M., Owusu M., Nkrumah E.E., et al. Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(3): 456-9. DOI: <http://doi.org/10.3201/eid1903.121503>
- Balboni A., Battilani M., Prosperi S. The SARS-like coronaviruses: the role of bats and evolutionary relationships with SARS coronavirus. *New Microbiol.* 2012; 35(1): 1-16.
- Wang L.F., Shi Z., Zhang S., Field H., Daszak P., Eaton B.T. Review of bats and SARS. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(12): 1834-40. DOI: <http://doi.org/10.3201/eid1212.060401>

19. Dominguez S.R., O'Shea T.J., Oko L.M., Holmes K.V. Detection of group 1 coronaviruses in bats in North America. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(9): 1295-300.
DOI: <http://doi.org/10.3201/eid1309.070491>
20. Gloza-Rausch F., Ipsen A., Seebens A., Gottsche M., Panning M., Drexler J.F., et al. Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(4): 626-31.
DOI: <http://doi.org/10.3201/eid1404.071439>
21. Lau S.K., Woo P.C., Li K.S., Huang Y., Tsoi H.W., Wong B.H., et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005; 102(39): 14040-5.
DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.0506735102>
22. Tong S., Conrardy C., Ruone S., Kuzmin I.V., Guo X., Tao Y., et al. Detection of novel SARS-like and other coronaviruses in bats from Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(3): 482-5.
DOI: <http://doi.org/10.3201/eid1503.081013>
23. Zhou P., Li H., Wang H., Wang L.F., Shi Z. Bat severe acute respiratory syndrome-like coronavirus ORF3b homologues display different interferon antagonist activities. *J. Gen. Virol.* 2012; 93(Pt. 2): 275-81.
DOI: <http://doi.org/10.1099/vir.0.033589-0>
24. Summary table of SARS cases by country, 1 November 2002 – 7 August 2003. Available at: https://www.who.int/csr/sars/country/2003_08_15/en/
25. Pokrovskiy V.I., Maleev V.V., Kisilev O.I. *Coronavirus SARS is the Causative Agent of SARS. Temporary Guidelines [Koronavirus SARS – vozбудitel' atipichnoy pnevmonii. Vremenyie metodicheskie rekomendatsii]*. Moscow; 2003. (in Russian)
26. Chuchalin A.G. Syndrome of acute lung injury. *RMZh.* 2006; 14(22): 1582. (in Russian)
27. Riley S., Fraser C., Donnelly C.A., Ghani A.C., Abu-Raddad L.J., Hedley A.J., et al. Transmission dynamics of the etiological agent of SARS in Hong Kong: impact of public health interventions. *Science.* 2003; 300(5627): 1961-6.
DOI: <http://doi.org/10.1126/science.1086478>
28. Lipsitch M., Cohen T., Cooper B., Robins J.M., Ma S., James L., et al. Transmission dynamics and control of severe acute respiratory syndrome. *Science.* 2003; 300(5627): 1966-70.
DOI: <http://doi.org/10.1126/science.1086616>
29. Wang J.T., Sheng W.H., Fang C.T., Chen Y.C., Wang J.L., Yu C.J., et al. Clinical manifestations, laboratory findings, and treatment outcomes of SARS patients. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10(5): 818-24.
DOI: <http://doi.org/10.3201/eid1005.030640>
30. Drosten C., Gunther S., Preiser W., van der Werf S., Brodt H.R., Becker S., et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348(20): 1967-76.
DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa030747>
31. Tan E.L., Ooi E.E., Lin C.Y., Tan H.C., Ling A.E., Lim B., et al. Inhibition of SARS coronavirus infection in vitro with clinically approved antiviral drugs. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10(4): 581-6.
DOI: <http://doi.org/10.3201/eid1004.030458>
32. Deryabin P.G., Zarubaev V.V. Regarding the Coronavirus infection and prospects for prevention and treatment by recombinant human interferon alpha-2b medications. *Infektsionnye bolezni.* 2014; 12(3): 32-4. (in Russian)
33. de Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S., Brown C.S., Drosten C., Enjuanes L., et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J. Virol.* 2013; 87(14): 7790-2.
DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01244-13>
34. Reusken C.B., Haagmans B.L., Muller M.A., Gutierrez C., Godeke G.J., Meyer B., et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study. *Lancet Infect. Dis.* 2013; 13(10): 859-66.
DOI: [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70164-6](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70164-6)
35. Perera R.A., Wang P., Gomaa M.R., El-Shesheny R., Kandeil A., Bagato O., et al. Seroepidemiology for MERS coronavirus using microneutralisation and pseudoparticle virus neutralisation assays reveal a high prevalence of antibody in dromedary camels in Egypt, June 2013. *Euro Surveill.* 2013; 18(36): pii20574.
DOI: <http://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.36.20574>
36. Strelkov P.P. Otryad Chiroptera, Blumenbach, 1779 – Rukokrylye. In: Gromov I.M., Baranova G.I., eds. *Catalog of Mammals of the USSR. Pliocene – the Present.* Leningrad: Nauka; 1981: 31-53. (in Russian)
37. Surveillance case definitions for human infection with novel coronavirus (nCoV). Available at: [https://www.who.int/internal-publications-detail/surveillance-case-definitions-for-human-infection-with-novel-coronavirus-\(ncov\)](https://www.who.int/internal-publications-detail/surveillance-case-definitions-for-human-infection-with-novel-coronavirus-(ncov))
38. Disease commodity package – Novel Coronavirus (nCoV). Available at: [https://www.who.int/publications-detail/disease-commodity-package--novel-coronavirus-\(ncov\)](https://www.who.int/publications-detail/disease-commodity-package--novel-coronavirus-(ncov))
39. WHO recommendations to reduce risk of transmission of emerging pathogens from animals to humans in live animal markets. Available at: <https://www.who.int/health-topics/coronavirus/who-recommendations-to-reduce-risk-of-transmission-of-emerging-pathogens-from-animals-to-humans-in-live-animal-markets>
40. Laboratory testing for 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases. Available at: <https://www.who.int/publications-detail/laboratory-testing-for-2019-novel-coronavirus-in-suspected-human-cases-20200117>
41. European surveillance for human infection with novel coronavirus (2019-nCoV). Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/european-surveillance-human-infection-novel-coronavirus-2019-ncov>
42. European Virus Archive – GLOBAL. Available at: <https://www.european-virus-archive.com/>
43. Diagnostic detection of Wuhan coronavirus 2019 by real-time RTPCR. Available at: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d-99287a1b17c111902.pdf?sfvrsn=d381fc88_2
44. Novel Coronavirus (2019-nCoV) situation reports (WHO). Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>
45. WHO, Western Pacific Region. Avian Influenza Weekly Update 2019. Available at: <https://iris.wpro.who.int/handle/10665.1/14328>
46. L'vov D.K. Influenza and other new and recurring infections of Northern Eurasia: global implications. In: *Federal Health Directory of Russia. Volume 11 [Federal'nyy spravochnik zdravoohraneniya Rossii. Tom 11]*. Moscow; 2010: 209-19. (in Russian)
47. L'vov D.K., Borisevich S.V., Al'khovskiy S.V., Burtseva E.I. Actual approaches to the analysis of viral genomes for biosafety. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie.* 2019; 8(2): 96-101.
DOI: <http://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-12012> (in Russian)
48. L'vov D.K., Shchelkanov M.Y., Alkhovskiy S.V., Deryabin P.G. *Zoonotic Viruses of Northern Eurasia. Taxonomy and Ecology.* London: Academic Press, Elsevier; 2015.
49. WHO. Coronavirus disease 2019 (COVID-19). Situation report - 40 (29 February 2020).

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020



Производные адамантана, способные ингибировать репродукцию резистентного к римантадину штамма вируса гриппа A(H1N1)pdm09 (*Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae*)

Гараев Т.М.¹, Одноров А.И.², Кириллова Е.С.¹, Бурцева Е.И.¹, Финогенова М.П.¹, Мукашева Е.А.¹, Гребенникова Т.В.¹

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

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

Введение. Соединения адамантанового ряда, такие как римантадин и амантадин, долгое время применяли для лечения заболеваний, вызванных вирусом гриппа А. Однако в результате возникших мутаций вирусы гриппа приобрели резистентность к аминокислотам адамантанов. Мишенью для этих препаратов служил белковый канал М2. Виропорин М2 в белковой оболочке вируса гриппа А образует достаточно специфичные ионные каналы диаметром около 11 Å, специализирующиеся на транспорте ионов водорода внутрь вирусной частицы (вириона). Восстановление противовирусных свойств препаратов адамантанового ряда заключается в подборе дополнительных функциональных групп, связанных карбоциклом, для поиска новых сайтов связывания с белком мишенью М2.

Цель исследования – выявление противовирусных свойств адамантановых производных в отношении пандемического штамма вируса гриппа А *in vitro*.

Материал и методы. Соединения аминокислот адамантанов с аминокислотами и другими органическими молекулами были получены методами классического пептидного синтеза. Структура соединения подтверждена современными физико-химическими методами. Противовирусные свойства синтетических соединений были изучены *in vitro* на монослое клеток МДСК, инфицированных пандемическим штаммом вируса гриппа A/California/07/2009 в двух схемах введения исследуемых соединений и вируса.

Результаты. Эталонный штамм вируса гриппа A/California/07/2009(H1N1) был в разной мере чувствителен к тестируемым соединениям. Противовирусную активность соединений выражали в виде 50% ингибирующей дозы (ID_{50}), которая составила от 0,5 до 2,5 мкМ, что в целом неплохой показатель в отношении штамма, резистентного к римантадину/амантадину.

Обсуждение. ID_{50} для соединений, вносимых за 2 ч до контакта с вирусом, была несколько выше, чем при одномоментном внесении вещества и вируса. Эффект увеличения ингибирующей концентрации в профилактической схеме внесения соединений был справедлив для всех соединений эксперимента.

Заключение. Представленные синтетические соединения активны в отношении варианта вируса гриппа А, резистентного к римантадину и амантадину. Полученные соединения могут быть использованы в качестве модельных структур для создания нового препарата прямого действия против современных штаммов вируса гриппа А.

Ключевые слова: вирус гриппа А; лекарственная устойчивость; противовирусная активность; аминокислоты; адамантан.

Для цитирования: Гараев Т.М., Одноров А.И., Кириллова Е.С., Бурцева Е.И., Финогенова М.П., Мукашева Е.А., Гребенникова Т.В. Производные адамантана, способные ингибировать репродукцию резистентного к римантадину штамма вируса гриппа A(H1N1)pdm09 (*Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae*). *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(1): 16-20.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-16-20>

Для корреспонденции: Гараев Тимур Мансурович, канд. биол. наук, ведущий 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: tmgaraev@gmail.com

Финансирование. Исследование подготовлено при поддержке программы «Университет РУДН 5-100».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: химический синтез соединений – Гараев Т.М., Финогенова М.П.; проведение биологических испытаний *in vitro* – Кириллова Е.С., Бурцева Е.И., Мукашева Е.А.; концепция и дизайн исследования – Гараев Т.М., Кириллова Е.С., Бурцева Е.И.; сбор и обработка материала – Одноров А.И.; статистическая обработка данных – Гараев Т.М., Кириллова Е.С.; написание текста – Гараев Т.М., Кириллова Е.С.; редактирование – Финогенова М.П., Кириллова Е.С., Бурцева Е.И.; утверждение окончательного варианта статьи – Бурцева Е.И., Гребенникова Т.В.; ответственность за целостность всех частей статьи – Гребенникова Т.В., Бурцева Е.И.

Поступила 21.01.20

Принята в печать 29.01.20

Adamantan derivatives capable of inhibiting the reproduction of a Rimantadine resistant strain of influenza A(H1N1)pdm09 virus (*Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae*)

Garaev T.M.¹, Odnovorov A.I.², Kirillova E.S.¹, Burtseva E.I.¹, Finogenova M.P.¹, Mukasheva E.A.¹, Grebennikova T.V.¹

¹National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia;

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

Introduction. Adamantanthane-type drugs such as rimantadine and amantadine have long been used to treat diseases caused by influenza A virus. However, as a result of the mutations, influenza viruses have become resistant to aminoadamantans. The target for these drugs was the protein channel M2. Influenza A virus M2 viroporin in the protein shell forms fairly specific ion channels with a diameter of about 11 Å, specializing in transporting protons inside the viral particle (virion). Restoration of the antiviral properties of adamantanthane-type drugs consists in the selection of advanced functional groups bound by the carbocycle to find new sites of binding to the protein target M2.

The purpose of the study is to identify the antiviral properties of new adamantanum derivatives to the pandemic strain of influenza A virus *in vitro*.

Material and methods. Compounds of aminoadamantans with amino acids and other organic molecules were obtained by classical peptide synthesis methods. The structure of the compound was tested by means of physical and chemical methods. Antiviral properties of synthetic compounds were studied *in vitro* on monolayer MDCK cells infected with pandemic strain of influenza A/California/07/2009 virus in two schemes of administration of investigated compounds and virus.

Results. The reference strain of the influenza virus A/California/07/2009(H1N1) was sensitive to the compounds under test in varying degrees. The antiviral activity of the compounds was expressed in a 50% inhibitory concentration (IC₅₀) ranging from 0.5 to 2.5 μM, which is generally a good indicator for the Rimantadine/Amantadine resistant strain.

Discussion. The values of the IC₅₀ for compounds introduced two hours before contact with the virus were slightly higher than those for single-moment introduction of the substance and virus. The effect of increasing the inhibitory concentration in the prophylactic scheme of compounds was valid for all compounds of the experiment.

Conclusion. The presented synthetic compounds are active against the variant of influenza A virus resistant to Rimantadine and Amantadine preparations. The obtained compounds can be used as model structures for creation of a new drug of direct action against advanced strains of influenza A virus.

Keywords: antiviral activity; influenza A virus; drug resistance; amino acids; adamantane; thienylcarboxylic acid.

For citation: Garaev T.M., Odnovorov A.I., Kirillova E.S., Burtseva E.I., Finogenova M.P., Mukasheva E.A., Grebennikova T.V. Adamantan derivatives capable of inhibiting the reproduction of a Rimantadine resistant strain of influenza A(H1N1)pdm09 virus (*Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae*). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2020; 65(1): 16-20. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-16-20>

For correspondence: Timur M. Garaev, PhD, Lead Researcher of the laboratory of molecular diagnostics «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russia. E-mail: tmgaraev@gmail.com

Information about authors:

Garaev T.M., <https://orcid.org/0000-0002-3651-5730>

Odnovorov A.I., <https://orcid.org/0000-0001-9355-2522>

Kirillova E.S., <https://orcid.org/0000-0001-7977-7530>

Burtseva E.I., <https://orcid.org/0000-0003-2518-6801>

Finogenova M.P., <https://orcid.org/0000-0002-3611-3897>

Mukasheva E.A., <https://orcid.org/0000-0002-5688-5309>

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

Acknowledgments. The publication has been prepared with the support of the «RUDN university program 5-100».

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

Contribution: chemical synthesis of the compounds – Garaev T.M., Finogenova M.P.;

in vitro biological testing - Kirillova E.S., Burtseva E.I., Mukasheva E.A.;

material collection and processing – Odnovorov A.I.; statistical data processing – Garaev T.M., Kirillova E.S.;

text writing - Garaev T.M., Kirillova E.S.; editing – Finogenova M.P., Kirillova E.S., Burtseva E.I.;

approval of the final version of the article – Burtseva E.I., Grebennikova T.V.;

responsibility for integrity of all parts of article – Grebennikova T.V., Burtseva E.I.

Received 21 January 2020

Accepted 29 January 2020

Введение

Виропорины – это небольшие пороформирующие вирусные белки, состоящие из 50–120 аминокислотных остатков преимущественно алифатического характера, способные к образованию белковых агрегатов из нескольких (обычно от 4 до 6) полипептидных цепей [1]. Трансмембранный (ТМ) домен виропоринов взаимодействует с липидным матри-

сом мембраны, олигомеризуется и образует гидрофильные поры. Олигомерные поры виропоринов способны к направленному и селективному ионному транспорту через вирусные и клеточные мембраны. В настоящее время наиболее изучены виропорины РНК-содержащих вирусов: вируса иммунодефицита человека 1-го типа – ври, вируса гепатита С – р7, вируса гриппа А – М2 [2].

Виропорин M2 в белковой оболочке вируса гриппа А образует достаточно специфичные ионные каналы диаметром около 11 Å, специализирующиеся на транспорте протонов внутрь вирусной частицы (вириона). Протоны, попавшие внутрь вириона, понижают pH внутренней среды, что приводит к диссоциации комплекса матриксного белка M1 с рибонуклеопротеином и, как следствие, к высвобождению вирусной РНК в цитоплазму клетки хозяина. Наиболее важную роль в транспорте протонов через канал M2 играют аминокислотные остатки гистидина (His37) и триптофана (Trp41) в TM-домене [3, 4].

Оболочечный протеин M2 вируса гриппа А является мишенью для противовирусных коммерческих препаратов, таких как «Амантадин» (1-аминоадамantan гидрохлорид) и «Римантадин» (1-(1-адамантил)-этиламин гидрохлорид) [5].

Как утверждают некоторые источники, ингибирующее действие молекул римантадина и амантадина тесно связано с необходимостью образования водородной связи между аминоадамантаном и гидроксильной группой остатка серина в 31-м положении на внутренней поверхности канала M2 [3]. Однако ряд исследований показывает, что данное взаимодействие необязательно для закрепления ингибитора в поре канала [6]. Можно предположить, что введение в молекулу дополнительных функционально активных групп поможет расширить противовирусные свойства препаратов адамантинового ряда. Новые соединения в процессе взаимодействия с TM-доменом могли нарушать процесс транспорта ионов водорода через мембрану вируса. Аминокислоты обладают достаточно широким спектром боковых групп, которые могут привести необходимые свойства будущей молекуле ингибитора. Более того, использование пептидов и некоторых других биологических молекул, введенных в адамантиновый карбоцикл методами пептидного синтеза, может в значительной мере расширить поиск наиболее подходящего блокатора канала M2 вируса гриппа [7].

Ингибиторы M2 можно разделить на две группы. Первая включает соединения, содержащие карбоцикл адамантиана, – амантадин, римантадин и их гидроксильные производные. Вторая группа включает производные, содержащие вместо адамантиана гетероциклические алканы, спиросопряженные мультициклические алканы и силаны [8, 9]. Эти соединения специально разработаны для преодоления некоторых важных мутаций в ионном канале M2 вируса гриппа А, таких как V27A и L26F [9, 10].

На данный момент нельзя предсказать, в каких рамках могут происходить мутации аминокислотной последовательности полипептида M2, не нарушающие его транспортной функции, но стоит отметить, что они не безграничны. Предложенная стратегия восстановления противовирусных свойств может в значительной мере перекрыть спектр этих мутаций, исключая возникновение резистентных штаммов в ближайшее время.

Материал и методы

Рассматриваемые соединения были получены по методикам, описанным нами ранее [11, 12]. Синтезированы семь модельных производных аминоадамантиана с аминокислотами и некоторыми другими биологически активными заместителями: N-(1-адамантилэтил)-3-(тиофен-2-ил)-проп-2-енамид (I); N-(1-адамантил)-3-(тиофен-2-ил)-проп-2-енамид (II); N-(1-адамантил)-4-(тиофен-2-ил)-бутанамид (III); гидрохлорид метионил(диоксид)-(1-адамантилэтил)амид (IV); трет-бутилоксикарбонил метионил(диоксид)-(1-адамантилэтил)амид (V); бензилоксикарбонил-L-триптофанил-1-адамантил-этиламин (VI); хинальдин-2-оил-1-аланил-1-пролил-(1-адамантилэтил)амид (VII).

Структурные формулы тестируемых соединений представлены на рисунке.

Вирус. В работе использовали пандемический штамм вируса гриппа A(H1N1)pdm09: эталонный A/California/07/2009, полученный из Центров по контролю и профилактике заболеваний (Атланта, США), резистентный к действию римантадина и амантадина.

Противовирусную активность синтезированных соединений изучали по снижению репродукции вируса в культуре клеток MDCK с детекцией результатов методом иммуноферментного анализа, как это было описано ранее [13, 14]. В двух схемах введения: за 2 ч до внесения вируса (профилактическая схема) и одномоментно с вирусом.

Результаты

В таблице представлены 50% ингибирующие дозы (ID_{50}) синтезированных соединений в микромолярной (мкМ) концентрации, при которых погибает 50% клеток монослоя, а также 50% цитотоксические дозы (CD_{50}), т. е. концентрации соединения, при которых погибает 50% клеток монослоя от действия соединений без вируса. Результаты, показанные в этих опытах, соответствовали нормальному распределению.

Из данных таблицы видно, что эталонный штамм вируса гриппа A/California/07/2009(H1N1) был в разной мере чувствителен к тестируемым соединениям. При использовании соединений I, II и III, содержащих остатки тиенилкарбоновых кислот, отмечен выраженный эффект ингибирования репродукции вируса гриппа A/California/07/2009, устойчивого к действию римантадина. При одномоментном внесении на монослой клеток MDCK веществ и вируса ID_{50} для соединения I составила 2,38 мкМ, а для III ID_{50} – 2,26 мкМ. Среди адамантиновых производных тиенилкарбоновых кислот наиболее активным было соединение II, ID_{50} которого составила 0,9 мкМ. Интересен тот факт, что в отличие от соединения I, в котором в качестве гидрофобного компонента выступает 1-(1-адамантил)этиламин, в соединении II был использован его более простой гомолог 1-адамантиламин (см. рисунок). В профилактической схеме введения соединений I, II и III за 2 ч до заражения монослоя клеток ингибирующая активность превысила 2,0 мкМ. Эффект увеличения ингибирующей концентрации

в профилактической схеме был справедлив для всех остальных соединений эксперимента.

Среди соединений 1-(1-адамантил)этиламина с остатком метионинсульфона (IV и V) при одномоментном внесении соединений и вируса на монослой клеток наибольший противовирусный эффект оказывало соединение V с Вос-блокированной аминогруппой (ИД₅₀ составила 0,56 мкМ). При деблокировании аминогруппы соединения V было получено соединение IV со свободной аминогруппой метионинсульфона в виде гидрохлорида. ИД₅₀ полученного соединения составила 1,89 мкМ. В профилактической схеме ИД₅₀ для соединения V составила 1,69 мкМ, а для IV – 3,50 мкМ.

Для триптофансодержащего соединения VI ИД₅₀ в одномоментной схеме внесения составила 1,02 мкМ, а для профилактической схемы – менее 1,40 мкМ.

Производное VII было эффективно в одномоментной схеме внесения (ИД₅₀ составила 0,74 мкМ). В профилактической схеме ингибирующая концентрация была достигнута при 2,78 мкМ.

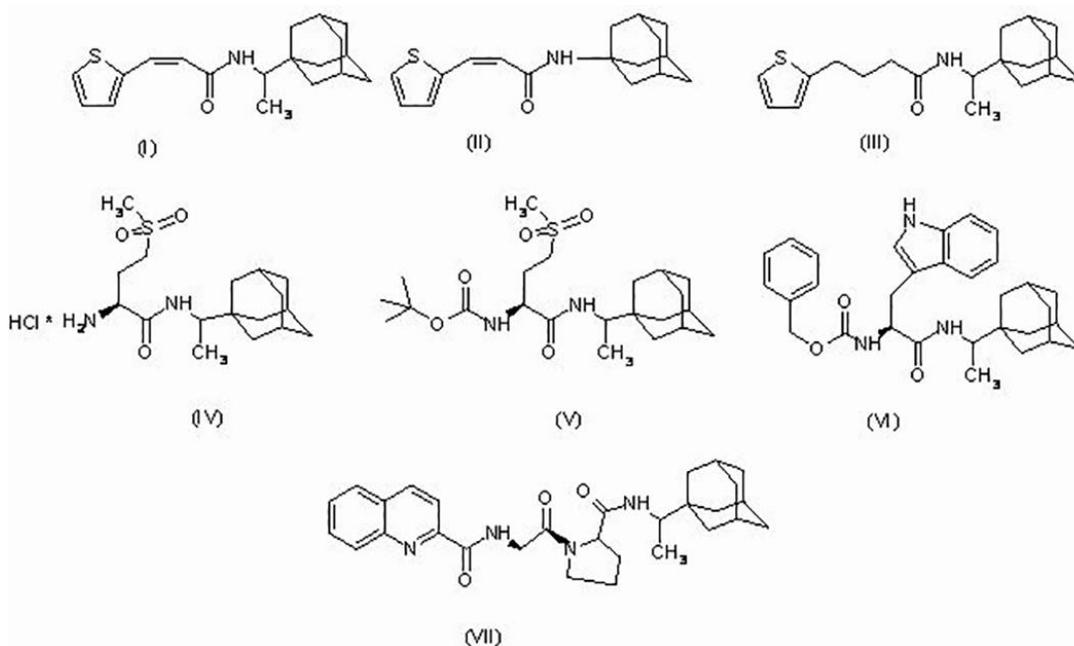
Обсуждение

Эффект увеличения значения ингибирующей концентрации в профилактической схеме внесения соединений был справедлив почти для всех предложенных соединений. Это связано с предполагаемым механизмом их действия, который подразумевает блокировку функции канала M2 вируса гриппа А. В качестве функциональных групп были выбраны не только аминокислоты и пептиды, но и тиенилкарбоновые кислоты и 2-хинальдинкарбоновая кислота, которые были использованы в качестве источника функциональной гетероароматической группы. Мно-

Активность синтетических соединений в отношении штаммов вируса гриппа A/California/07/2009

Activity of synthetic compounds with respect to influenza virus strains A/California/07/2009

Схема введения соединений Scheme of administration of compounds	Соединение Compound	ИД ₅₀ , мкМ IC ₅₀	
Одномоментно с вирусом Along with the virus	I	2,38 ± 0,35	
	II	0,90 ± 0,1	
	III	2,26 ± 0,21	
	IV	1,89 ± 0,13	
	V	0,56 ± 0,23	
	VI	1,02 ± 0,20	
	VII	0,74 ± 0,09	
За 2 ч до заражения 2 hours before infection.	Римантадин Rimantadine	> 5	
	I	2,21 ± 0,21	
	II	2,26 ± 0,26	
	III	2,62 ± 0,29	
	IV	3,50 ± 0,36	
	V	1,69 ± 0,07	
	VI	1,40 ± 0,11	
	VII	2,78 ± 0,23	
	Римантадин Rimantadine	> 5	
	ИД ₅₀ , мкМ IC ₅₀	I	95,2
	II	174,2	
	III	120,6	
	IV	66,13	
	V	226,2	
VI	200,4		
VII	49,2		
Римантадин Rimantadine	186,1		



Структуры соединений адамантана с аминокислотами и другими заместителями.
Structures of adamantanine compounds with amino acids and other derivatives.

гие исследователи полагают, что протонный канал можно рассматривать как ахиллесову пяту вируса гриппа [15]. Предложенный нами способ модернизации молекул аминокислотного ряда позволил преодолеть резистентность штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm09, которые с момента их циркуляции среди людей несли специфическую замену в белке M2, ответственную за низкую противовирусную активность римантадина и амантадина.

Заключение

Полученные соединения могут быть использованы в качестве модельных структур для создания нового препарата прямого действия против современных штаммов вируса гриппа А. На сегодняшний день это имеет большое практическое значение, учитывая очень ограниченный спектр противовирусных препаратов с прямым действием на вирус гриппа, а также возможность его производства в Российской Федерации.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2-10, 15 см. REFERENCES)

1. Андреева-Ковалевская Ж.И., Солонин А.С., Синева Е.В., Терновский В.И. Пороформирующие белки и адаптация организмов к условиям окружающей среды. *Успехи биологической химии*. 2008; 48: 267-318.
11. Шибнев В.А., Дерябин П.Г., Гараев Т.М., Финогенова М.П., Ботиков А.Г., Мишин Д.В. Пептидные производные карбоциклов как ингибиторы функции виropоринов РНК-содержащих вирусов. *Биоорганическая химия*. 2017; 43(5): 491-500. DOI: <http://doi.org/10.7868/S0132342317050153>
12. Шибнев В.А., Дерябин П.Г., Бурцева Е.И., Гараев Т.М., Финогенова М.П., Кириллова Е.С. и др. Адамантиламиды серосодержащих кислот и их противогриппозная активность. Патент RF №2617850; 2015.
13. Бурцева Е.И., Шевченко Е.С., Ленева И.А., Меркулова Л.Н., Оскерко Т.А., Шляпникова О.В. и др. Чувствительность к римантадину и арбидолу вирусов гриппа, вызвавших эпидемические подъемы заболеваемости в России в сезоне 2004-2005 гг. *Вопросы вирусологии*. 2007; 52(2): 24-9.
14. Ленева И.А., Фадеева Н.И., Федякина И.Т., Гуськова Т.А., Христова М.Л., Соколова М.В. Применение иммуноферментной индикации вирусспецифических антигенов в изучении нового противовирусного препарата. *Химико-фармацевтический журнал*. 1994; 28(9): 4-15.

REFERENCES

1. Andreeva-Kovalevskaya Zh.I., Solonin A.S., Sineva E.V., Ternovskiy V.I. Pore-forming proteins and the adaptation of organisms to environmental conditions. *Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2008; 48: 267-318. (in Russian)
2. Palese P., Shaw M.L. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology. Volume 2*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 1647-89.

3. Cheng J., Zhu W., Wang Y., Yan X., Li Z., Tang Y., et al. The open-close mechanism of M2 channel protein in influenza A virus: A computational study on the hydrogen bonds and cation- π interactions among His37 and Trp41. *Sci. China Ser. B-Chem*. 2008; 51: 755-68. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11426-008-0087-3>
4. Tang Y., Zaitseva F., Lamb R.A., Pinto L.H. The gate of the influenza virus M2 proton channel is formed by a single tryptophan residue. *J. Biol. Chem*. 2002; 277(42): 39880-6. DOI: <http://doi.org/10.1074/jbc.M206582200>
5. Deyde V.M., Xu X., Bright R.A., Shaw M., Smith C.B., Zhang Y., et al. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *J. Infect. Dis*. 2007; 196(2): 249-57. DOI: <http://doi.org/10.1086/518936>
6. Pielak R.M., Schnell J.R., Chou J.J. Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009; 106(18): 7379-84. DOI: <http://doi.org/10.1073/pnas.0902548106>
7. Shibnev V.A., Garaev T.M., Finogenova M.P., Shevchenko E.S., Burtseva E.I. New adamantane derivatives can overcome resistance of influenza A(H1N1)pdm2009 and A(H3N2) viruses to remantadine. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2012; 153(2): 233-5. DOI: <http://doi.org/10.1007/s10517-012-1684-x>
8. Hu W., Zeng S., Li C., Jie Y., Li Z., Chen L. Identification of hits as matrix-2 protein inhibitors through the focused screening of a small primary amine library. *J. Med. Chem*. 2010; 53(9): 3831-4. DOI: <http://doi.org/10.1021/jm901664a>
9. Wang J., Ma C., Balannik V., Pinto L.H., Lamb R.A., Degradó W.F. Exploring the Requirements for the Hydrophobic Scaffold and Polar Amine in inhibitors of M2 from Influenza A Virus. *ACS Med. Chem. Lett*. 2011; 2(4): 307-12. DOI: <http://doi.org/10.1021/ml100297w>
10. Wang J., Ma C., Fiorin G., Carnevale V., Wang T., Hu F., et al. Molecular dynamics simulation directed rational design of inhibitors targeting drug-resistant mutants of influenza A virus M2. *J. Am. Chem. Soc*. 2011; 133(32): 12834-41. DOI: <http://doi.org/10.1021/ja204969m>
11. Shibnev V.A., Deryabin P.G., Garaev T.M., Finogenova M.P., Botikov A.G., Mishin D.V. Peptide carbocyclic derivatives as inhibitors of the viroporin function of RNA-containing viruses. *Biorganicheskaya khimiya*. 2017; 43(5): 491-500. DOI: <http://doi.org/10.7868/S0132342317050153> (in Russian)
12. Shibnev V.A., Deryabin P.G., Burtseva E.I., Garaev T.M., Finogenova M.P., Kirillova E.S., et al. Adamantylamides of sulphur-containing acids and their antifluid activity. Патент RF 2617850; 2017. (in Russian)
13. Burtseva E.I., Shevchenko E.S., Leneva I.A., Merkulova L.N., Oskerko T.A., Shlyapnikova O.V., et al. Rimantadine and arbidol sensitivity of influenza viruses that caused epidemic morbidity rise in Russia in the 2004-2005 season. *Voprosy virusologii*. 2007; 52(2): 24-9. (in Russian)
14. Leneva I.A., Fadeeva N.I., Fedyakina I.T., Gus'kova T.A., Khristova M.L., Sokolova M.V. Application of immuno-enzymatic indication of virus specific antigens in the study of a new antiviral drug. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*. 1994; 28(9): 4-15. (in Russian)
15. Cady S.D., Wang T., Hong M. Membrane-dependent effects of a cytoplasmic helix on the structure and drug binding of the influenza virus M2 protein. *J. Am. Chem. Soc*. 2011; 133(30): 11572-9. DOI: <http://doi.org/10.1021/ja202051n>



Опыт применения IgY-технологии для лабораторной диагностики вирусных инфекций

Иванов А.П.¹, Клеблеева Т.Д.¹, Иванова О.Е.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», 108819, г. Москва, Россия;

² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Россия

Введение. Известные преимущества антител класса Y (IgY) из яичных желтков иммунизированных кур в сравнении с антителами класса G (IgG) лабораторных животных, традиционно используемых в лабораторной диагностике инфекционных заболеваний, определяют стабильный интерес исследователей к использованию для этих целей IgY (IgY-технологии). За последние 20 лет очевидные преимущества IgY-технологии были продемонстрированы для целого ряда вирусных и бактериальных инфекций.

Цели и задачи. Конструирование систем иммуноферментного анализа (ИФА) на основе специфических IgY для лабораторной диагностики инфекций, вызываемых вирусами клещевого энцефалита, жёлтой лихорадки и полиовирусом.

Материал и методы. Получение препаратов желтков иммунизированных кур, приготовление высокоочищенных препаратов IgY (высаливание, аффинная хроматография), конструирование систем ИФА для определения вирусспецифических антигенов, отработка параметров систем ИФА.

Результаты и обсуждение. Впервые в лабораторной практике были сконструированы системы ИФА, основанные на использовании поликлональных специфических IgY, для лабораторной диагностики актуальных вирусных инфекций человека, вызываемых флавивирусами и энтеровирусами: определены антигены вирусов клещевого энцефалита, жёлтой лихорадки, трёх типов полиовируса. Экспериментально показано, что данные системы ИФА обладают высокой чувствительностью и специфичностью, что позволяет использовать их для полуквантитативного и количественного определения антигенов указанных вирусов в различных материалах (инфицированных клеточных культурах, вакцинных препаратах и т.д.).

Заключение. Разработанные на основе специфических IgY системы ИФА для определения вирусных антигенов могут эффективно использоваться для лабораторной диагностики ряда вирусных инфекций, для валидации и контроля вакцинных препаратов.

Ключевые слова: IgY-технология; иммуноферментный анализ; антигены; вирус клещевого энцефалита; вирус жёлтой лихорадки; полиовирусы; вакцины.

Для цитирования: Иванов А.П., Клеблеева Т.Д., Иванова О.Е. Опыт применения IgY-технологии для лабораторной диагностики вирусных инфекций. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(1): 21-26.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-21-26>

Для корреспонденции: Иванов Александр Петрович, д-р мед. наук, технолог 1 категории, отдел разработки и внедрения инновационных технологий ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», 108819, г. Москва. E-mail: ivanovalexander1@gmail.com

Финансирование. Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция, эксперименты, анализ данных, написание статьи – Иванов А.П.; экспериментальная часть – Клеблеева Т.Д.; анализ данных, написание и редактирование текста – Иванова О.Е.

Поступила 22.01.20

Принята в печать 29.01.20

Experience of application of IgY-technology for laboratory diagnostics of viral infections

Ivanov A.P.¹, Klebleeva T.D.¹, Ivanova O.E.^{1,2}

¹ Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, 108819, Russia;

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991, Russia

Introduction. The well-known advantages of class Y antibodies (IgY) from egg yolks of immunized hens in comparison with class G antibodies (IgG) of laboratory animals traditionally used in laboratory diagnosis of infectious diseases determine the stable interest of researchers in using IgY for these purposes (IgY technology). Over the past 20 years, the obvious benefits of IgY technology have been demonstrated for a number of viral and bacterial infections.

Goals and objectives. Construction of ELISA systems based on specific IgY for laboratory diagnosis of infections caused by tick-borne encephalitis virus, yellow fever virus, poliovirus.

Material and methods. Obtaining yolk preparations of immunized chickens, obtaining highly purified IgY preparations (salting out, affinity chromatography), constructing ELISA systems for determining virus-specific antigens, testing the parameters of ELISA systems.

Results and discussion. For the first time in laboratory practice, ELISA systems based on the use of specific polyclonal IgY were designed for laboratory diagnosis of topical human viral infections caused by flaviviruses and enteroviruses: determination of antigens of tick-borne encephalitis virus, yellow fever virus, 3 types of poliovirus.

It was experimentally shown that these ELISA systems have high sensitivity and specificity, which allows them to be used for the semiquantitative and quantitative determination of antigens of these viruses in various materials (infected cell cultures, vaccines, etc.).

Conclusion. The ELISA systems developed on the basis of specific IgY for determination of viral antigens can be effectively used for laboratory diagnosis of a number of viral infections, for the validation and control of vaccine preparations.

Keywords: *IgY-technology; ELISA; antigens, tick-borne encephalitis virus, yellow fever virus, polioviruses, vaccines.*

For citation: Ivanov A.P., Klebleeva T.D., Ivanova O.E. Experience of application of IgY-technology for laboratory diagnostics of viral infections. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2020; 65(1): 21-26. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-21-26>

For correspondence: Alexander P. Ivanov, Dr. Sci. Med., 1st category technologist, Department for the development and implementation of innovative technologies, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences. Moscow, 108819, Russia.
E-mail: ivanovalexander1@gmail.com

Information about authors:

Ivanov A.P., <http://orcid.org/0000-0003-4576-7136>

Klebleeva T.D., <http://orcid.org/0000-0003-4288-6818>

Ivanova O.E., <http://orcid.org/0000-0003-1784-4827>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Contribution: concept, experiments, data analysis, writing - Ivanov A.P.; experimental part - Klebleeva T.D.; data analysis, writing, editing - Ivanova O.E.

Received 22 January 2020

Accepted 29 January 2020

Введение

В 1893 г. F. Klemperer впервые экспериментально доказал, что иммунизация кур определённым антигеном (в данном случае – столбнячным токсином) приводит к переносу специфических антител в яичный желток [1]. В течение длительного времени это открытие не находило применения в биомедицинских исследованиях, однако этические проблемы экспериментов с лабораторными животными требовали поисков более гуманных подходов. В 1959 г. W. Russell и R. Burch опубликовали принципы гуманной экспериментальной техники [1], и в течение последующих лет многие исследователи пришли к пониманию важности открытия F. Klemperer. В 1996 г. Европейский центр по оценке альтернативных методов (ECVAM) рекомендовал использование антител класса Y (IgY) вместо антител класса G (IgG) млекопитающих как альтернативный подход к исследовательской практике [2], а в 1999 г. IgY-технология была одобрена, например, министерством ветеринарии правительства Швейцарии [1].

Молекулярная структура IgY птиц хорошо изучена и в целом аналогична структуре IgG млекопитающих (IgY птиц – филогенетический предшественник IgG млекопитающих): как и IgG, IgY состоит из двух лёгких и двух тяжёлых цепей. Тяжёлая цепь IgY представлена одним варибельным и четырьмя константными доменами, в отличие от IgG, имеющего три константных домена. Молекулярная масса IgY определена в 167 200 Да (IgG – 160 000 Да) [1]. Несмотря на принципиальное сходство двух аналогов (IgG млекопитающих и IgY), IgY обладает рядом преимуществ, особенно ценных для его использования в диагностических целях (в качестве иммунного реагента): 1) высокая иммунореактивность птиц по отношению к чужеродным белкам инфекционного происхождения (вирусным, бактериальным, паразитарным), а также к белкам токсинов и ядов; 2) низкая

перекрёстная реактивность с белками млекопитающих за счёт большой филогенетической дистанции между птицами и млекопитающими: неспособность IgY активировать систему комплемента млекопитающих и связываться с ревматоидным фактором, Fc-рецепторами обеспечивает низкий уровень неспецифических реакций; 3) феноменально высокое содержание IgY в желтке, т. е. возможность получения IgY в препаративных количествах – из одного яйца можно получить 50–100 мг тотального IgY и до 10% от этой суммы – специфического IgY, что соответствует величине IgG, полученного из сыворотки 50–100 мышей (учитывая тот факт, что курица кладёт одно яйцо в 1–2 дня, общее количество IgY за полный цикл иммунизации может достигать десятков граммов); 4) дешевизна и лёгкость процедуры иммунизации кур, а также принципиальная простота получения препаратов IgY из желтка [1–3].

Целью данного исследования было экспериментальное доказательство эффективности использования IgY-технологии при разработке систем иммуноферментного анализа (ИФА) для лабораторной диагностики актуальных вирусных инфекций человека, вызываемых флавивирусами и энтеровирусами: определение антигенов вирусов клещевого энцефалита (ВКЭ), жёлтой лихорадки (ВЖЛ), трёх типов полиовируса. Такого рода исследования ранее не проводили [1].

Материал и методы

Получение препаратов IgY. Несущихся кур породы Леггорн (4–6-месячного возраста) иммунизировали 3 раза с интервалом в 2 нед, вводя по 1 мл соответствующего антигена в 4 точки пекторальных мышц без адьюванта [4].

Антигены. Антиген ВКЭ, штамм Софьин, депозит № 116, представлял собой инактивированный формалином концентрат вирусосодержащей культуральной

жидкости инфицированных куриных фибробластов с исходным титром вируса 8 Ig БОЕ/мл; антиген ВЖЛ – инактивированный β -пропиолактоном концентрат культуральной жидкости клеток *Vero*, инфицированных ВЖЛ, штамм 17 D, с исходным титром 6,5 Ig БОЕ/мл; антигены полиовируса: вирусосодержащие осветлённые культуральные жидкости клеток RD, инфицированные «дикими» полиовирусами типа 1 (Mahoney), либо типа 2 (MEF-1), либо типа 3 (Saukett) с титром 8,0 Ig ТЦД/1 мл. Отложенные яйца маркировали и хранили при температуре +4 °С, либо выделяли желтки и хранили при -20 °С. Препараты IgY (из желтков, выделенных через 2 нед после 3-й иммунизации) получали высаливанием сульфатом натрия (Na_2SO_4) по методу E.M. Akita и S. Nakai [5] с последующей очисткой на аффинной колонке HiTrap (GE Healthcare, Швеция), согласно инструкции производителя. Концентрацию тотального IgY определяли при 280 нм. Специфическую активность полученных препаратов IgY определяли: для ВКЭ – собственным вариантом ИФА с использованием в качестве иммуносорбента очищенного белка Е ВКЭ [4]; для полиовирусов – в реакции микронейтрализации против стандартных препаратов «диких» полиовирусов типов 1, 2, 3 (препараты получены из Национального института биологических стандартов и контроля – NIBSC, Великобритания) на культуре клеток HEp-2, согласно протоколу ВОЗ [6]; для ВЖЛ – методом редукции числа бляшек [7]. Препараты IgY стерилизовали фильтрацией через фильтры с диаметром пор 0,45 мкм, хранили при -20 °С в присутствии 50% глицерина и использовали в ИФА в качестве иммуносорбента для определения антигенов соответствующих вирусов, а также метили биотином (IgY против полиовируса типов 1, 2, 3 и против ВЖЛ) и использовали в системах ИФА для определения соответствующих антигенов (IgY → исследуемый антиген → IgY + биотин → стрептавидин-пероксидазный конъюгат).

Биотинилирование IgY проводили, согласно методике, изложенной в руководстве E. Harlow и D. Lane [8]. Препараты IgY + биотин хранили при -20 °С в присутствии 50% глицерина.

Система ИФА для титрования препаратов IgY против ВКЭ. Титрование проводили по собственной методике, изложенной нами ранее [4]. Иммунопанели сенсibilизировали очищенным антигеном ВКЭ в концентрации белка Е 10 мкг/мл (предоставлен М.Ф. Воровичем, ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Москва), после блокирования свободных сайтов вносили анализируемый IgY в разведениях, начиная с 1 : 4, и параллельно – IgY, выделенный из преиммунного желтка (контроль), инкубировали, вносили коммерческий пероксидазный конъюгат против IgY курицы, инкубировали и затем вносили субстрат (ТМВ).

Система ИФА для определения антигенов ВКЭ, полиовируса типов 1, 2, 3 и ВЖЛ с использованием сенсibilизации твёрдой фазы соответствующим IgY и детекторной антисыворотки. Применяли собственную схему [9]: сенсibilизация твёрдой фазы

IgY против соответствующего антигена → исследуемый антиген → соответствующая детекторная антисыворотка (или иммунный асцит мышей) → коммерческий пероксидазный конъюгат против IgG детекторной сыворотки (иммунного асцита мышей).

Система ИФА для определения антигенов полиовируса типов 1, 2, 3 и ВЖЛ, полностью основанная на использовании соответствующего IgY (в качестве иммуносорбента и детекторных антител, меченных биотином). Иммунопанели Costar (кат. № 9018) сенсibilизировали 18 ч при +4 °С препаратом IgY против соответствующего антигена в концентрации 10–20 мкг/мл в карбонат-бикарбонатном буфере, pH 9,6 (Sigma, кат. № C3041-100 CAP). После 3-кратной отмывки 0,05% Tween-20 в фосфатно-солевом буфере (Т-ФСБ) и блокирования свободных сайтов 1% сывороткой телёнка (Gibco) в ФСБ в течение 1 ч при +37 °С и 3-кратной отмывки вносили анализируемые антигены в разведениях в ИФА-буфере (1% сыворотка телёнка в ФСБ с 0,05% Tween-20). Негативный контроль антигена – ИФА-буфер. После инкубации в течение 2 ч при +37 °С (или 18 ч при +4 °С) и 5-кратной отмывки вносили соответствующие IgY, меченные биотином в ИФА-буфере в рабочем разведении, подобранном шахматным титрованием. После инкубации в течение 1 ч при +37 °С и 5-кратной отмывки вносили коммерческий стрептавидин-пероксидазный конъюгат (Sigma, кат. № S5512-1MG) в ИФА-буфере в рабочем разведении. Инкубировали 45 мин при +37 °С, отмывали 5 раз и вносили готовый субстрат ТМВ (Sigma, кат. № T0440-100 ml). Инкубировали в течение 30 мин в темноте, реакцию останавливали 2М серной кислотой. Объём вносимых ингредиентов – 0,1 мл (за исключением блокирующего раствора – 0,2 мл и серной кислоты – 0,05 мл). Оптическую плотность (ОП) измеряли при 450 нм (Thermo Scientific Multiskan FC ELISA reader, Thermo Labsystems, Финляндия). Результат считали положительным при значении P/N (ОП опыта/ОП контроля) $\geq 2,1$ [10]. Количество D-антигена рассчитывали по его титру или по отношению к ОП референс-образца (приблизительно). Для точного подсчёта используют метод параллельных линий, для которого необходим референс-образец с максимально достоверным количеством D-антигена.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

Результаты

На рисунке представлены результаты титрования в ИФА препарата IgY против ВКЭ (2 нед после трёх иммунизаций антигеном ВКЭ, концентрация тотального IgY 10 мг/мл). При низких значениях ($< 0,1$ о. е.) ОП контрольного образца (IgY из неиммунного желтка) анти-ВКЭ IgY демонстрирует выраженную специфичность с титром не менее 1 : 1,048576, что соответствует примерно 1 нг/мл специфического IgY (примерно 10% от тотального IgY).

Использование полученных препаратов анти-ВКЭ IgY в качестве иммуносорбента для ИФА в опытах

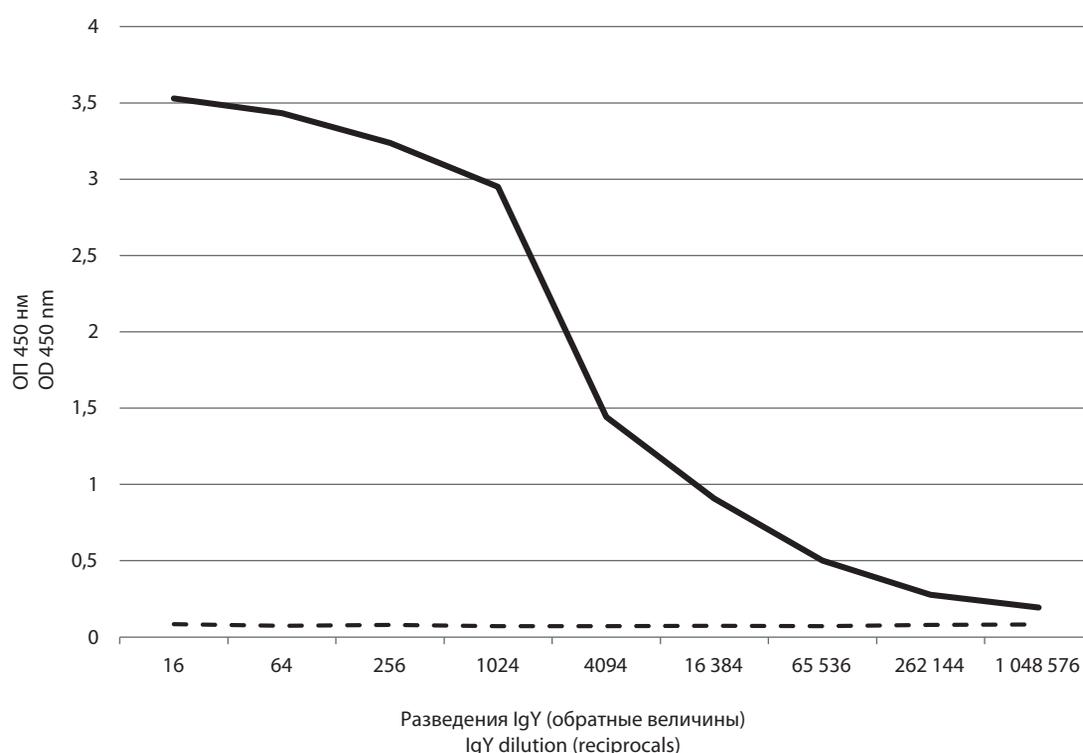
Таблица 1. Титрование D-антигена типов 1, 2, 3 в препарате инактивированной полиовирусной вакцины (С-ИПВ) на основе штаммов Сэбина в системе ИФА: сенсибилизация IgY → антиген → детекторная антисыворотка → антивидовой пероксидазный конъюгат

Table 1. Titration of D-antigen of types 1, 2, 3 in the preparation of inactivated poliovirus vaccine (C-IPV) based on Sabin strains in the ELISA system: sensitization by IgY → antigen → detector anti-serum → antispecies peroxidase conjugate

Тип Type	1 : 4*	1 : 16	1 : 64	1 : 256	1 : 1024	1 : 4096
1	4,143**	2,839	1,176	0,426	0,190	0,126
NA***	0,096	0,103	0,099	0,096	0,100	0,100
2	1,488	0,724	0,342	0,183	0,138	0,125
NA	0,123	0,120	0,120	0,122	0,122	0,128
3	4,044	3,235	2,069	0,984	0,408	0,221
NA	0,149	0,141	0,145	0,152	0,145	0,145

Примечание. * разведение исследуемого образца; ** оптическая плотность при 450 нм; *** «нормальный» антиген (ИФА-буфер).

Note. * dilution of the test sample; ** optical density at 450 nm; *** «normal» antigen (ELISA buffer).



Результаты титрования в иммуноферментном анализе препарата IgY против вируса клещевого энцефалита (ВКЭ).

Непрерывная линия – IgY против ВКЭ; пунктирная линия – IgY из неиммунного желтка (негативный контроль).

ELISA titration results of anti-TBE IgY preparation.

Continuous line – IgY anti-TBEV; dashed line – IgY from non-immune yolk (negative control).

по определению антигена ВКЭ (очищенный белок E) продемонстрировало четкие положительные результаты: очищенный белок E определяется в концентрации примерно 25 нг/мл (данные не представлены).

В табл. 1 представлены результаты титрования препарата поливалентной инактивированной полиовирусной вакцины на основе штаммов Сэбина, типы 1–3 (С-ИПВ, лабораторная серия) – определение D-антигена каждого типа в варианте ИФА с сенсибилизацией твердой фазы специфическими IgY против типов 1, 2, 3 и соот-

ветствующими детекторными антисыворотками кроликов. Согласно данным табл. 1, титр D-антигена типа 1 – 1 : 512; типа 2 – 1 : 128; типа 3 – 1 : 1024.

В табл. 2 представлены результаты титрования «диких» штаммов полиовируса (тип 1 – Mahoney, тип 2 – MEF-1, тип 3 – Saukett) – определение D-антигена каждого типа в культуральной жидкости инфицированных клеток *Vero* в варианте ИФА с сенсибилизацией твердой фазы специфическими IgY против типов 1, 2, 3 и соответствующими детекторными IgY, мечеными биотином.

Таблица 2. Титрование штаммов полиовируса (тип 1 – Mahoney, тип 2 – MEF-1, тип 3 – Saukett) – определение D-антигена каждого типа в культуральной жидкости инфицированных клеток *Vero* в варианте ИФА с сенсибилизацией твёрдой фазы специфическими IgY против типов 1, 2, 3 и соответствующими детекторными IgY, меченными биотином

Table 2. Titration of poliovirus strains (type 1 – Mahoney, type 2 – MEF-1, type 3 – Saukett) – determination of the D-antigen of each type in the culture fluid of infected *Vero* cells in the ELISA with sensitization of the solid phase by specific IgY against types 1, 2, 3 and corresponding biotin-labeled IgY as detector

Тип Type	1 : 4*	1 : 16	1 : 64	1 : 256	1 : 1024	1 : 4096
1	0,952**	0,564	0,267	0,156	0,119	0,109
NA***	0,102	0,104	0,099	0,103	0,103	0,108
2	3,058	3,041	2,493	1,751	1,594	0,882
NA	0,198	0,172	0,165	0,179	0,182	0,184
3	1,053	0,543	0,320	0,215	0,176	0,178
NA	0,166	0,166	0,161	0,162	0,162	0,170

Примечание. * разведение исследуемого образца; ** оптическая плотность при 450 нм; *** «нормальный» антиген (ИФА-буфер).

Note. * dilution of the test sample; ** optical density at 450 nm; *** «normal» antigen (ELISA buffer).

Таблица 3. Титрование компонентов куриного эмбриона (яйца), инфицированного вирусом жёлтой лихорадки (ВЖЛ), штамм 17 D, – определение антигена ВЖЛ в варианте ИФА с сенсибилизацией твёрдой фазы специфическим IgY и соответствующим детекторным IgY, меченным биотином

Table 3. Titration of components of chicken embryo (egg) infected with YF virus, strain 17 D – determination of YF virus antigen in the ELISA variant with sensitization of the solid phase by specific IgY and the corresponding detection IgY labeled with biotin

Образец Sample	Не разведен Not diluted	1 : 2*	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32
Аллантоисная жидкость Allantoic fluid	0,238**	0,169	0,156	0,156	0,152	0,150
Тело эмбриона (гомогенат) Embryo body (homogenate)	2,128	1,905	1,741	1,613	1,199	0,806
ВЖЛ*** YF Vac.	1,957	1,398	0,603	0,348	0,241	0,200
NA****	0,153	0,151	0,148	0,151	0,153	0,149

Примечание. * разведение исследуемого образца; ** оптическая плотность при 450 нм; *** коммерческая живая вакцина вируса жёлтой лихорадки (ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Москва); **** «нормальный» антиген (ИФА-буфер).

Note. * dilution of the test sample; ** optical density at 450 nm; *** commercial live yellow fever virus vaccine (Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia); **** «normal» antigen (ELISA buffer).

Из данных табл. 2 следует, что титр D-антигена типа 1 – 1 : 128; типа 2 \geq 1 : 4096; типа 3 – 1 : 64.

В табл. 3 представлены результаты титрования компонентов куриного эмбриона (яйца), инфицированного ВЖЛ, штамм 17 D, – определение антигена ВЖЛ в варианте ИФА с сенсибилизацией твёрдой фазы специфическим IgY и соответствующим детекторным IgY, биотином. Из данных таблицы следует, что в аллантоисной жидкости антиген ВЖЛ не определяется; в гомогенате тела эмбриона титр антигена ВЖЛ более 1 : 32 (~ 1 : 64 – 1 : 128); в коммерческой живой вакцине против жёлтой лихорадки титр антигена ВЖЛ – 1 : 8.

Чувствительность представленных вариантов ИФА составляет 2–3 Ig БОЕ/мл (для ВКЭ и ВЖЛ) и 3 Ig ТЦД/мл (для полиовируса).

Обсуждение

IgY-технология находит всё большее применение в исследовательской практике (в основном за рубе-

жом [1–3]), и представленные нами результаты показывают, что это оправданно: выраженная иммунореактивность кур, простота, дешевизна и атравматичность иммунизации (важнейший этический момент), большой выход и лёгкость получения препаратов IgY с высокой активностью и специфичностью. Поликлональные антисыворотки (или препараты IgG) млекопитающих, как правило, создают проблемы с перекрёстной реактивностью при использовании их в иммунологических тестах, особенно для детекции антигенов в виде клеточных или тканевых суспензий, включая кровь. Использование моноклональных антител, например, в системах ИФА для детекции сложных антигенов, менее эффективно вследствие узкой специфичности моноклональных антител (нередко приходится использовать «коктейли» из них для более широкой эпитопной специфичности). Поликлональные IgY представляются эффективной моделью для решения такого рода проблем. В данном сообще-

нии мы представили варианты систем ИФА на основе препаратов IgY для определения антигенов указанных вирусов. Системы ИФА для определения D-антигена полиовирусов и ВЖЛ уже используются при разработке экспериментальных серий инактивированной полиовирусной вакцины на основе штаммов Сэбина (С-ИПВ) [11] и инактивированной вакцины ВЖЛ [12].

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-3, 5-8, 10 см. REFERENCES)

4. Иванов А.П., Варгин В.В. Препараты IgY из куриного желтка как иммунные реагенты к вирусу клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55(2): 46-8.
9. Иванов А.П., Козлов В.Г., Клеблеева Т.Д., Иванова О.Е., Киктенко А.В. Система иммуноферментного анализа на основе специфических антител класса Y (IgY) из яичных желтков для количественного определения D-антигена в инактивированных полиовирусных вакцинах. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(6): 39-42.
11. Иванов А.П., Клеблеева Т.Д., Иванова О.Е., Ипатова Е.Г., Гмыль Л.В., Ишмухаметов А.А. Экспериментальные подходы к разработке инактивированной полиовирусной вакцины на основе штаммов Сэбина. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016; 15(4): 59-64. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-4-59-64>
12. Иванов А.П., Клеблеева Т.Д., Синогина А.А., Ишмухаметов А.А. Разработка инактивированной культуральной вакцины против желтой лихорадки. В кн.: *Материалы XI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы»*. М.; 2019: 68-9.

REFERENCES

1. Schade R., Calzado E.G., Sarmiento R., Chacana P.A., Porankiewicz-Asplund J., Terzolo H.P. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern. Lab. Anim.* 2005; 33(2): 129-54. DOI: <http://doi.org/10.1177/026119290503300208>
2. Schade R., Hendriksen C., Staak C., Erhard M. The production of avian (egg yolk) antibodies: IgY. The report and recommendations of ECVAM workshop 21. *Altern. Lab. Anim.* 1997; 24(6): 925-34.

3. Haak-Frendscho M. Why IgY? Chicken polyclonal antibody, an appealing alternative. *Promega Notes Magazine*. 1994; 46: 11-4.
4. Ivanov A.P., Vargin V.V. Chicken yolk IgY preparations as immune reagents to tick-borne encephalitis virus. *Voprosy virusologii*. 2010; 55(2): 46-8. (in Russian)
5. Akita E.M., Nakai S. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic E. coli strain. *J. Immunol. Meth.* 1993; 160(2): 207-14. DOI: [http://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90179-b](http://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90179-b)
6. World Health Organization. Manual for the virological investigation of polio [WHO/EPI/GEN97.01]. Geneva: WHO; 1997.
7. Mercier-Delarue S., Durier C., Colin de Verdière N., Poveda J.D., Meiffredy V., Garcia MDF., et al. Screening test for neutralizing antibodies against yellow fever virus, based on flavivirus pseudotype. *PLoS One*. 2017; 12(5): e0177882. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0177882>
8. Harlow E., Lane D. *Antibodies: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1988.
9. Ivanov A.P., Kozlov V.G., Klebleeva T.D., Ivanova O.E., Kiktenko A.V. An ELISA system based on the specific class Y (IgY) antibodies from egg yolks for the quantitative determination of D-antigen in inactivated poliovirus vaccines. *Voprosy virusologii*. 2014; 59(6): 39-42. (in Russian)
10. Ivanov A.P., Bashkirtsev V.N., Tkachenko E.A. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of arenaviruses. *Arch. Virol.* 1981; 67(1): 71-4. DOI: <http://doi.org/10.1007/BF01314603>
11. Ivanov A.P., Klebleeva T.D., Ivanova O.E., Ipatova E.G., Gmyl' L.V., Ishmukhametov A.A. Experimental approaches to the development of inactivated poliovirus vaccine based on Sabin strains. *Epidemiologiya i vaksinosprofilaktika*. 2016; 15(4): 59-64. DOI: <http://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-4-59-64> (in Russian)
12. Ivanov A.P., Klebleeva T.D., Sinyugina A.A., Ishmukhametov A.A. Development of inactivated yellow fever cultural vaccine. In: *Materials of the XI Annual All-Russian Congress on Infectious Diseases with International Participation «Infectious Diseases in the Modern World: Evolution, Current and Future Threats» [Materialy XI Ezhegodnogo Vserossiyskogo Kongressa po infektsionnym boleznyam s mezhdunarodnym uchastiem «Infektsionnye bolezni v sovremennom mire: evolyutsiya, tekushchie i budushchie угрозы»]*. Moscow, 2019: 68-9. (in Russian)



Вирусные гепатиты В, С и инфекционный мононуклеоз: эпидемиологическое сходство и различия

Соломай Т.В.¹, Семенов Т.А.^{2,3}

¹ Межрегиональное управление № 1 ФМБА России, 123182, г. Москва, Россия;

² ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

³ ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119048, г. Москва, Россия

Введение. Наличие в структуре вирусных гепатитов этиологически нерасшифрованных диагнозов определяет актуальность поиска иных возбудителей, участвующих в формировании патологии печени. Роль вируса Эпштейна–Барр в развитии гепатита описана в научной литературе, однако данные официальной статистики не позволяют оценить его вклад в поражение печени наряду с вирусами гепатита В и С.

Цель исследования – выявить общие и отличительные эпидемиологические признаки вирусных гепатитов В, С и инфекционного мононуклеоза (ИМ).

Материал и методы. Проведён ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости указанными нозологиями по данным официальной статистики в 2009–2018 гг. в Российской Федерации.

Результаты и обсуждение. Установлены разнонаправленность тенденций в многолетней динамике заболеваемости ИМ и острыми и хроническими гепатитами В и С, а также наличие сильной прямой корреляционной связи между заболеваемостью острыми и хроническими гепатитами В и С. К отличительным признакам относятся различия в интенсивности эпидемического процесса в разных возрастных группах (преобладание заболеваемости детей в возрасте 1–2 и 3–6 лет при ИМ и лиц старше 18 лет – при вирусных гепатитах). Общим для ИМ и вирусных гепатитов В и С является вовлечение в эпидемический процесс преимущественно городского населения, а также детей в возрасте до 1 года. Описанные различия обусловлены действием механизмов передачи, характерных для каждой инфекции.

Заключение. Полученные в ходе настоящего исследования результаты могут стать основой для дальнейшего изучения взаимодействия вируса Эпштейна–Барр с вирусами гепатита В и С.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр; инфекционный мононуклеоз; вирусные гепатиты В и С; эпидемиология; заболеваемость; группы риска.

Для цитирования: Соломай Т.В., Семенов Т.А. Вирусные гепатиты В, С и инфекционный мононуклеоз: эпидемиологическое сходство и различия. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(1): 27–34.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-27-34>

Для корреспонденции: Соломай Татьяна Валерьевна, канд. мед. наук, зам. руководителя, Межрегиональное управление № 1 ФМБА России, 123182, г. Москва. E-mail: solomay@ Rambler.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Соломай Т.В., Семенов Т.А.; сбор и обработка материала – Соломай Т.В.; написание текста – Соломай Т.В.; редактирование – Семенов Т.А.

Поступила 23.01.20

Принята в печать 29.01.20

Viral hepatitis B, C and infectious mononucleosis: epidemiological similarities and differences

Solomay T.V.¹, Semenenko T.A.^{2,3}

¹ Interregional Department № 1, Moscow, 123182, Russia;

² National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N. F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia;

³ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119048, Russia

Introduction. The presence of etiologically unencrypted diagnoses in the structure of viral hepatitis determines the relevance of searching for other pathogens involved in liver pathology formation. The role of Epstein-Barr virus in the development of hepatitis was described in the scientific literature, but official statistics do not allow to assess its contribution to liver damage along with hepatitis B and C viruses.

The purpose – to identify common and distinctive epidemiological features of viral hepatitis B (HB), C (HC) and infectious mononucleosis (IM).

Material and methods. A retrospective epidemiological analysis of these nosologies incidence was carried out according to official statistics in 2009–2018 in the Russian Federation.

Results and discussion. The multidirectional trends in the long-term dynamics of the incidence of IM, acute and chronic HB and HC and the presence of strong direct correlation between the acute and chronic HB and HC incidence were established. Distinctive features include disparity in epidemic process intensity in different age groups (prevalence of morbidity in children aged 1–2 and 3–6 years with IM and persons older than 18 years – with viral hepatitis). It is common for IM and HB and HC to involve the majority of urban population in the

epidemic process, as well as children under the age of 1 year. The described differences are due to the action of transmission mechanisms specific to each infection.

Conclusion. The results obtained in this study may serve as a basis for further study of the interaction of Epstein-Barr virus with hepatitis B and C viruses.

Keywords: Epstein-Barr virus; infectious mononucleosis; viral hepatitis B and C; epidemiology; morbidity; risk groups.

For citation: Solomay T.V., Semenenko T.A. Viral hepatitis B, C and infectious mononucleosis: epidemiological similarities and differences. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2020; 65(1): 27-34. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-27-34>

For correspondence: Tatyana V. Solomay, the Candidate of Medical Sciences, Deputy head of Interregional Department №1, Moscow, 123182, Russia. E-mail: solomay@rambler.ru

Information about authors:

Solomay T.V., <https://orcid.org/0000-0002-7040-7653>

Semenenko T.A., <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Contribution: concept and design of the study - Solomay T.V., Semenenko T.A.; the collection and processing of the material – Solomay T.V.; writing – Solomay T.V.; editing - Semenenko T.A.

Received 23 January 2020

Accepted 29 January 2020

Введение

Высокий удельный вес лиц с острым воспалительным поражением печени, которым диагноз был установлен клинически и не подтверждён лабораторным выявлением маркёров возбудителя, представляет актуальную проблему современного здравоохранения. По данным Н.И. Шулаковой и соавт. (2014) [1], на долю острых вирусных гепатитов неустановленной этиологии в структуре заболеваемости совокупного населения в отдельные годы приходится до 60%. В настоящее время приоритетом в расшифровке этиологии вирусных заболеваний печени обладают исследования, связанные с выявлением маркёров инфицирования вирусами гепатита А (ВГА), В (ВГВ) и С (ВГС) [2].

В то же время известно, что ряд других патогенов способны участвовать в формировании печеночной патологии. Так, исследования, проведенные в Украине в 2017 г., показали, что в этиологии вирусных гепатитов детей первого года жизни преобладают герпесвирусы: цитомегаловирус, вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), вирус простого герпеса 1-го типа [3]. О роли основного возбудителя инфекционного мононуклеоза (ИМ) – ВЭБ в развитии гепатита свидетельствуют результаты исследований отечественных и зарубежных авторов [4–6]. В недавно опубликованной статье американских специалистов (S. Rao и соавт., 2017) впервые в научной литературе описан случай сочетанной инфекции, вызванной ВГВ и ВЭБ, что привело к развитию хронического вирусного гепатита [7]. Следует отметить, что наряду с поражением печени при вирусных гепатитах и ВЭБ-инфекции возможны системные осложнения, связанные с процессом лимфолиферации, активацией аутоиммунитета и продукцией биологически активных веществ, в результате которых развивается воспалительный процесс в различных органах [8].

В России исследования, связанные с оценкой удельного веса ВЭБ в этиологической структуре гепатитов, а также сопоставлением данных об эпидемиологиче-

ских особенностях заболеваний печени, обусловленных вирусами гепатитов и ВЭБ, до настоящего времени не проводили. В последние годы в стране наметилась выраженная тенденция к росту заболеваемости ИМ [9], на этом фоне очевидна недостаточная информированность медицинского сообщества о проблеме ВЭБ-инфекции и её дифференциальной диагностике с другими вирусными поражениями печени [10].

Вышеизложенное определяет актуальность одно-временного изучения эпидемиологических характеристик вирусных гепатитов В, С и ВЭБ-инфекции.

Цель настоящей работы состояла в выявлении общих и отличительных эпидемиологических особенностей, проявлений, характеристик вирусных гепатитов В, С и ИМ.

Материал и методы

Материалом для исследования послужили данные официальной статистики по заболеваемости острыми и хроническими вирусными гепатитами В и С и ИМ в Российской Федерации (форма № 2 Федерального статистического наблюдения «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях»).

Для оценки эпидемиологических особенностей проведён ретроспективный эпидемиологический анализ заболеваемости изучаемыми инфекциями с учётом экстенсивных и интенсивных показателей с 2009 по 2018 г.

Для статистической обработки результатов рассчитывали средние многолетние уровни заболеваемости и удельный вес каждой исследуемой категории в общей структуре (M). Для оценки достоверности различий определяли ошибки средних (m), использовали критерий Стьюдента (t) и доверительную вероятность (p). Различия считали достоверными при $p \leq 0,05$ и высокодостоверными при $p \leq 0,01$. Взаимосвязь исследуемых процессов оценивали с помощью коэффициента линейной корреляции Пирсона (r).

Статистический и графический анализ материалов проведён на персональном компьютере с использо-

Таблица 1. Этиологическая структура острых гепатитов в Российской Федерации в 2009–2018 гг.**Table 1.** Etiological structure of acute hepatitis in the Russian Federation in 2009–2018

Год Year	Вирус гепатита А Hepatitis A virus		Вирус гепатита В Hepatitis B virus		Вирус гепатита С Hepatitis C virus		Вирус гепатита Е Hepatitis E virus		Возбудитель не установлен The pathogen is not installed		В с е г о... In total	
	абс. absolute number	%	абс. absolute number	%	абс. absolute number	%	абс. absolute number	%	абс. absolute number	%	абс. absolute number	%
2009	10 313	55,29	3836	20,57	3183	17,06	–	–	1320	7,08	18 652	100
2010	8944	54,95	3157	19,39	3021	18,57	–	–	1154	7,09	16 276	100
2011	6092	51,21	2442	20,53	2613	21,97	–	–	748	6,29	11 895	100
2012	7810	62,12	2023	16,09	2169	17,26	–	–	570	4,53	12 572	100
2013	8258	64,88	1908	14,99	2095	16,47	91	0,71	375	2,95	12 727	100
2014	10 483	69,03	1927	12,69	2246	14,78	111	0,73	420	2,77	15 187	100
2015	6429	60,45	1637	15,39	2099	19,74	96	0,90	374	3,52	10 635	100
2016	6424	64,15	1378	13,76	1806	18,03	113	1,13	293	2,93	10 014	100
2017	8059	69,94	1268	11,0	1784	17,69	158	1,37	253	2,20	11 522	100
2018	4168	58,47	988	13,86	1620	22,73	156	2,19	196	2,75	7128	100
Итого... Total...	76 980	60,8	20 564	16,24	22 636	17,88	725	0,57	5703	4,5	126 608	100

Таблица 2. Этиологическая структура впервые установленных хронических вирусных гепатитов в Российской Федерации в 2009–2018 гг.**Table 2.** Etiological structure of first-established chronic viral hepatitis in the Russian Federation in 2009–2018

Год Year	Вирус гепатита В Hepatitis B virus		Вирус гепатита С Hepatitis C virus		Возбудитель не установлен The pathogen is not installed		В с е г о... In total	
	абс. absolute number	%	абс. absolute number	%	абс. absolute number	%	абс. absolute number	%
2009	20 425	25,5	57 993	72,4	1683	2,10	80 101	100
2010	18 835	24,35	57 052	73,76	1465	1,89	77 352	100
2011	18 504	24,15	57 028	74,41	1103	1,44	76 635	100
2012	18 063	24,2	55 898	74,88	687	0,92	74 648	100
2013	16 746	22,75	56 146	76,29	703	0,96	73 595	100
2014	16 201	21,8	57 444	77,31	663	0,89	74 308	100
2015	15 748	21,92	55 596	77,38	505	0,70	71 849	100
2016	14 841	21,79	52 908	77,67	368	0,54	68 117	100
2017	14 034	21,54	50 798	77,98	314	0,48	65 146	100
2018	13 618	21,99	48 052	77,63	238	0,38	61 908	100
Итого... Total...	167 015	23,08	548 915	75,85	7729	1,07	723 659	100

ванием лицензионного пакета приложений Excel для операционной системы Microsoft Windows.

Результаты

Анализ данных официальной статистики показал, что ежегодно в этиологической структуре острых гепатитов основную роль играют ВГА, ВГВ и ВГС. Введение регистрации гепатита Е (возбудитель – вирус гепатита Е, ВГЕ) в 2013 г. позволило отдельно выделить данную нозологию. В то же время часть диагнозов по-прежнему не поддаются этиологической расшифровке, что может быть вызвано участием иных возбудителей в развитии острой патологии печени (табл. 1).

В структуре впервые установленных хронических гепатитов удельный вес этиологически нерасшифрованных диагнозов несколько меньше (от 0,38% в 2018 г.

до 2,10% в 2009 г.), однако эти данные также свидетельствуют о возможном участии других возбудителей в формировании указанной патологии (табл. 2).

Данные официальной статистики не позволяют оценить роль ВЭБ в этиологической структуре гепатитов.

Для сравнения динамики заболеваемости острыми и хроническими гепатитами В (ОГВ, ХГВ), С (ОГС, ХГС) и ИМ выбран период с 2009 по 2018 г. (рис. 1).

Из представленных на рис. 1 данных видно, что на фоне роста заболеваемости ИМ заболеваемость острыми и хроническими гепатитами В и С имеет тенденцию к снижению.

Проведенный корреляционный анализ выявил сильную обратную корреляционную связь между заболеваемостью ИМ и острыми и хроническими гепатитами В и С. Кроме того, установлена сильная пря-

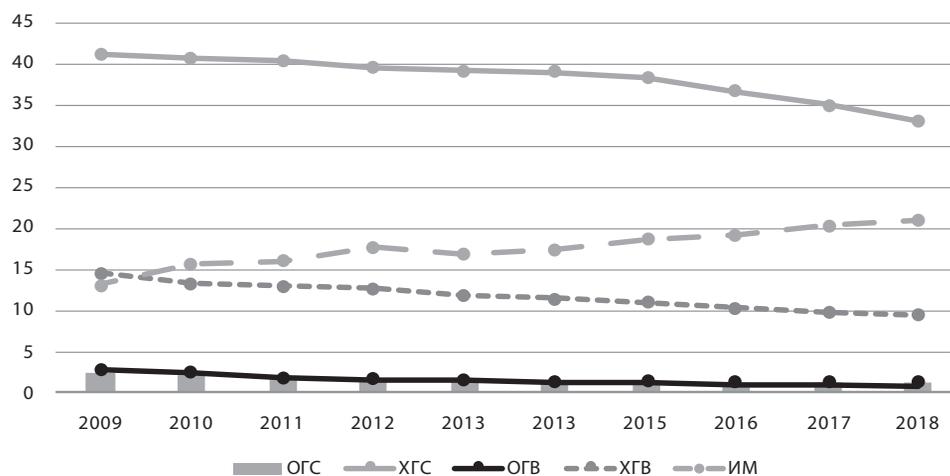


Рис. 1. Заболеваемость острыми и хроническими гепатитами В и С и инфекционным мононуклеозом в Российской Федерации в 2009–2018 гг. (на 100 тыс. населения).

ОГС – острый гепатит С; ХГС – хронический гепатит С; ОГВ – острый гепатит В; ХГВ – хронический гепатит В; ИМ – инфекционный мононуклеоз.

Fig. 1. Incidence of acute and chronic viral hepatitis B, C and infectious mononucleosis in the Russian Federation in 2009–2018 (per 100 thousand population).

ОГС – acute hepatitis C; ХГС – chronic hepatitis C; ОГВ – acute hepatitis B; ХГВ – chronic hepatitis B; ИМ – infectious mononucleosis.

Таблица 3. Корреляционный анализ заболеваемости инфекционным мононуклеозом и острыми и хроническими гепатитами В и С (данные по Российской Федерации за 2009–2018 гг.)

Table 3. Correlation analysis of the incidence of infectious mononucleosis and acute and chronic viral hepatitis B and C (data for the Russian Federation for 2009–2018)

Сравниваемые процессы Compare the processes	Связь Communication	Коэффициент линейной корреляции Пирсона, <i>r</i> Pearson linear correlation coefficient, <i>r</i>	Ошибка коэффициента корреляции, <i>m</i> Error of the correlation coefficient, <i>m</i>
Инфекционный мононуклеоз и хронический гепатит В Infectious mononucleosis and chronic hepatitis B	Сильная обратная A strong inverse	-0,96	0,013
Инфекционный мононуклеоз и хронический гепатит С Infectious mononucleosis and chronic hepatitis C	Сильная обратная A strong inverse	-0,92	0,027
Инфекционный мононуклеоз и острый гепатит В Infectious mononucleosis and acute hepatitis B	Сильная обратная A strong inverse	-0,96	0,016
Инфекционный мононуклеоз и острый гепатит С Infectious mononucleosis and acute hepatitis C	Сильная обратная A strong inverse	-0,94	0,019
Острый гепатит В и острый гепатит С Acute hepatitis B and acute hepatitis C	Сильная прямая Strong straight	0,99	0,005
Хронический гепатит В и хронический гепатит С Chronic hepatitis B and chronic hepatitis C	Сильная прямая Strong straight	0,90	0,033

мая корреляционная связь между заболеваемостью ОГВ и ОГС, а также ХГВ и ХГС (табл. 3).

Уровень заболеваемости городского населения ИМ, ОГВ, ОГС и ХГВ, ХГС на протяжении всего периода наблюдения был выше, чем у сельских жителей, при этом основные тенденции изменения заболеваемости данных категорий населения совпадали по каждой отдельно взятой нозологии. При сопоставлении средних многолетних уровней заболеваемости изучаемыми инфекциями городского и сельского населения за 2009–2018 гг. (рис. 2) во всех случаях достоверно выше были показатели городского населения: ИМ – $t = 23,32$; ОГВ – $t = 4,89$; ОГС – $t = 8,09$; ХГВ – $t = 10,07$; ХГС – $t = 26,85$ при $p \leq 0,01$.

При сравнении возрастной структуры заболевших ИМ и острыми и хроническими гепатитами

В и С (табл. 4) выявлены существенные различия. Из представленных данных видно, что в эпидемиологическом процессе ИМ задействованы все возрастные группы с преобладанием удельного веса детей 3–6 лет ($34,37 \pm 0,09\%$) над остальными возрастными категориями. Для ОГВ, ОГС, ХГВ и ХГС характерно преобладание доли лиц в возрасте 18 лет и старше: $98,34 \pm 0,09$; $95,70 \pm 0,13$; $99,32 \pm 0,04$ и $99,10 \pm 0,01\%$ соответственно.

Интенсивные показатели заболеваемости в разных возрастных группах также имели существенные отличия как внутри одной нозологии, так и при сопоставлении ИМ, острых и хронических гепатитов В и С. Средние многолетние уровни заболеваемости за 2009–2018 гг. в зависимости от возраста приведены в табл. 5.

Представленные данные свидетельствуют о том,

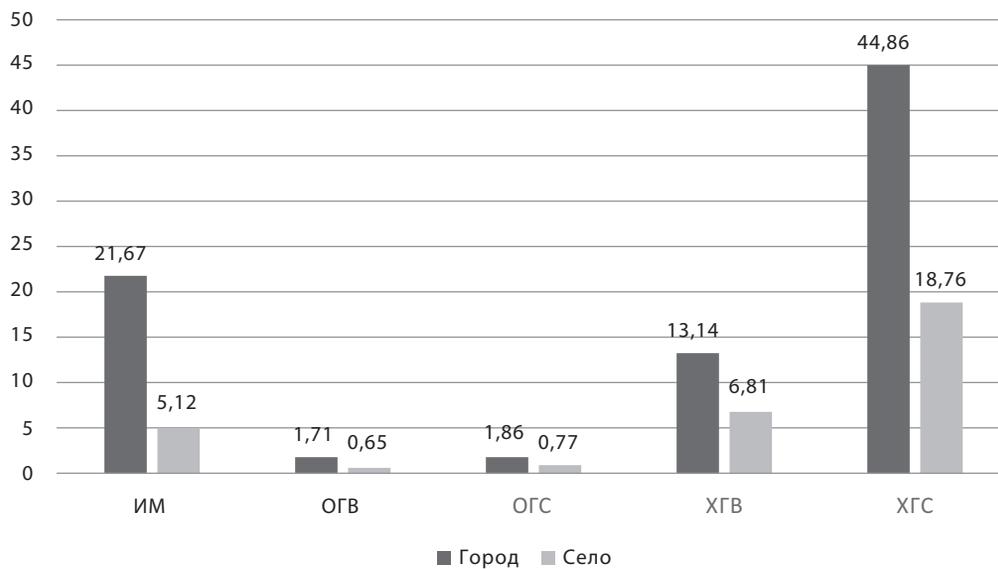


Рис. 2. Средние многолетние уровни заболеваемости городского и сельского населения Российской Федерации инфекционным мононуклеозом, острыми и хроническими гепатитами В и С в 2009–2018 гг. (на 100 тыс. населения соответственно).

ИМ – инфекционный мононуклеоз; ОГВ – острый гепатит В; ОГС – острый гепатит С; ХГВ – хронический гепатит В; ХГС – хронический гепатит С.

Fig. 2. Average long-term morbidity rates of urban and rural population of the Russian Federation with infectious mononucleosis, acute and chronic hepatitis B and C in 2009–2018 (per 100 thousand urban and rural population).

ИМ – infectious mononucleosis; ОГВ – acute hepatitis B; ОГС – acute hepatitis C; ХГВ – chronic hepatitis B; ХГС – chronic hepatitis C; город - urban population, село - rural population.

что заболеваемость ИМ во всех возрастных группах, за исключением лиц старше 18 лет, была достоверно выше заболеваемости острыми и хроническими гепатитами В и С ($t > 3$; $p \leq 0,01$).

Наиболее высокие показатели заболеваемости ИМ выявлены среди детей в возрасте 1–2 года и 3–6 лет ($162,67 \pm 3,33$ и $132,05 \pm 3,86$ на 100 тыс. населения возрастной группы соответственно), самые низкие – среди лиц старше 18 лет ($3,28 \pm 0,09$ на 100 тыс. населения возрастной группы). Промежуточное положение занимают возрастные группы до 1 года, 7–14 и 15–17 лет ($28,63 \pm 1,17$; $31,39 \pm 2,48$ и $30,99 \pm 1,49$ на 100 тыс. населения возрастной группы соответственно).

Достоверные различия по снижению показателей выявлены между средними многолетними уровнями заболеваемости ИМ в возрастных группах 1–2 и 3–6 лет ($t = 6,0$; $p \leq 0,01$); 3–6 и 7–14 лет ($t = 21,93$; $p \leq 0,01$); до 1 года и 18 лет и старше ($t = 21,67$; $p \leq 0,01$). Не были установлены достоверные различия между показателями в группах 7–14 и 15–17 лет ($t = 0,14$; $p > 0,05$); 15–17 лет и до 1 года ($t = 1,24$; $p > 0,05$).

Заболеваемость ОГВ, ХГВ и ХГС, напротив, была наиболее высокой среди взрослого населения (18 лет и старше): $1,75 \pm 0,23$; $25,82 \pm 11,42$ и $55,22 \pm 8,18$ соответственно на 100 тыс. населения возрастной группы.

По заболеваемости ОГВ 2-е ранговое место заняли дети до 1 года ($0,67 \pm 0,14$ на 100 тыс. населения возрастной группы), их показатель был достоверно ниже такового в возрастной группе 18 лет и старше ($t = 4,0$; $p \leq 0,01$). Следующий по величине показатель – среди подростков 15–17 лет ($0,21 \pm 0,049$) был достоверно ниже, чем в предыдущей группе ($t = 3,1$; $p \leq 0,01$),

и достоверно выше, чем в группе детей 1–2 лет ($t = 2,6$; $p \leq 0,05$). Сравниваемые показатели в группах детей 1–2, 3–6 и 7–14 лет достоверных различий не имели (t для возрастных групп 1–2 года и 3–6 лет составил 1,22; 1–2 года и 7–17 лет – 0,5; 3–6 и 7–14 лет – 1,19 при $p > 0,05$).

В отличие от ОГВ для ОГС на первую позицию вышла заболеваемость детей до 1 года ($2,14 \pm 0,23$ на 100 тыс. населения возрастной группы), а лица старше 18 лет заняли 2-е место ($1,84 \pm 0,14$), однако различия между сравниваемыми группами не достоверны ($t = 1,11$; $p > 0,05$). Дальнейшее распределение показателей в возрастных группах по убыванию было аналогичным с ОГВ. На 3-м месте по заболеваемости ОГС оказались подростки 15–17 лет ($0,61 \pm 0,12$ на 100 тыс. населения возрастной группы), у них средний многолетний уровень заболеваемости был достоверно ниже такового в группе лиц старше 18 лет ($1,84 \pm 0,14$; $t = 6,47$; $p \leq 0,01$) и достоверно выше, чем в следующей группе – у детей 1–2 лет ($0,27 \pm 0,05$; $t = 10,47$; $p \leq 0,01$). В отличие от ОГВ для ОГС средний многолетний уровень заболеваемости детей 1–2 лет ($0,27 \pm 0,05$) достоверно отличался от такового в возрастной группе 7–14 лет ($0,08 \pm 0,01$; $t = 3,8$). Различия между показателями детей 7–14 и 3–6 лет ($0,06 \pm 0,02$) не достоверны ($t = 0,7$; $p \leq 0,05$).

Для ХГВ и ХГС на второй позиции оказались средние многолетние уровни заболеваемости подростков 15–17 лет ($1,89 \pm 0,27$ и $3,71 \pm 0,51$ соответственно на 100 тыс.), они были достоверно ниже таковых в старшей возрастной группе ($t = 2,1$; $p \leq 0,05$; и $t = 6,28$; $p \leq 0,01$ соответственно).

Таблица 4. Возрастная структура инфекционного мононуклеоза, острых и хронических гепатитов В и С в 2009–2018 гг.

Table 4. Age structure of infectious mononucleosis, acute and chronic hepatitis B and C in 2009–2018

Возраст, годы Age, years	Инфекционный мононуклеоз Infectious mononucleosis			Острый Acute						Хронический Chronic					
				гепатит В hepatitis B			гепатит С hepatitis C			гепатит В hepatitis B			гепатит С hepatitis C		
	абс. absolute number	%	<i>m</i>	абс. absolute number	%	<i>m</i>	абс. absolute number	%	<i>m</i>	абс. absolute number	%	<i>m</i>	абс. absolute number	%	<i>m</i>
<1	5141	2,05	0,03	117	0,57	0,06	380	1,71	0,08	85	0,03	0,003	615	0,10	0,003
1–2	57 245	22,81	0,08	22	0,11	0,02	92	0,41	0,04	128	0,04	0,003	942	0,15	0,004
3–6	86 272	34,37	0,09	18	0,09	0,02	40	0,18	0,03	144	0,05	0,01	907	0,14	0,004
7–14	47 965	19,11	0,08	74	0,36	0,04	124	0,56	0,05	691	0,23	0,03	1369	0,21	0,005
15–17	16 346	6,51	0,04	111	0,54	0,05	321	1,44	0,08	999	0,33	0,03	1956	0,30	0,006
≥18 лет ≥18 years	38 013	15,15	0,07	20 222	98,34	0,09	21288	95,70	0,13	298 968	99,32	0,04	639 262	99,10	0,01
В с е р о... T o t a l...	250 982	100		20 564	100		22245	100		301 015	100		645 051	100	

Таблица 5. Средние многолетние уровни заболеваемости инфекционным мононуклеозом, острыми и хроническими гепатитами В и С за 2009–2018 гг. на 100 тыс. населения возрастной группы (*M ± m*)

Table 5. Average long-term incidence of infectious mononucleosis, acute and chronic hepatitis B and C for 2009–2018 per 100 thousand population of the age group (*M ± m*)

Нозология Nosology		Возраст, годы Age, years					
		<1	1–2	3–6	7–14	15–17	≥18
ИМ	СМУ	28,63 ± 1,17	162,67 ± 3,33	132,05 ± 3,86	31,39 ± 2,48	30,99 ± 1,49	3,28 ± 0,09
	ранговое место rank place	5*	1*	2*	3	4	6
ОГВ	СМУ	0,67 ± 0,14	0,07 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,21 ± 0,05	1,75 ± 0,23
	ранговое место rank place	2*	4	6	5	3*	1*
ОГС	СМУ	2,14 ± 0,23	0,27 ± 0,05	0,06 ± 0,02	0,08 ± 0,01	0,61 ± 0,12	1,84 ± 0,14
	ранговое место rank place	1	4*	6	5	3*	2*
ХГВ	СМУ	0,48 ± 0,07	0,38 ± 0,07	0,24 ± 0,04	0,45 ± 0,09	1,89 ± 0,27	25,82 ± 11,42
	ранговое место rank place	3	5	6	4	2	1*
ХГС	СМУ	3,41 ± 0,23	2,72 ± 0,18	1,43 ± 0,12	0,90 ± 0,07	3,71 ± 0,51	55,22 ± 8,18
	ранговое место rank place	3*	4*	5*	6	2	1*

Примечание. * различия со следующим ранговым местом в порядке убывания достоверны ($t > 2; p \leq 0,05$); ИМ – инфекционный мононуклеоз; СМУ – средние многолетние уровни заболеваемости; ОГВ – острый гепатит В; ОГС – острый гепатит С; ХГВ – хронический гепатит В; ХГС – хронический гепатит С.

Note. * differences with the next ranking place in descending order are significant ($t > 2; p \leq 0,05$). ИМ -infectious mononucleosis; СМУ—average long-term morbidity levels; ОГВ – acute hepatitis B; ОГС – acute hepatitis C; ХГВ – chronic hepatitis B; ХГС – chronic hepatitis C.

Для ХГВ различия между показателями в группах детей 15–17 лет и до 1 года также достоверны ($t = 5,04; p \leq 0,01$). Между аналогичными показателями ХГВ в возрастных группах до 1 года и 7–14 лет; 7–14 и 1–2 года; 1–2 года и 3–6 лет достоверные различия отсутствуют ($t = 0,27; 0,58; 1,75$ соответственно; $p > 0,05$).

Для ХГС, как и для ХГВ, 3-ю позицию заняла возрастная группа детей до 1 года, показатель которой был ниже, чем среди подростков 15–17 лет ($3,41 \pm 0,23$), однако различия статистически не достоверны ($t = 0,54; p > 0,05$). Далее по убыванию показателей установлены достоверные различия между средними многолетними уровнями заболеваемости

ХГС в возрастных группах детей до 1 года и 1–2 лет ($t = 2,4; p \leq 0,05$); 1–2 и 3–6 лет ($t = 5,86; p \leq 0,01$); 3–6 и 7–14 лет ($t = 3,86; p \leq 0,01$).

Обсуждение

Анализ полученных результатов позволил вынести на обсуждение следующие положения. По данным, полученным в ходе исследования, в структуре острых и хронических вирусных гепатитов на долю этиологически не расшифрованных случаев приходится 4,5 и 1,07% соответственно. Результаты исследования других авторов свидетельствуют о том, что удельный вес острых гепатитов неустановленной этиологии мо-

жет достигать 60% [1]. Такая разница в результатах может быть обусловлена разными подходами в оценке этиологической структуры, тем не менее это позволяет предположить участие иных этиологических агентов, отличных от ВГА, ВГВ, ВГС и ВГЕ, в развитии как острой, так и хронической патологии печени. Одним из таких патогенов может быть ВЭБ, этиологическая роль которого в патологии печени описана отечественными и зарубежными авторами [3–7].

В многолетней динамике (2009–2018 гг.) заболеваемости ИМ и заболеваемости острыми и хроническими вирусными гепатитами имеют место противоположные тенденции, подтвержденные выявлением сильной обратной корреляционной связи. Вероятной причиной этого может быть конкурентное взаимодействие этиологических агентов ИМ и гепатитов, предположение о котором высказано в научной литературе [7, 11].

Напротив, сильная прямая корреляционная связь между ОГВ и ОГС, а также между ХГВ и ХГС свидетельствует об общности причин снижения показателей за исследуемый период. Данная тенденция не может быть объяснена исключительно введением иммунизации против гепатита В, поскольку аналогичная мера профилактики для гепатита С отсутствует. Расширение использования одноразовых расходных материалов и инструментария в медицинской практике сыграло свою роль в снижении заболеваемости указанными нозологиями, однако также в полной мере не может объяснить стойкую тенденцию к снижению показателей, поскольку на современном этапе ведущую роль в передаче возбудителей гепатитов В и С играют инъекционное употребление наркотиков и половой путь передачи [12, 13]. В этой связи можно высказать предположение, что конкуренция возбудителей ИМ (в частности ВЭБ), ВГВ и ВГС за печень, как орган–мишень, приводит к постепенному вытеснению одних этиологических агентов другими, способствуя при этом переходу острых форм вирусных гепатитов в хронические.

Данные о достоверном преобладании показателей заболеваемости городского населения по сравнению с сельскими жителями для всех исследуемых нозологий могут быть, с одной стороны, следствием более высоких диагностических возможностей для городского населения, а с другой – результатом социальных процессов (плотность и социальная активность населения, миграция и др.), оказывающих влияние на интенсивность путей передачи возбудителей ИМ, ВГВ и ВГС.

Различия в возрастной структуре заболевших также могут быть обусловлены действующими механизмами передачи вирусов. Аэрозольная передача возбудителя ИМ способствует активному вовлечению в эпидемический процесс лиц из организованных коллективов, в первую очередь детей 3–6 лет, на которых приходится 34,37% всех выявленных больных. Этот контингент является основным резервуаром инфекции в популяции. В то же время полученные результаты показывают вовлечение в эпидемический процесс ИМ лиц из всех возрастных групп, в том числе лиц 18 лет и старше (15,15%), что не позволяет расценивать эту нозологию как «детскую» инфекцию [5, 6].

Оценка средних многолетних уровней заболеваемости изучаемыми инфекциями в разных возрастных группах показала, что для ИМ и острых и хронических вирусных гепатитов В и С существуют выраженные различия.

Так, для ИМ самые высокие показатели были зарегистрированы в группе детей 1–2 и 3–6 лет. Полученные данные находят подтверждение в результатах серологических исследований, проведенных в нашей стране и за рубежом: маркеры перенесённой инфекции – иммуноглобулины G к нуклеарному антигену ВЭБ – выявляются у 52% детей до 1 года, у 70% к третьему году жизни и у 80,5% к 18 годам [14–16]. В то же время эти данные свидетельствуют о том, что около 20% населения старше 18 лет ранее не имели контакта с ВЭБ, что должно определять уровни заболеваемости для данной возрастной группы при вовлечении её в эпидемический процесс ИМ. Однако результаты настоящего исследования свидетельствуют о достоверно более низком уровне заболеваемости в указанной возрастной группе за исследуемый период времени ($3,28 \pm 0,09$ на 100 тыс.) по сравнению с другими контингентами, что может объясняться недоучётом как первичной заболеваемости, так и случаев реактивации инфекции у взрослого населения [16].

Напротив, при ОГВ, ХГВ и ХГС самые высокие уровни заболеваемости были выявлены среди взрослого населения, 2-ю позицию при ОГВ заняли дети до 1 года, а при хронических гепатитах – подростки 15–17 лет. Исключение составил ОГС: на 1-е место вышли показатели в группе детей до 1 года, которые не имели достоверных отличий от следующих за ними показателей взрослого населения.

Описанные различия обусловлены действием механизмов передачи, характерных для каждой инфекции. Если для ИМ высокие показатели среди детей первых лет жизни обусловлены преимущественно аэрозольной, а также вертикальной передачей возбудителя [15–17], то для ВГВ и ВГС отсутствие аэрозольной передачи определяет достоверно более низкие показатели в данных возрастных группах по сравнению с ИМ. Напротив, высокая заболеваемость взрослого населения острыми и хроническими гепатитами В и С является следствием передачи возбудителей половым и инъекционным путями [12, 13]. Наличие аэрозольной передачи ВЭБ определяет не только более широкое распространение в популяции ИМ, но и более раннюю встречу с его возбудителем, нежели с ВГВ и ВГС.

Заключение

Таким образом, основной этиологический агент инфекционного мононуклеоза ВЭБ наряду с ВГВ и ВГС участвует в формировании патологии печени.

Разнонаправленность тенденций в многолетней динамике заболеваемости ИМ и острыми и хроническими гепатитами В и С и наличие сильной прямой корреляционной связи между заболеваемостью острыми и хроническими гепатитами В и С могут быть обу-

словлены конкурентными взаимоотношениями указанных возбудителей, что необходимо доказать.

К отличительным признакам сравниваемых нозологий можно отнести различия в интенсивности эпидемического процесса в разных возрастных группах (преобладание заболеваемости детей в возрасте 1–2 и 3–6 лет при ИМ и взрослых старше 18 лет – при вирусных гепатитах), обусловленные ведущим путём передачи.

Общим для ИМ и вирусных гепатитов В и С является вовлечение в эпидемический процесс преимущественно городского населения, а также детей в возрасте до 1 года. Первое можно объяснить влиянием единичных социальных факторов, второе – действием вертикального пути передачи сравниваемых инфекций.

Полученные в ходе настоящего исследования результаты могут стать основой для дальнейшего изучения взаимодействия ВЭБ с вирусами гепатита В и С.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 7, 14, 15 см. REFERENCES)

1. Шулакова Н.И., Лыткина И.Н., Акимкин В.Г., Ершова О.Н., Шахгильдян И.В. Современная этиологическая структура острых и хронических вирусных гепатитов и оценка эффективности вакцинопрофилактики гепатита А в Москве. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2014; (6): 75-82.
2. Амбалов Ю.М., Коваленко А.П., Пшенецкая О.А., Донцов Д.В., Рязанова Д.С., Мамедова Н.И. и др. Тактика врача при распознавании болезней, протекающих с повышением в сыворотке крови активности АлАТ, АлАТ и ГГТП. В кн.: *Тезисы VI Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально значимые и особо опасные инфекционные заболевания»*. Краснодар: Полиграф-ЮГ; 2019: 12-3.
3. Сорокман Т.В., Молдован П.М., Макарова Е.В. Структура вирусных гепатитов у детей раннего возраста. *Актуальная инфектология*. 2017; 5(2): 85-9. DOI: <http://doi.org/10.22141/2312-413x.5.2.2017.105320>
4. Шаапун А.Р., Мхитарян А.Л. Характер гепатита при инфекционном мононуклеозе у больных разного возраста с типичными и стертыми проявлениями болезни. *Актуальная инфектология*. 2013; 1: 25-8.
5. Хмилевская С.А., Зайцева И.А., Михайлова Е.В. Изменение функционального состояния печени при Эпштейна-Барр вирусном мононуклеозе у детей. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2009; 5(4): 572-7.
6. Дворяковская Г.М., Ивлева С.А., Дарманян А.С., Дворяковский И.В. Неинвазивная ультразвуковая оценка паренхимы печени и селезенки у детей с инфекционным мононуклеозом. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2013; (1): 14-8.
7. Зубкин М.Л., Семенов Т.А., Селькова Е.П., Девяткин А.В., Крюков Е.В., Червинко В.И. Хроническая HCV-инфекция и патология почек. *Инфекционные болезни*. 2017; 15(4): 68-76. DOI: <http://doi.org/10.20953/1729-9225-2017-4-68-76>
8. Соломай Т.В. Многолетняя динамика заболеваемости и территориальное распространение инфекционного мононуклеоза. *Здравоохранение Российской Федерации*. 2019; 63(4): 186-92. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0044-197X-2019-63-4-186-192>
9. Соломай Т.В., Куликова М.М. Осведомленность врачей об инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барр. *Санитарный врач*. 2019; (7): 30-41.
10. Тотолян Г.Г., Ильченко Л.Ю., Федоров И.Г., Кожанова Т.В., Морозов И.А., Кюрегян К.К. и др. Влияние вирусов герпеса на течение хронических заболеваний печени. *Архив внутренней медицины*. 2013; (6): 18-24.
11. Дружинина Т.А., Ситников И.Г., Бохонов М.С., Галицина ЛЕ., Кудашкина Г.А. Вирусный гепатит С – эпидемиологические особенности на современном этапе. *Санитарный врач*. 2018; (6): 17-23.
12. Асратян А.А., Семенов Т.А., Кальнин И.Б., Орлова О.А., Соловьев Д.В., Русакова Е.В. и др. Современные эпидемиологические особенности вирусных гепатитов В и С, туберкулеза и ВИЧ-инфекции в психиатрических стационарах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(1): 32-9. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-1-32-39>
13. Антонова М.В., Кашуба Э.А., Дроздова Т.Г., Любимцева О.А., Ханипова Л.В., Огошкова Н.В. и др. Сравнительная характеристика клинического течения и лабораторных данных первичной Эпштейн-Барр вирусной инфекции и ее реактивации у детей различных возрастных групп. *Вестник совета молодых учёных и специалистов Челябинской области*. 2016; 2(3): 19-24.
14. Соломай Т.В., Семенов Т.А., Иванова М.Ю. Роль Эпштейна-Барр вирусной инфекции и гепатитов В и С в патологии печени. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(5): 215-20. DOI: <http://dx.doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-215-220>

REFERENCES

1. Shulakova N.I., Lytkina I.N., Akimkin V.G., Ershova O.N., Shakhgil'dyan I.V. Current etiological structure of acute and chronic viral hepatitis and evaluation of hepatitis a vaccination in Moscow. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2014; (6): 75-82. (in Russian)
2. Ambalov Yu.M., Kovalenko A.P., Pshenetskaya O.A., Dontsov D.V., Ryzanova D.S., Mamedova N.I., et al. Tactics of the doctor at recognition of the diseases proceeding with increase in serum of activity of ALAT, ALAT and GGTP. In: *Abstracts of the VI All-Russian Interdisciplinary Scientific and Practical Conference with International Participation «Socially significant and especially dangerous infectious diseases» [Tezisy VI Vserossiyskoy mezhdistsiplinarnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem «Sotsial'no znachimye i osobo opasnye infektsionnye zabolevaniya»]*. Krasnodar: Poligraf-YuG; 2019: 12-3. (in Russian)
3. Sorokman T.V., Moldovan P.M., Makarova E.V. Structure of viral hepatitis in infants. *Aktual'naya infektolegiya*. 2017; 5(2): 85-9. DOI: <http://doi.org/10.22141/2312-413x.5.2.2017.105320> (in Russian)
4. Shaapuni A.R., Mkhitaran A.L. Nature of hepatitis in infectious mononucleosis in patients of different age with typical and subclinical signs of the disease. *Aktual'naya infektolegiya*. 2013; 1(1): 25-8. (in Russian)
5. Khmylevskaya S.A., Zaytseva I.A., Mikhaylova E.V. Liver functional state changes at epstein-barr virus mononucleosis in children. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal*. 2009; 5(4): 572-7. (in Russian)
6. Dvoryakovskaya G.M., Ivleva S.A., Darmanyan A.S., Dvoryakovskiy I.V. Noninvasive ultrasound evaluation of the parenchyma of the parenchyma of liver and spleen in children with infectious mononucleosis. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2013; (1): 14-8. (in Russian)
7. Rao S.C., Ashraf I., Mir F., Samiullah S., Ibdah J.A., Tahan V. Dual infection with Hepatitis B and Epstein-Barr virus presenting with severe jaundice, coagulopathy and Hepatitis B virus chronicity outcome. *Am. J. Case Rep*. 2017; 18: 170-2. DOI: <http://doi.org/10.12659/ajcr.901688>
8. Zubkin M.L., Semenenko T.A., Sel'kova E.P., Devyatkin A.V., Kryukov E.V., Chervinko V.I. Chronic HCV infection and kidney pathology. *Infektsionnye bolezni*. 2017; 15(4): 68-76. DOI: <http://doi.org/10.20953/1729-9225-2017-4-68-76> (in Russian)
9. Solomay T.V. Dynamics of morbidity and territorial spread of infectious mononucleosis. *Zdravookhranenie Rossiyskoy Federatsii*. 2019; 63(4): 186-92. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0044-197X-2019-63-4-186-192> (in Russian)
10. Solomay T.V., Kulikova M.M. Physicians' awareness of Epstein-Barr virus infection. *Sanitarnyy vrach*. 2019; (7): 30-41. (in Russian)
11. Totolyan G.G., Il'chenko L.Yu., Fedorov I.G., Kozhanova T.V., Morozov I.A., Kyuregyan K.K., et al. Influence of herpes viruses on the course of chronic liver diseases. *Arkhiv" vnutrenney meditsiny*. 2013; (6): 18-24. (in Russian)
12. Druzhinina T.A., Sitnikov I.G., Bokhonov M.S., Galitsina L.E., Kudashkina G.A. Viral hepatitis C-epidemiological features at the present stage. *Sanitarnyy vrach*. 2018; (6): 17-23. (in Russian)
13. Asratyan A.A., Semenenko T.A., Kal'nin I.B., Orlova O.A., Solov'ev D.V., Rusakova E.V., et al. Modern epidemiological features of viral hepatitis B and C, tuberculosis and HIV infection in psychiatric hospitals. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2020; 97(1): 32-9. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-1-32-39> (in Russian)
14. Cohen J.I. Epstein-Barr virus infection. *N. Engl. J. Med*. 2000; 343(7): 481-92. DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJM200008173430707>
15. Yang E.V. The chronic mononucleosis syndrome. *J. Infect. Dis*. 2003; 122(3): 205-12.
16. Antonova M.V., Kashuba E.A., Drozdova T.G., Lyubimtseva O.A., Khanipova L.V., Ogoshkova N.V., et al. Comparative characteristics of the clinical course and laboratory parameters of the primary and re-activation of Epstein-Barr virus infection in children of different ages groups. *Vestnik soveta molodykh uchennykh i spetsialistov Chelyabinskoy oblasti*. 2016; 2(3): 19-24. (in Russian)
17. Solomay T.V., Semenenko T.A., Ivanova M.Yu. The role of Epstein-Barr viral infection and hepatitis B and C in liver pathology. *Voprosy virusologii*. 2019; 64(5): 215-20. DOI: <http://dx.doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-215-220> (in Russian)



Характеристика В1-клеток в процессе экспериментального лейкомогенеза

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

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

Введение. Вирус лейкоза крупного рогатого скота (КРС) вызывает значительную поликлональную экспансию CD5⁺, IgM⁺ В-лимфоцитов, известных как персистирующий лимфоцитоз приблизительно у 30% заражённого КРС. Однако пока не ясно, что происходит с данной субпопуляцией В-клеток в ранний период инфицирования животных.

Цель исследования – количественная характеристика IgM⁺ и CD5⁺ В-клеток в процессе иммунного ответа на заражение вирусом лейкоза крупного рогатого скота (BLV), которая может дать важную информацию о механизмах прайминга лимфоцитов при инфицировании BLV.

Материал и методы. В эксперименте использовали BLV-отрицательных телят чёрно-пёстрой породы в возрасте 8 мес ($n = 11$). Животным опытной группы ($n = 8$) внутривенно вводили кровь BLV-положительной коровы. Телятам контрольной группы ($n = 3$) вводили физиологический раствор. Исследования проводили до и после заражения на 5, 7, 14, 21, 28 и 65-е сутки иммунного ответа. Количество В-лимфоцитов в крови определяли методом иммунопероксидазного окрашивания на основе моноклональных антител к IgM и CD5.

Результаты. В результате проведённых исследований установлено, что уровень CD5⁺ В-клеток повышается на 14-е сутки первичного иммунного ответа, характеризующегося поликлональной пролиферацией CD5⁺ В-клеток, которые являются первичной мишенью для BLV. Данные исследований подтверждают, что в лимфоцитах экспериментально заражённого КРС поверхностная агрегация молекул IgM и CD5 на В-лимфоцитах отсутствует.

Обсуждение. Известно, что именно от субпопуляции В1-клеток зависит волнообразный характер синтеза IgM, который был показан в предыдущих исследованиях. После 7-х суток иммунного ответа показатели IgM⁺- и CD5⁺-клеток не коррелируют, что показывает их функциональное различие. Возможно, увеличение числа CD5⁺-клеток связано не с В-клетками, а с дифференцирующимися под влиянием вируса Т-лимфоцитами.

Выводы. Субпопуляция В1-клеток является первичной мишенью вируса лейкоза КРС. 65-е сутки иммунного ответа характеризуются экспансией IgM⁺ В-клеток, снижением числа CD5⁺-клеток и равномерным распределением рецепторов по периметру клеток.

Ключевые слова: вирус лейкоза крупного рогатого скота; В-клетки; моноклональные антитела; иммуноглобулин М; иммунопероксидажное окрашивание; рецепторы клеток.

Для цитирования: Ездакова И.Ю., Капустина О.В., Гулюкин М.И., Степанова Т.В. Характеристика В1-клеток в процессе экспериментального лейкомогенеза. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(1): 35-40.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-35-40>

Для корреспонденции: Ездакова Ирина Юрьевна, д-р биол. наук, зав. лабораторией иммунологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, 109428, г. Москва. E-mail: ezdakova.i@viev.ru

Финансирование. Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Гулюкин М.И., Ездакова И.Ю.; сбор и обработка материала – Капустина О.В., Ездакова И.Ю., Степанова Т.В.; статистическая обработка – Ездакова И.Ю.; написание текста – Ездакова И.Ю.

Поступила 23.01.20
Принята в печать 29.01.20

Characterization of B1-cells during experimental leukomogenesis

Ezdakova I.Yu., Kapustina O.V., Gulyukin M.I., Stepanova T.V.

All-Russian Scientific and Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 109428, Russia

Background. Bovine leukemia causes a significant polyclonal expansion of CD5⁺, IgM⁺ B lymphocytes, known as persistent lymphocytosis (PL), in approximately 30% of infected cattle. However, it is not yet clear what happens to this subpopulation of B cells in the early period of infection of animals.

Purpose. Quantitative characterization of IgM⁺ and CD5⁺ B cells during the immune response, which can provide important information on the mechanisms of lymphocyte priming in BLV infection.

Material and methods. The experiment used BLV-negative calves of black-motley breed at the age of 8 months ($n = 11$). Animals ($n = 8$) were intravenously injected with blood of a BLV-positive cow. Control calves ($n = 3$) were injected with saline. Studies were performed before and after infection on days 5, 7, 14, 21, 28 and 65 of the immune response. The determination of the number of B-lymphocytes in the blood was carried out by the method of immunoperoxidase staining based on monoclonal antibodies to IgM, CD5.

Results. As a result of the studies, it was found that the level of CD5⁺ B cells increases on the 14th day of the primary immune response, characterized by polyclonal proliferation of CD5⁺ B cells, which are the primary target for BLV. Our research data confirm that in the lymphocytes of experimentally infected cattle, surface aggregation of IgM and CD5 molecules on B-lymphocytes is absent.

Discussion. It is known that the wave-like nature of IgM synthesis, which was shown in previous studies, depends on a subpopulation of B1 cells. After 7 days of the immune response, IgM⁺ and CD5⁺ cells do not correlate, which shows their functional difference. The increase in CD5⁺ cells is probably not associated with B cells, but with T cells differentiating under the influence of the virus.

Conclusions. A subset of B1 cells is the primary target of cattle leukemia virus. The 65th day of the immune response is characterized by the expansion of IgM⁺ B cells, a decrease in the number of CD5⁺ cells and a uniform distribution of receptors around the perimeter of the cells.

Keywords: BLV; B cells; monoclonal antibodies; immunoglobulin M; immunoperoxidase staining; cell receptors.

For citation: Ezdakova I.Yu., Kapustina O.V., Gulyukin M.I., Stepanova T.V. Characterization of B1-cells during experimental leukomogenesis. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2020; 65(1): 35-40. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-35-40>

For correspondence: Irina Yu. Ezdakova, Doctor of Biological Sciences, Head Laboratory of Immunology, Federal Scientific Centre VIEV, Moscow, 109428, Russia. E-mail: ezdakova.i@viev.ru

Information about authors:

Ezdakova I.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8467-4920>

Kapustina O.V., <https://orcid.org/0000-0002-7382-8656>

Gulyukin M.I., <https://orcid.org/0000-0002-7489-6175>

Stepanova T.V., <https://orcid.org/0000-0001-9092-8045>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Contribution: the concept and design of the study – Gulyukin M.I., Ezdakova I.Yu.; collection and processing of material – Kapustina O.V., Ezdakova I.Yu., Stepanova T.V.; statistical processing – Ezdakova I.Yu.; writing a text – Ezdakova I.Yu. .

Received 23 January 2020

Accepted 29 January 2020

Введение

Вирус лейкоза крупного рогатого скота (BLV) – один из наиболее распространённых патогенов молочного скота. BLV передаётся горизонтально между животными при контакте с биологическими жидкостями, содержащими инфицированные клетки, особенно с кровью и молоком. Также инфицирование может быть связано с травмой, загрязнёнными хирургическими инструментами и насекомыми (гематофаги), которые служат механическими переносчиками вируса. Чаще всего передача происходит от матери к потомству при выпойке молозивом и молоком от коров с высокой вирусной нагрузкой. Приблизительно у 30% зараженного крупного рогатого скота (КРС) в итоге развивается стойкий лимфоцитоз (постоянно больше 7500 лимфоцитов в 1 мкл крови), который обычно не имеет очевидных клинических признаков. У 1–3% инфицированных животных развивается лимфосаркома в возрасте 4–8 лет.

Несмотря на низкую частоту развития клинических признаков у КРС, заражённого BLV, инфекция может привести к экономическим потерям в результате выбраковки высокопродуктивных молочных коров [1]. Лейкоз КРС снижает как долголетие животных, так и выработку молока, и может нарушать иммунный статус. При высокой распространённости BLV в молочных стадах важно понимать механизмы патогенеза, при которых вирус отрицательно влияет на иммунную систему заражённого животного [2]. Известно, что вирус вне клетки менее инфекционен, чем вирус, связанный с клетками крови, поскольку BLV использует межклеточные контакты для передачи информации между инфицированными клетками и неинфицированными клетками-мишенями, которыми являются В-клетки [3, 4]. Для выявления субклинического прогрессирования инфекции BLV более эффективно

определение относительного количества В-клеток, нежели абсолютного количества лимфоцитов [5].

Несмотря на большое количество исследований в данной области, многие механизмы адаптивного клеточного иммунного ответа до сих пор неизвестны [6, 7]. Процесс проникновения вируса в клетку пока до конца не ясен. Некоторые авторы полагают, что вирусные белки нарушают внутриклеточные сигнальные пути [8, 9]. Большинство известных в настоящее время поверхностных белков суперсемейства иммуноглобулинов, в том числе трансмембранный мономер молекулы иммуноглобулина М (IgM), являются рецепторами контактного взаимодействия клеток, которые трансформируют антигенные сигналы в определённые клеточные реакции. Связывание рецептора с его лигандом сопровождается не только изменением конфигурации поверхностного белка, но и его латеральной диффузией [10]. Топография поверхности В-клеток модулирует активацию сигнального пути. Липидные рафты играют важную роль в передаче сигнала В-клеткам, способствуя локализации В-клеточного антигенного рецептора (BCR), ограничению его подвижности и образованию сигнальных комплексов. BCR, распознавший антиген, вместе с белками главного комплекса гистосовместимости класса II кластеризуется и скрепляется актиновыми нитями со стороны цитоплазмы. В результате на мембране В-клетки могут собираться рецепторы в форме «ринг» (равномерное распределение в плоскости мембраны), «пэтч» (неравномерное распределение), «кэп» (скопление на одном из полюсов клетки) с последующим погружением в цитоплазму (эндоцитоз).

В проведённых ранее экспериментах установлено, что основной формой локализации Ig-рецепторов В-клеток крови КРС является «пэтч»/эндоцитоз (68,9%) [11]. Развитие этой популяции лимфоцитов

зависит от экспрессии рецептора В-клеток для антигена (BCR), сформированного из молекул IgM и CD79. Предшественники В-клеток могут впоследствии проходить продуктивную реаранжировку генов лёгких цепей, чтобы стать IgM⁺ В-клетками. В формировании рецептора В-клеток (BCR) принимают участие три компонента: мономер IgM и два полипептида – Igα, Igβ (CD79). В цитоплазме пре-В-клеток обнаруживается тяжёлая μ-цепь IgM. Наивная В-клетка на своей поверхности экспрессирует полные молекулы данного иммуноглобулина. Циркулирующая фолликулярная и экстра-фолликулярная В-клетки также несут на своей мембране IgM.

В настоящее время обсуждаются эксперименты, показавшие, что у популяции IgM⁺ В-клеток инфицированных животных изменяется механизм передачи сигналов и они приобретают устойчивость к апоптозу, что вызывает экспансию В-клеток. Связывание антигена В-клетками инициирует диффузию BCR в мембранные микродомены, обогащённые сфинголипидами и холестерином, называемые липидными рафтами. Липидные рафты включают представителей киназ семейства Src и исключают некоторые фосфатазы. Включение BCR в липидные рафты играет важную роль в регуляции ранних сигнальных событий и последующей интернализации антигена. Известно, что BLV вызывает значительную поликлональную экспансию CD5⁺, IgM⁺ В-лимфоцитов, известных как персистирующий лимфоцитоз приблизительно у 30% заражённого КРС [12]. Однако пока не ясно, что происходит с данной субпопуляцией В-клеток в ранний период инфицирования животных. Поэтому целью исследований была количественная характеристика субпопуляций IgM⁺ и CD5⁺-В-клеток в процессе иммунного ответа на заражение BLV, которая может дать важную информацию о механизмах прайминга лимфоцитов при инфицировании BLV.

Материал и методы

В эксперименте использовали BLV-отрицательных телят чёрно-пёстрой породы в возрасте 8 мес ($n = 11$). Вся работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с приказом Минздрава России от 19.06.2003 № 267 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации». Животным опытной группы ($n = 8$) внутривенно вводили кровь BLV-положительной коровы. Телятам контрольной группы ($n = 3$) вводили физиологический раствор. Исследования проводили до и после заражения на 5, 7, 14, 21, 28 и 65-е сутки иммунного ответа. Лимфоциты крови выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности Histopaque-1077 при 3000 об/мин в течение 45 мин. Концентрацию мононуклеарных клеток в суспензии доводили до $1,0-0,5 \cdot 10^6$ кл/мл. Количество В-лимфоцитов в крови определяли методом иммунопероксидазного окрашивания на основе моноклональных антител к IgM CD5.

Для удаления экзогенных иммуноглобулинов 100 мкл взвеси мононуклеарных клеток крови обрабатывали 1% раствором лимонной кислоты

в течение 1 мин, центрифугировали 5-кратно в фосфатном буфере (pH 7,2) при 1100 об/мин по 5 мин. Взвесь клеток фиксировали этанолом на предметном стекле. Блокаду пероксидазы проводили 1% раствором перекиси водорода в течение 10 мин. В качестве блокирующего раствора использовали 10% раствор сыворотки крови лошади. Инкубировали 60 мин при комнатной температуре и тщательно отмывали клетки фосфатным буфером (pH 7,2). К фиксированным клеткам добавляли моноклональные антитела к IgM рогатого скота (1 : 400). Затем добавляли антивидовой конъюгат в рабочем разведении (1 : 1500). Для визуализации комплекса антиген/антитело использовали 3-амино-9-этилкарбазол (АЕС; Sigma, США). АЕС-позитивные клетки идентифицировали по красно-коричневому окрашиванию при просмотре препаратов под микроскопом ($\times 1000$). Статистическую обработку выполняли с использованием стандартных программ SPSS – Statistical package for the social sciences. Уровень значимости вариационных рядов оценивали с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента.

Результаты

В результате проведённых исследований установлено, что корреляционная связь показателей субпопуляций В-клеток с фенотипом IgM⁺ и CD5⁺ имеет среднюю степень сопряжённости ($r = 0,61$). Это показывает относительную независимость данных субпопуляций.

Как видно на рис. 1, уровень CD5⁺ В-клеток повышается на 14-е сутки первичного иммунного ответа, характеризующегося поликлональной пролиферацией CD5⁺ В-клеток, которые являются первичной мишенью для BLV.

Поскольку большинство CD5⁺ В-клеток содержат провирус [13, 14], повышение их уровня усиливает передачу вируса через кровь от инфицированных к здоровым животным. Персистирующий лейкоцитоз также является предиктором позднего развития лимфомы, состоящей в основном из CD5⁺ В-клеток. Следовательно, повышение CD5⁺-субпопуляции имеет решающее значение для передачи и прогрессирования лейкомогенеза.

В предыдущих исследованиях было установлено, что к 7-м суткам иммунного ответа уровень IgM-специфических антител увеличивался, а это соответствует повышению относительного количества IgM⁺ CD5⁺ В-клеток [15]. После 7-х суток субпопуляционная характеристика первичного иммунного ответа изменяется. Уровень CD5⁺-лимфоцитов увеличивается, а относительное количество IgM⁺ В-клеток уменьшается, но к 65-м суткам опять возрастает. У КРС молекула CD5 конститутивно диссоциирует от мембранного IgM, что связано с защитой от апоптоза после передачи антигенного сигнала. Кроме того, экспериментальная диссоциация молекулы CD5 и BCR В-клеток у BLV-отрицательного КРС снижает BCR-стимулируемый апоптоз [16]. Возможно, что увеличение с 7-х суток иммунного ответа окрашенных анти-CD5⁺ антител

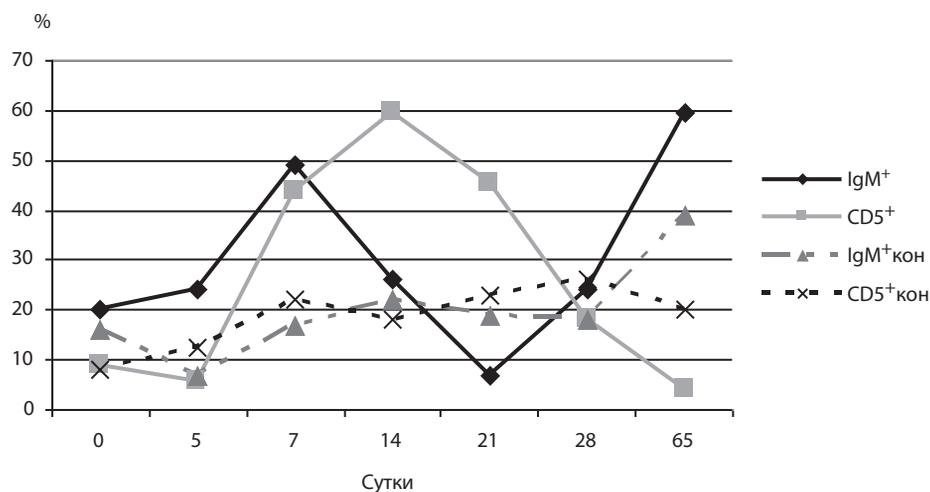
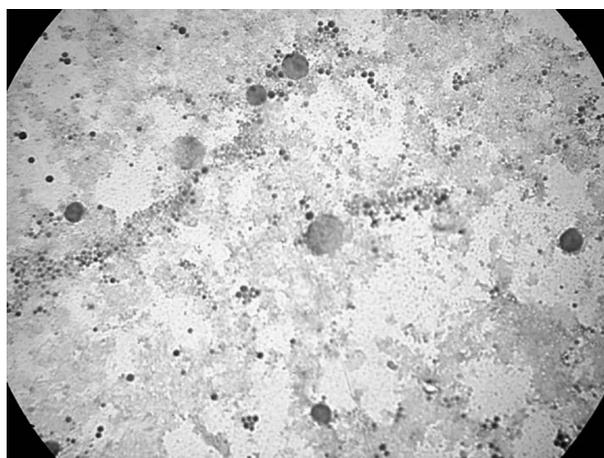


Рис. 1. Динамика количества IgM⁺ и CD5⁺ В-клеток.

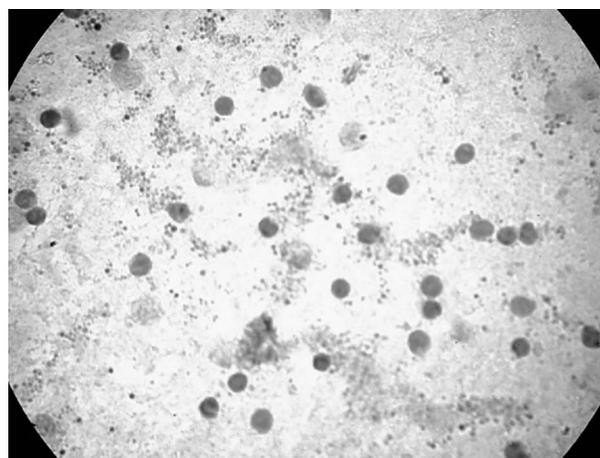
По оси абсцисс – сроки отбора проб крови у опытной и контрольной групп телят, сут; по оси ординат – относительное количество IgM⁺- и CD5⁺-клеток опытной и контрольной групп телят, %.

Fig. 1. Dynamics of the number of IgM⁺ and CD5⁺ B cells.

The abscissa shows the time (day) of blood sampling in the experimental and control groups of calves. The ordinate shows the relative number (%) of IgM⁺ and CD5⁺ cells of the experimental and control groups of calves.



а



б

Рис. 2. IgM⁺ В-клетки на 5-е (а) и 65-е (б) сутки после экспериментального заражения BLV.

Имунопероксидазное окрашивание, ×1000.

Fig. 2. IgM⁺ B cells on days 5 (a) and 65 (b) after experimental infection with BLV.

Immunoperoxidase staining, × 1000.

ми клеток не связано с В-клетками, а характеризует пролиферацию Т-клеток, так как молекула CD5 является дифференцировочным маркером Т-лимфоцитов.

На микрофотографиях (рис. 2) показано увеличение числа IgM⁺ В-клеток на 65-е сутки после заражения по сравнению с количеством этих клеток на 5-е сутки после введения BLV, что характерно для поликлональной экспансии IgM⁺ В-клеток при лейкозе КРС.

Недавние исследования показали, что ранняя регуляция ответа BCR на антиген, вероятно, контролируется путём проникновения BCR в специфические мембранные микродомены (липидные рафты). Липидные рафты концентрируют сигнальные молекулы

IgM, Iga и Igβ в непосредственной близости от ранних сигнальных киназ после стимуляции антигеном (кэппинг-эффект).

В незрелых и толерантных В-клетках с более высокой поверхностной экспрессией CD5 после стимуляции происходит исключение BCR из липидных рафтов. То же происходит при лейкомогенезе, когда вирус ограничивает транслокацию в мембране и интернализацию в цитоплазму В-клеточного рецептора, в который входит IgM.

Пространственная координация мономера IgM внутри липидных рафтов играет важную роль в регуляции сигнальных путей в клетке. В настоящее время

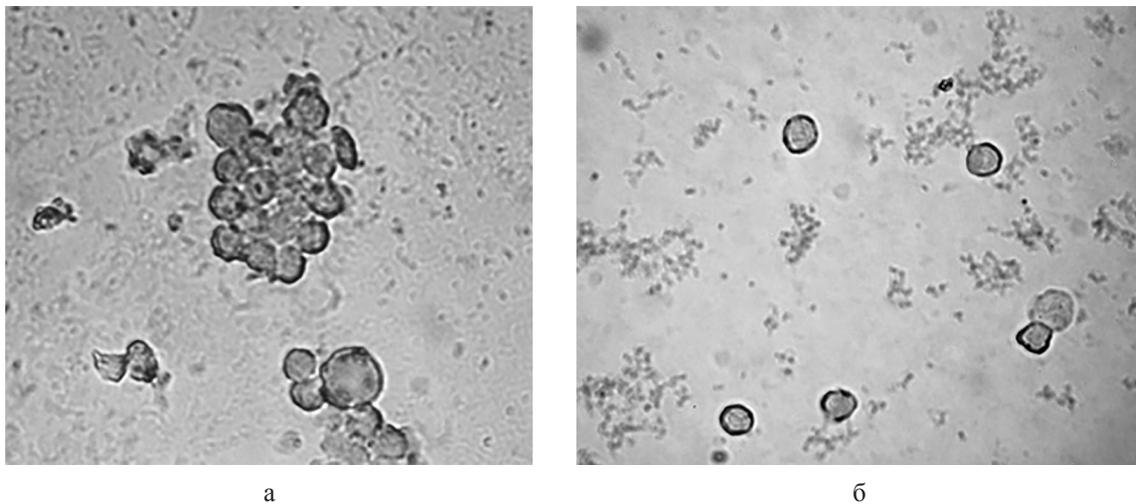


Рис. 3. IgM⁺ В-клетки (а) и CD5⁺-клетки (б) крови телят на 65-е сутки иммунного ответа. Иммунопероксидазное окрашивание, ×1000.

Fig. 3. IgM⁺B cells (a) and CD5⁺ blood cells (b) of calves on the 65th day of the immune response. Immunoperoxidase staining, × 1000.

обсуждается вопрос о том, что наблюдаемые различия в результатах передачи сигналов BCR в изменённых вирусом В-клетках КРС можно объяснить неспособностью В-клеток у КРС с персистирующим лимфоцитозом формировать плотную агрегацию IgM на плазматической мембране после стимуляции антигеном. Данные наших исследований подтверждают, что в лимфоцитах экспериментально заражённого КРС поверхностная агрегация молекул IgM и CD5 практически отсутствует (рис. 3). На микрофотографиях видно, что IgM⁺ В-клетки и CD5⁺-клетки окрашены по периметру в форме «ринг» без кэппинг-эффекта поверхностных рецепторов.

Обсуждение

Одним из отличительных признаков лейкомогенеза у животных является спонтанная пролиферация мононуклеарных клеток периферической крови, в основном В-лимфоцитов. Результаты наших исследований показали ассоциацию экспрессии поверхностных молекул IgM и CD5 в В-клетках крови экспериментально заражённых телят до 7-х суток иммунного ответа. Данные маркёры характерны для субпопуляции В1-клеток, которая является первичной мишенью для BLV. Эти лимфоциты предназначены для быстрого реагирования на наиболее распространённые антигены клеточных стенок бактерий в приборьерных полостях.

Естественные антитела, секретируемые В1-клетками, – это IgM и IgA, которые играют важную роль в противомикробной защите организма. Антитела, продуцируемые В1-лимфоцитами, преимущественно специфичны к тимуснезависимым антигенам. По нашему мнению, именно от этой субпопуляции В-клеток зависит волнообразный характер синтеза IgM, который был показан в предыдущих исследованиях. После 7-х суток иммунного ответа показатели IgM⁺- и CD5⁺-клеток не коррелируют, что показыва-

ет их функциональное различие. Возможно, увеличение числа CD5⁺-клеток связано не с В-клетками, а с дифференцирующимися под влиянием вируса Т-лимфоцитами [17, 18]. Для динамики IgM⁺ В-клеток характерно как повышение, так и уменьшение их числа в течение 2 мес наблюдения, что, вероятно, связано с влиянием вирусных белков на функциональную активность инфицированной клетки. Как было установлено, включение В-клеточного рецептора, составной частью которого является трансмембранный мономер IgM, в липидные рафты играет важную роль в регуляции сигналов и последующей интернализации антигена. Вирусные белки также могут влиять на процессы, происходящие в липидных рафтах [19]. Так, исключение BCR из липидных рафтов может частично объяснить различия в передаче сигналов, наблюдаемых между В-клетками BLV-инфицированного и BLV-отрицательного КРС. Наши результаты подтверждают эти исследования. Было показано, что через 2 мес после введения BLV рецепторы IgM и CD5 равномерно распределены по мембране клетки без образования «кэпов». Возможно, BLV, замедляя диффузию рецепторов в мембране клетки, таким образом блокирует апоптоз.

Выводы

1. Увеличение количества В-клеток с фенотипом IgM⁺/CD5⁺ в 1-е сутки иммунного ответа на введение BLV показывает, что субпопуляция В1-клеток является первичной мишенью BLV.

2. Повышение уровня CD5⁺-клеток на 14-е сутки иммунного ответа, вероятно, происходит за счёт Т-клеток в стадии дифференцировки.

3. Второй месяц иммунного ответа характеризуется экспансией IgM⁺ В-клеток, снижением числа CD5⁺-клеток и равномерным распределением рецепторов по периметру клеток.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-9, 12-14, 16-19)
 см. REFERENCES

10. Ездакова И.Ю., Капустина О.В., Попова Е.В. Модуляция Ig-рецепторов В-клеток крови крупного рогатого скота. *Морфология*. 2019; 156(6): 93-4.
 11. Попова Е.В., Ездакова И.Ю. Иммуноглобулиновые рецепторы В-лимфоцитов животных. *Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко*. 2015; 78: 199-206.
 15. 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): 173-7.
 DOI: <http://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-173-177>
- REFERENCES**
1. Bartlett P.C., Norby B., Byrem T.M., Parmelee A., Ledergerber J.T., Erskine R.J. Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds. *J. Dairy Sci.* 2013; 96(3): 1591-7.
 DOI: <http://doi.org/10.3168/jds.2012-5930>
 2. Frie M.C., Sporer K.R., Wallace J.C., Maes R.K., Sordillo L.M., Bartlett P.C., et al. Reduced humoral immunity and atypical cell-mediated immunity in response to vaccination in cows naturally infected with bovine leukemia virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2016; 182: 125-35.
 DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.10.013>
 3. Florins A., Boxus M., Vandermeers F., Verlaeten O., Bouzar A.B., Defoiche J., et al. Emphasis on cell turnover in two hosts infected by bovine leukemia virus: A rationale for host susceptibility to disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2008; 125(1-2): 1-7.
 DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.04.007>
 4. Brym P., Rušć A., Kamiński S. Evaluation of reference genes for qRT-PCR gene expression studies in whole blood samples from healthy and leukemia-virus infected cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2013; 153(3-4): 302-7.
 DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.03.004>
 5. Mayr B., Vogel I., Graninger W., Schlerka G., Wöckl F., Schlegler W. Circulating immune cells and immune complexes in peripheral blood of healthy and of bovine leukemia virus-infected cows and lymphosarcomatous calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1982; 3(5): 475-84.
 DOI: [http://doi.org/10.1016/0165-2427\(82\)90013-7](http://doi.org/10.1016/0165-2427(82)90013-7)
 6. Murakami K., Sentsui H., Inoshima Y., Inumaru S. Increase in gammadelta T cells in the blood of cattle persistently infected with bovine leukemia virus following administration of recombinant bovine IFN-gamma. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004; 101(1-2): 61-71.
 DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.04.016>
 7. Usui T., Konnai S., Ohashi K., Onuma M. Expression of tumor necrosis factor- α in IgM+ B-cells from bovine leukemia virus-infected lymphocytotic sheep. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006; 112(3-4): 296-301.
 DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.03.002>
 8. Frie M.C., Coussens P.M. Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2015; 163(3-4): 103-14.
 DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.11.014>
 9. Murakami K., Inumaru S., Yokoyama T., Okada K., Sentsui H. Expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor on B-1a cell from persistent lymphocytosis (PL) cows and lymphoma cell induced by bovine leukemia virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1999; 68(1): 49-59.
 DOI: [http://doi.org/10.1016/s0165-2427\(99\)00011-2](http://doi.org/10.1016/s0165-2427(99)00011-2)
 10. Ezbekova I.Yu., Kapustina O.V., Popova E.V. Modulation of bovine B-cell Ig receptors. *Morfologiya*. 2019; 156(6): 93-4. (in Russian)
 11. Popova E.V., Ezbekova I.Yu. Immunoglobulin receptors of animal B-lymphocytes. *Trudy Vserossiyskogo NII eksperimental'noy veterinarii im. Ya.R. Kovalenko*. 2015; 78: 199-206. (in Russian)
 12. Murakami H., Todaka H., Uchiyama J., Sato R., Sogawa K., Sakaguchi M., et al. A point mutation to the long terminal repeat of bovine leukemia virus related to viral productivity and transmissibility. *Virology*. 2019; 537: 45-52.
 DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virol.2019.08.015>
 13. Mirsky M.L., Olmstead C.A., Da Y., Lewin H.A. The prevalence of proviral bovine leukemia virus in peripheral blood mononuclear cells at two subclinical stages infection. *J. Virol.* 1996; 70(4): 2178-83.
 14. Juliarena M.A., Barrios C.N., Ceriani C.M., Esteban E.N. Hot topic: Bovine leukemia virus (BLV)-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. *J. Dairy Sci.* 2016; 99(6): 4586-9.
 DOI: <http://doi.org/10.3168/jds.2015-10480>
 15. Gulyukin M.I., Kapustina O.V., Ezbekova I.Yu., Val'tsiferova 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*. 2019; 64(4): 173-7.
 DOI: <http://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-173-177> (in Russian)
 16. Cantor C.H., Pritchard S.M., Dequiedt F., Willems I., Kettmann R., Davis W.C. CD5 is dissociated from the B-cell receptor in B cells from BLV-infected, PL cattle: consequences to B-cell receptor-mediated apoptosis. *J. Virol.* 2001; 75(4): 1689-96.
 DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.75.4.1689-1696.2001>
 17. Gillet N., Florins A., Boxus M., Burteau C., Nigro A., Vandermeers F., et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by BLV: prospects for novel anti-retroviral therapies in human. *Retrovirology*. 2007; 4: 18.
 DOI: <http://doi.org/10.1186/1742-4690-4-18>
 18. Suzuki S., Konnai S., Okagawa T., Ikebuchi R., Nishimori A., Kohara J., et al. Increased expression of the regulatory T cell-associated marker CTLA-4 in bovine leukemia virus infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2015; 163(3-4): 115-24.
 DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.10.006>
 19. Hamilton V.T., Stone D.M., Cantor G.H. Translocation of the B cell receptor to lipid rafts is inhibited in B cells from BLV-infected, persistent lymphocytosis cattle. *Virology*. 2003; 315(1): 135-47.
 DOI: [http://doi.org/10.1016/s0042-6822\(03\)00522-1](http://doi.org/10.1016/s0042-6822(03)00522-1)



Сравнительная молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса бешенства (*Rabies lyssavirus*, *Lyssavirus*, *Rhabdoviridae*), циркулировавших на территории Российской Федерации в период с 1985 по 2016 год

Зайкова О.Н.^{1,2}, Гребенникова Т.В.^{1,2}, Лосич М.А.¹, Елаков А.Л.¹, Гулюкин А.М.³, Метлин А.Е.⁴

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

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

³ ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.П. Коваленко Российской академии наук», 109428, г. Москва, Россия;

⁴ ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов», 123022, г. Москва, Россия

Бешенство – древнейшая инфекция, вызываемая нейротропным вирусом рода *Lyssavirus*, семейства *Rhabdoviridae*, который поражает всех теплокровных позвоночных. Гомология последовательностей аминокислот нуклеопротеина среди лиссавирусов 78–93%.

Целью данного исследования было изучение генетического разнообразия и молекулярной эпидемиологии лиссавирусов, циркулировавших на территории РФ с 1985 по 2016 г.

Материал и методы. Исследовано 54 изолята вируса бешенства, выделенных от животных, 2 изолята, выделенных от людей, и 4 вакцинных штамма вируса бешенства: RV-97, ERA, Shchelkovo 51, ERAG333. Филогенетический анализ проводили с использованием данных GenBank о фрагментах геномов 73 изолятов вируса бешенства и 9 изолятов EBLV-1. Для исследования использовали программы DNASTAR V.3.12, Bio Edit 7.0.4.1 и MEGA v. 10.0.5, Primer Premier 5.

Результаты. Сравнительный молекулярно-генетический анализ фрагментов геномов 130 лиссавирусов, выделенных на территории РФ и Украины, а также вакцинных штаммов вируса бешенства показал их распределение по географическому признаку. Сравнение фрагментов нуклеопротеина изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории РФ и Украины, с вакцинными штаммами выявило 4 маркерных мутации: V56I (для Евразийской группы), LV95W (для Центральной группы), D101N/S/T, N/G106D. Филогенетический анализ изолята «Julii», выделенного в 1985 г. от человека, укушенного летучей мышью, и опisanного М.А. Селимовым и С.В. Грибенча, доказал его принадлежность к европейскому лиссавирусу летучих мышей (подгруппе 1a).

Обсуждение. Изучение молекулярной эпидемиологии бешенства в пределах РФ позволяет проводить генотипирование вируса (распределение по группам, выявление маркерных мутаций, генотипирование изолята «Julii»). Это помогает изучать скрытые механизмы рабической инфекции в популяции животных и человека, а также характеризовать вакцинные штаммы, в том числе при оральной вакцинации.

Заключение. Необходимо дальнейшее изучение молекулярной эпидемиологии бешенства в пределах РФ и граничащих с ней стран.

Ключевые слова: бешенство; лиссавирусы; филогенетический анализ; секвенирование; эпизоотический процесс.

Для цитирования: Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Лосич М.А., Елаков А.Л., Гулюкин А.М., Метлин А.Е. Сравнительная молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса бешенства (*Rabies lyssavirus*, *Lyssavirus*, *Rhabdoviridae*), циркулировавших на территории Российской Федерации в период с 1985 по 2016 год. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(1): 41-48.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-41-48>

Для корреспонденции: Зайкова Ольга Николаевна, науч. сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», мл. науч. сотрудник ФГАОУ ВО «РUDН», 117198, г. Москва.

E-mail: zaykova_o_n@mail.ru

Финансирование. Публикация подготовлена при поддержке Программы «5-100» ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования – Гребенникова Т.В.; сбор и обработка материалов – Зайкова О.Н., Гулюкин А.М., Елаков А.Л.; статистическая обработка – Зайкова О.Н.; написание текста – Зайкова О.Н., Лосич М.А.; редактирование – Гребенникова Т.В., Гулюкин А.М., Метлин А.Е.

Поступила 19.01.20

Принята в печать 29.01.20

Comparative molecular and genetic characterization of rabies viruses (*Rabies lyssavirus*, *Lyssavirus*, *Rhabdoviridae*) circulated in the Russian Federation in 1985–2016

Zaykova O.N.^{1,2}, Grebennikova T.V.^{1,2}, Losich M.A.¹, Elakov A.L.¹, Gulyukin A.M.³, Metlin A.E.⁴

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

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

³ All-Russian Scientific and Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 109428, Russia;

⁴ All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed, Moscow, 123022, Russia

Introduction. Rabies caused by the neurotropic virus of the genus *Lyssavirus*, *Rhabdoviridae* family, which infects all warm-blooded vertebrates including human beings. The homology level of the amino acid sequences for *Lyssaviruses* nucleoprotein reaches 78–93%.

Aim – study the genetic diversity and molecular epidemiology of *Lyssaviruses* circulated in the Russian Federation in 1985–2016.

Material and methods. 54 isolates of rabies virus isolated from animals, and 2 isolates from humans, 4 vaccine strains of rabies virus: RV-97, ERA, Shchelkovo 51, ERAG333 used in phylogenetic study. Phylogenetic analysis was performed using Genbank data on genome fragments of 73 rabies virus isolates and 9 EBLV-1 isolates. DNASTAR V.3.12, Bio Edit 7.0.4.1 and MEGA v.10.0.5, Primer Premier 5 programs have been used.

Results. Comparative molecular genetic analysis of genomes fragments of 130 *Lyssaviruses*, isolated on the territory of the RF, Ukraine in 1985–2016, vaccine strains of rabies virus, showed their distribution by geographical feature. Comparison of the nucleoprotein fragments of the rabies virus isolates with vaccine strains revealed 4 marker mutations: V56I (Eurasian group), L/V95W (Central group), D101N/S/T, and N/G106D. Phylogenetic analysis of the isolate «Juli», isolated from a human bitten by a bat proved his belonging to the European Bat *lyssavirus*-1a.

Discussion. Study of the molecular epidemiology of rabies within the Russian Federation allows for the genotyping of the viruses and helps to study the hidden mechanisms of rabies infection in animal and human populations, and to characterize vaccine strains, including during oral vaccination.

Conclusion. Further study of the molecular epidemiology of rabies within the Russian Federation and the countries bordering it is important.

Keywords: rabies; *lyssaviruses*; phylogenetic analysis; sequencing; epizootic process.

For citation: Zaykova O.N., Grebennikova T.V., Losich M.A., Elakov A.L., Gulyukin A.M., Metlin A.E. Comparative molecular and genetic characterization of rabies viruses (*Rabies lyssavirus*, *Lyssavirus*, *Rhabdoviridae*) circulated in the Russian Federation in 1985–2016. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2020; 65(1): 41–48. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-41-48>

For correspondence: Olga N. Zaykova, Researcher at the Laboratory of Molecular Diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia; Junior Researcher at the Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 117198, Russia. E-mail: zaykova_o_n@mail.ru

Information about authors:

Zaykova O.N., <http://orcid.org/0000-0003-4708-2069>

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

Losich M.A., <http://orcid.org/0000-0002-5618-1918>

Elakov A.L., <http://orcid.org/0000-0001-5798-6518>

Gulyukin A.M., <https://orcid.org/0000-0003-2160-4770>

Metlin A.E., <https://orcid.org/0000-0002-4283-0171>

Acknowledgments. The publication was prepared with the support of the « Peoples' Friendship University Program 5-100».

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

Contribution: research concept and design – Grebennikova T.V.; collection and processing of materials – Zaykova O.N., Gulyukin A.M., Elakov A.L.; statistical processing – Zaykova O.N.; spelling text – Zaykova O.N., Losich M.A.; editing – Grebennikova T.V., Gulyukin A.M., Metlin A.E.

Received 19 January 2020

Accepted 29 January 2020

Введение

Бешенство – одна из древнейших инфекций, возбудителем которой является нейротропный вирус рода *Lyssavirus*, семейства *Rhabdoviridae*. Вирус классического бешенства (*Rabies virus*) поражает всех теплокровных позвоночных. Геном вируса бешенства представлен молекулой РНК отрицательной полярности и имеет 5 открытых рамок считывания, располагающихся в геноме в следующем порядке: 3'-N-P-M-G-L-5' [1–3].

По данным Международного комитета по таксономии вирусов, род *Lyssavirus* в настоящее время насчи-

тывает 16 видов, переносчиками для 13 видов могут являться рукокрылые млекопитающие, 7 видов лиссавирусов были обнаружены у людей (*Rabies virus*, *European bat lyssavirus-1*, *European bat lyssavirus-2*, *Irkut lyssavirus*, *Duvenhage lyssavirus*, *Australian bat lyssavirus*, *Mokola lyssavirus*). Уровень гомологии последовательностей аминокислот нуклеопротеина среди лиссавирусов достигает 78–93%, что имеет важное значение при генотипировании [4–7].

Изучая изоляты вируса бешенства, выделенные на территории бывшего СССР, И.В. Кузьмин и соавт. раз-

делили их на несколько групп: А, В, С, D, UG. Позднее С.А. Чупин и соавт. предложили описать группы как Евразийскую, Северную Европейскую, Центральную Российскую и Кавказскую. Топология филогенетических дендрограмм предложенных классификаций совпадает [7–10].

Так, при исследовании фрагментов геномов изолятов из Республики Саха (Якутия), Аляски (США), Республики Коми в работе С.А. Чупина и соавт. было установлено, что эти изоляты относятся к Арктической группе, подгруппе Арктическая-2. За 20 лет на данном участке генома эта линия вируса, предком которой, предположительно, является штамм SG23, выделенный от песца в 1988 г., не претерпела изменений. В дальнейшем при более тщательных исследованиях молекулярной структуры гена N этого штамма установлена скорость фиксации замен: $1,4 \times 10^{-4}$ замен на сайт в год [7].

Бешенство широко распространено в мире, за исключением островных государств, осуществляющих строгие карантинные и профилактические мероприятия. Резервуаром и источником инфекции в природных очагах являются преимущественно дикие плотоядные, а в антропоургических очагах – обычно собаки и кошки. В свою очередь, бешенство собак является источником 99% случаев заражения человека и представляет потенциальную угрозу более чем для 3,3 млрд человек. В последнее время возросла роль кошки как потенциального звена в передаче вируса бешенства. В мире ежегодно от бешенства умирают 59 тыс. человек в более чем 150 странах. Наиболее распространено бешенство в странах Азии и Африки (95%) [11–14].

Основу профилактики распространения бешенства составляют оральная иммунизация диких плотоядных, вакцинация домашних и бродячих животных. Известно, что штаммы вируса бешенства, используемые для создания оральных вакцин, могут быть остаточными вирулентными по отношению к некоторым видам животных, поэтому важным этапом контроля антирабических мероприятий должен быть сравнительный молекулярно-генетический анализ штаммов вируса бешенства, используемых при создании оральных вакцин, и изолятов, выделенных на территориях, где проводят оральную иммунизацию [15–19].

Изучение молекулярной эпидемиологии бешенства позволяет охарактеризовать популяции вируса, циркулирующие на территории РФ [20].

Цель данного исследования – изучение генетического разнообразия и молекулярной эпидемиологии лиссавирусов, циркулирующих на территории РФ с 1985 по 2016 г.

Материал и методы

Исследуемые образцы. Было исследовано 54 изолята вируса бешенства, выделенных от животных:

- отстрелянных после проведения программы по оральной вакцинации в Брянской и Кировской областях, в том числе 13 изолятов, выделенных от лис, и два – от енота и енотовидной собаки соответственно;

- 39 изолятов, предоставленных лабораторией ФГБУ «ВНИИЗЖ» (г. Владимир, Россия) при поддержке лаборатории эпизоотологии ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, выделенных в Центральном и Приволжском федеральных округах от енотовидной собаки ($n = 7$), собаки ($n = 9$), кошки ($n = 1$), лисы ($n = 18$) и КРС ($n = 4$).

Два изолята: «Shuv» (2002 г., Центральная часть России) и «Juli» (1985 г., Белгород, Россия), выделенных от людей, были получены из коллекции НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского. Ранее они были описаны в работе С.В. Грибенча и соавт. [6] и в обзоре А.Д. Ботвинкина со ссылкой на исследования М.А. Селимова [8].

Для выравнивания нуклеотидных последовательностей и построения филогенетических деревьев использовали первичную структуру фрагментов геномов 73 лиссавирусов, содержащихся в базе данных GenBank (43 изолята выделены от лис, четыре – от собак, один – от енотовидной собаки, восемь – от крупного рогатого скота, четыре – от кошки, один – от барсука, пять – от волка, три – от человека, один – от верблюда, два – от песца, один – от лошади), а также 9 изолятов EBLV-1.

Для молекулярно-генетического анализа также использовали первичную структуру фрагментов геномов вакцинных штаммов: RV-97, ERA, Щёлково 51, ERA G333.

Контроли при проведении МФА и ОТ-ПЦР использовали в соответствии с методикой [21] и ГОСТ 26075-2013.

Специфические олигонуклеотиды. Нуклеотидные последовательности праймеров, фланкирующих фрагмент гена N, были взяты из работы Р. Heaton и соавт., 1997 г. [22], или разработаны в лаборатории (см. таблицу).

Приготовление препаратов. Для подтверждения наличия вируса бешенства в нативных образцах использовали МФА, согласно ГОСТ 26075-2013. Окрашенные препараты просматривали в поле зрения люминесцентного инвертированного микроскопа «Olympus CKX41» (Япония) при увеличении $\times 20$.

Выделение РНК. РНК выделяли из 200 мкл 10% суспензии мозга с применением коммерческого препарата TRI Reagent® (Sigma Aldrich, США) по методике, рекомендованной производителем.

Проведение ОТ-ПЦР. Первым этапом было получение кДНК из РНК, затем проводили ПЦР. Объём реакционной смеси в нашей модификации составил 40 мкл, вносили 10 мкл кДНК. Учёт реакции проводили методом горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле.

Секвенирование ПЦР-фрагментов. Образцы очищали из агарозного геля с помощью набора Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (Fermentas, США) согласно инструкции производителя и секвенировали. Реакцию проводили на амплификаторе Mastercycler Gradient (Eppendorf, Германия) с применением BigDye® Terminator v 3.1 Ready Reaction kit (Applied Biosystems, США), затем продукты амплификации пересаждали для последующего секвенирования с использованием автоматического секвенатора Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer (США).

Олигонуклеотиды, фланкирующие фрагмент гена N вируса бешенства, используемые в исследовании
The nucleotide sequences of the primers flanking the N gene fragment of the Rabies virus using in this study

Источник Reference	Праймер Primer	Последовательность Sequence	Позиция в геноме Genome position
P. Heaton и соавт. [22]	JW12	5'-ATGTAACACC(C/T)CTACAATTG-3'	55–73
P. Heaton, et al. [22]	JW6 (DPL)	5'-CAATTCGCACACATTTTGTG-3'	660–641
	JW6 (E)	5'-CAGTTGGCACACATCTTGTG-3'	660–641
	JW6 (M)	5'-CAGTTAGCGCACATCTTATG-3'	660–641
	Разработаны в лаборатории Developed in the laboratory	F2	5'-TAACACC(C/T)CTACAATGGA-3'
	R1	3'-TACACACGTTAACCCTCATG-5'	647–666

Компьютерный анализ. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей и построения филогенетических деревьев применяли пакет программ DNASTAR V.3.12 (Lasergen Inc., США) и программы Bio Edit 7.0.4.1 [23], MEGA v.10.0.5 [24]; для подбора специфических олигонуклеотидов пользовались программным обеспечением Primer Premier 5 (Premier Biosoft int., США) [25].

Результаты

Проверка изолятов, выделенных от животных и человека, методами МФА и ПЦР выявила вирус бешенства и фрагменты его генома.

Далее сравнивали нуклеотидные и аминокислотные последовательности полученных фрагментов с использованием ранее полученных данных [26–28] и базы данных GenBank.

Сравнение полученных фрагментов нуклеопротеина изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории РФ и Украины, с вакцинными штаммами выявило 4 маркерных позиции: V56I, L/V95W, D101N/S/T, N/G106D. Размер исследуемого участка фрагмента гена N составил 439 нуклеотидных остатков (н.о., положение в гене 100–538 н.о.), кодирующих порядка 146 аминокислот.

Так, абсолютное большинство изолятов из республик Алтай, Хакасия, из Красноярска, Омска, республик Тыва и Бурятия имеют в 56-й позиции аминокислоту изолейцин вместо валина. Изоляты из Центральной части России (Центральной группы вирусов), а именно из Московской, Нижегородской, Владимирской, Тверской и Ярославской областей, в 95-й позиции содержат аминокислоту триптофан, как и изолят «Shuv».

Филогенетический анализ изолятов вируса бешенства, циркулировавших на территории РФ (рис. 1), показал, что «Shuv» относится к Центральной группе вирусов бешенства и по молекулярной структуре близок к изолятам из г. Владимир, Собинского района Владимирской области и Москвы. Все изоляты Центральной группы в 95-й позиции имеют аминокислоту триптофан. Изолят из Украины Rvu 09-06 по молекулярной структуре ближе к изолятам Евразийской группы.

Изоляты Центральной группы вирусов в позиции 101 имеют аспарагиновую аминокислоту, в то время как изоляты Евразийской группы вирусов в дан-

ной позиции могут содержать различные аминокислоты и подразделяются на 2 группы. Первую группу образуют изоляты из республик Алтай и Хакасия, из Красноярска, Омска, Республики Тыва, из Тулы и Кировской области. В 101-й позиции они содержат аминокислоту аспарагин либо серин. К 2-й группе относятся изоляты из Белгорода, Брянской и Нижегородской областей, а также один украинской изолят 09-06_Ukraine, содержащие в 101-й позиции аминокислоту треонин.

Изоляты Центральной группы в 106-й позиции имеют аминокислоту глицин, остальные изоляты, в том числе 4 изолята из Тверской и Владимирской областей, в данной позиции содержат аспарагиновую кислоту.

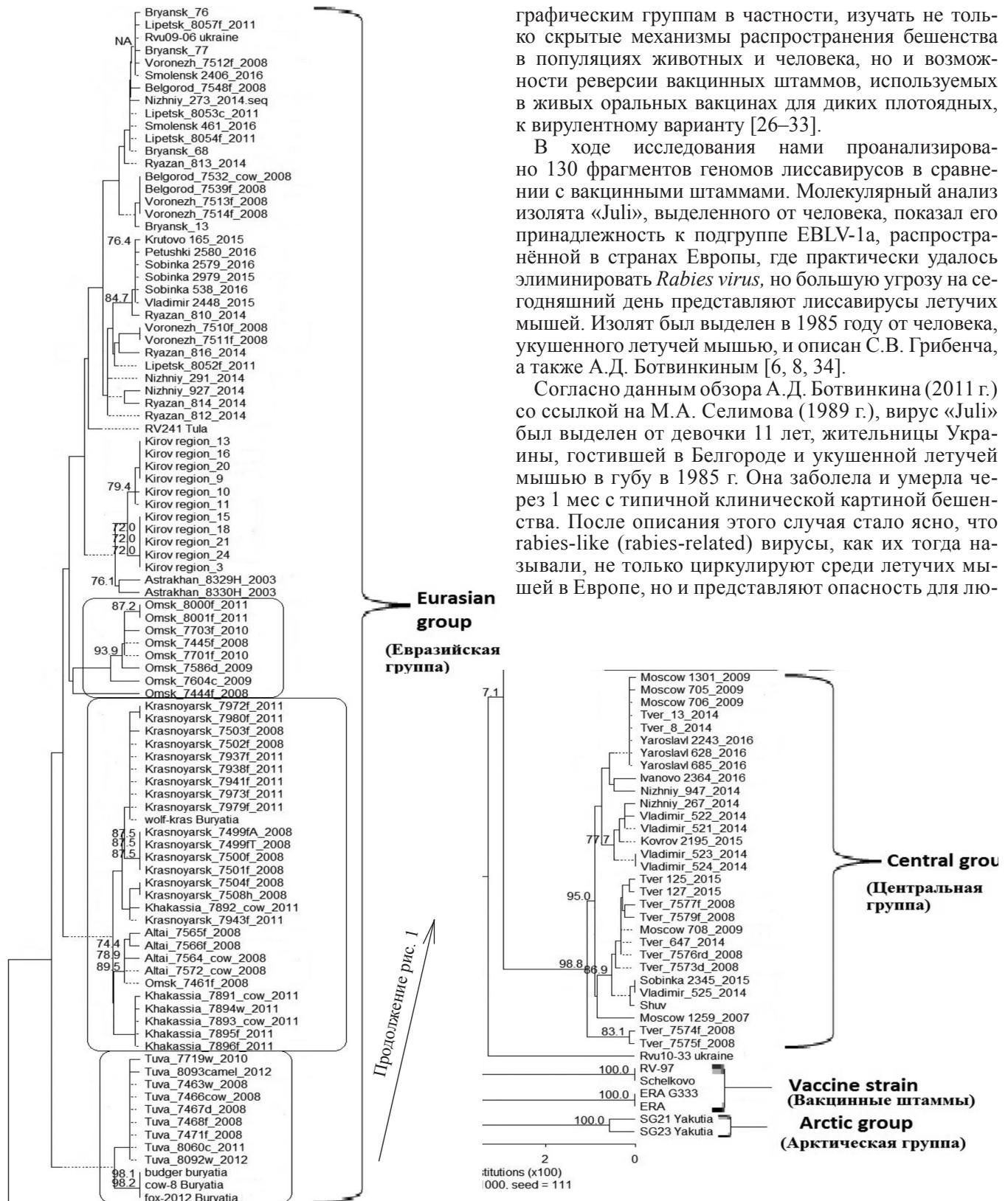
Изоляты Евразийской группы из республик Алтай и Хакасия, из Красноярска, Омска, республик Тыва и Бурятия образуют на филогенетической дендрограмме несколько подгрупп: Омская, группа Красноярск–Хакасия–Алтай, куда входит один изолят из Республики Бурятия и один из Омска, и группа Тыва–Бурятия (см. рис. 1). В целом внутри каждой группы по молекулярной структуре данного фрагмента генома изоляты между собой различаются примерно на 0–2%.

При исследовании изолята «Juli» было установлено, что он относится к европейскому лиссавирусу летучих мышей 1 (EBLV-1). Размер исследуемого фрагмента гена N составил 486 н.о. (положение в гене 100–585), кодирующих 161 аминокислоту. Филогенетический анализ (рис. 2) изолята «Juli» и 9 изолятов EBLV-1 показал, что данный изолят, вероятно, можно отнести к подгруппе EBLV-1a. По молекулярной структуре на заданном участке генома он отличается от других представителей этой подгруппы в 158-й позиции, где содержит аминокислоту лизин вместо аргинина. При этом изоляты подгруппы EBLV-1b имеют 2 маркерных позиции: R8K и H102N, отличающие их от представителей EBLV-1a.

Филогенетический анализ указывает на то, что выделенный в 1968 г. изолят NC 009527 может быть общим предком изолята «Juli» и изолятов, выделенных во Франции в 2003–2008 гг., относящихся к подгруппе EBLV-1a.

Обсуждение

Сравнительно низкая скорость изменчивости молекулярной структуры нуклеопротеина позволяет типировать лиссавирусы и вирус бешенства по гео-



графическим группам в частности, изучать не только скрытые механизмы распространения бешенства в популяциях животных и человека, но и возможности реверсии вакцинных штаммов, используемых в живых оральных вакцинах для диких плотоядных, к вирулентному варианту [26–33].

В ходе исследования нами проанализировано 130 фрагментов геномов лиссавирусов в сравнении с вакцинными штаммами. Молекулярный анализ изолята «Juli», выделенного от человека, показал его принадлежность к подгруппе EBLV-1a, распространённой в странах Европы, где практически удалось элиминировать *Rabies virus*, но большую угрозу на сегодняшний день представляют лиссавирусы летучих мышей. Изолят был выделен в 1985 году от человека, укушенного летучей мышью, и описан С.В. Грибенча, а также А.Д. Ботвинкиным [6, 8, 34].

Согласно данным обзора А.Д. Ботвинкина (2011 г.) со ссылкой на М.А. Селимова (1989 г.), вирус «Juli» был выделен от девочки 11 лет, жительницы Украины, гостившей в Белгороде и укушенной летучей мышью в губу в 1985 г. Она заболела и умерла через 1 мес с типичной клинической картиной бешенства. После описания этого случая стало ясно, что rabies-like (rabies-related) вирусы, как их тогда называли, не только циркулируют среди летучих мышей в Европе, но и представляют опасность для лю-

Рис. 1. Филогенетическая дендрограмма, построенная на основании данных о первичной структуре гена N с помощью MegAlign 7.1.0.
Fig. 1. Phylogenetic tree obtained from the primary structure of the based on partial sequences of N gene fragment of rabies virus isolates with MegAlign 7.1.0

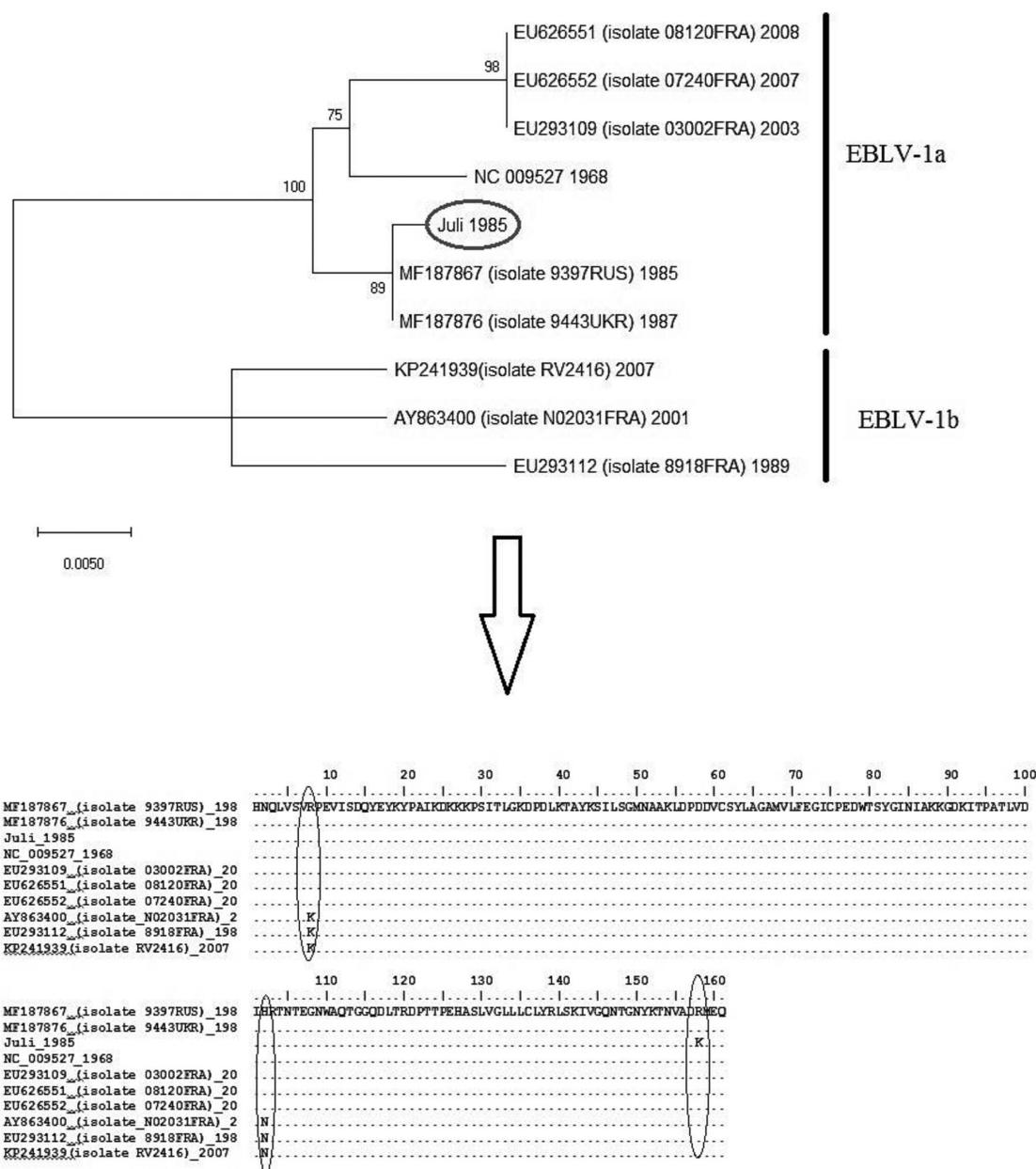


Рис. 2. Филогенетическая дендрограмма изолятов EBLV-1, полученная на основании данных о фрагменте гена N с помощью MEGA v. 10.0.5, и сравнение фрагментов нуклеопротеина EBLV-1.

Fig. 2. Phylogenetic tree obtained from the primary structure of the N gene fragment of EBLV-1 isolates with MEGA v. 10.0.5 and fragment comparison of nucleoprotein of EBLV-1

дей. Ранее был известен только один такой случай в Африке [8]. Интересно, что изучаемый нами изолят «Juli» попадает в одни и те же временные рамки с изолятами 9397RUS (1985 г.) и 9443UKR (1987 г.), которые описаны в работе С. Troupin и соавт. (2017 г.) [35].

Однако при изучении молекулярной структуры фрагментов нуклеопротеина выявлена одна аминокислотная замена, отличающая изолят «Juli» от других представителей EBLV-1. Наличие замены на сравнительно коротком участке (161 а.о.) может свидетельствовать либо о том, что ранее охарактер-

изованный изолят 9397RUS (1985 г.) или 9443UKR (1987 г.) претерпел изменения в серии пассажей через мозг белых мышей, либо о том, что молекулярная структура фрагмента генома вируса «Juli» описана нами впервые в рамках данной работы.

Ранее неоднократно было показано распределение вирусов бешенства, циркулирующих на территории РФ и сопредельных стран, на 6 групп [7, 30, 31]:

А. Арктическая: север Красноярского края, север Республики Саха (Якутия), Республика Коми, Земля Франца-Иосифа, Аляска, северная часть Канады, Гренландия.

В. Арктически-подобная: Хабаровский край, Читинская область, Приморский край, Маньчжурия (Китайская Народная Республика, КНР).

С. Степная (Евразийская): Белгородская, Тульская, Волгоградская, Оренбургская, Пензенская, Воронежская, Липецкая, Нижегородская, Новосибирская, Астраханская, Омская области, республики Тыва, Дагестан и Башкортостан, Алтайский, Краснодарский и Красноярский края, Украина, Республика Казахстан, Монголия, провинция КНР Внутренняя Монголия и Синьцзян-Уйгурский автономный район КНР.

Д. Центральная (Центрально-российская): Московская, Владимирская, Тверская, Тульская, Рязанская, Нижегородская области, Венгрия.

Е. Северо-восточно-европейская: Псковская, Новгородская, Брянская, Ленинградская области, Эстония, Финляндия, Литва, Словакия, Польша, Германия, Украина.

Ф. Кавказская: Республика Дагестан, Краснодарский край, Грузия, Азербайджанская Республика, Ирак, Иран.

Было отмечено, что эпизоотии бешенства циклически, носят сезонный характер и связаны с ареалом обитания и миграциями основных переносчиков возбудителя. Из представленной классификации видно, что некоторые области повторяются в разных группах, это можно проследить и при молекулярном анализе изолятов, выделенных в различных регионах. Так, ранее было показано, что изоляты из Московской, Тверской, Владимирской и Нижегородской областей образуют кластер и их молекулярная структура соответствует Центральной группе вирусов [28].

Изоляты из республик Тыва и Бурятия образуют подгруппу; вероятно, это объясняется тем, что данные регионы граничат друг с другом. Так же можно объяснить образование подгруппы Красноярск–Алтай–Хакасия, в которую, кроме того, попали изолят из Республики Бурятия и изолят из Омска. Однако большинство представленных изолятов из Омска образовали подгруппу, своим расположением указывая в направлении изолятов Центральной части России, входящих в Степную (Евразийскую) группу вирусов на дендрограмме.

Евразийская (Степная) группа – наиболее широко представленная группа вирусов, она имеет несколько ответвлений на филогенетической дендрограмме. Подобное наблюдение филогенетического и территориального распределения вирусов, особенности молекулярной структуры гена N лиссавирусов даёт нам право предположить, что эпизоотия бешенства движется с северо- и юго-востока на запад и юго-запад, концентрируясь в центральной части РФ. А с ростом городов и с увеличением числа бродячих невакцинированных животных эпизоотии природного типа переходят в городскую среду.

Следует отметить, что один изолят из Украины (Rvu 09-06), выделенный от кошки, по молекулярной структуре близок к Степной группе вирусов бешенства, а другой (Rvu 10-33) ранее был отнесён к Северо-восточно-европейской группе [32]. Необходимо

отметить, что пусковым механизмом распространения рабической инфекции являются не только миграции природных резервуарных хозяев вируса бешенства, немаловажную роль может играть и увеличение в последнее время трансграничных передвижений людей со своими животными. Таким образом, необходим не только тщательный контроль со стороны ветеринарных служб, но и ответственный подход самих хозяев, выезжающих со своими питомцами за границу.

Заключение

Бешенство – это природно-очаговый зооантропоноз, и для борьбы со смертельной инфекцией необходимы координация ветеринарных и медицинских служб, исследования в области эпидемиологии, мониторинг антирабических антител после вакцинации против бешенства, просветительская работа с населением, контроль программ по оральной иммунизации диких плотоядных.

Результаты проведённых исследований говорят о необходимости дальнейшего мониторинга случаев бешенства на территории РФ методами молекулярного анализа.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3-5, 9, 10, 12, 13, 15-17, 19, 21-25, 32-35 см. REFERENCES)

1. В кн.: Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013.
2. Васильев Д.А., Луговцев В.Ю., ред. *Вирусы, вызывающие болезни обиче для многих видов сельскохозяйственных животных. Курс лекций по вирусологии. Часть вторая*. Ульяновск; 2004.
6. Грибенча С.В., Козлов А.Ю., Костина Л.В., Елаков А.Л., Лосич М.А., Цибецов В.В. и др. Получение моноклональных антител к нуклеопротеину вируса бешенства. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(5): 38-43.
7. Чупин С.А., Чернышова Е.В., Метлин А.Е. Генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Российской Федерации в период 2008-2011 гг. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(4): 44-9.
8. Ботвинкин А.Д. Смертельные случаи заболевания людей бешенством в Евразии после контактов с рукокрыльями. (Обзор литературы). *Plecotus et al.* 2011; (14): 75-86.
11. Всемирная организация здравоохранения. Available at: <http://www.who.int/ru>
14. Шабейкин А.А., Гулюкин А.М., Зайкова О.Н. Обзор эпизоотической ситуации по бешенству в Российской Федерации за период с 1991 по 2015 годы. *Ветеринария Кубани*. 2016; (4): 4-6.
18. Елаков А.Л., Уласов В.И., Баньковский Д.О., Сафонов Г.А. Изучение биологических свойств штамма ERA G333 вируса бешенства. *Ветеринария*. 2011; (2): 22-4.
20. Полещук Е.М., Сидоров Г.Н., Нашатырева Д.Н., Градобоева Е.А., Пакскина Н.Д., Попова И.В. *Бешенство в Российской Федерации: информационно-аналитический бюллетень*. Омск: КАН; 2019.
26. Елаков А.Л., Зайкова О.Н., Кочергин-Никитский К.С., Гребенникова Т.В., Алипер Т.И. Мониторинг бешенства у диких животных в Брянской области. *Ветеринария*. 2015; (1): 11-4.
27. Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Елаков А.Л., Кочергин-Никитский К.С., Алипер Т.И., Чучалин С.Ф. и др. Молекулярно-генетическая характеристика геномов полевых изолятов вируса бешенства, циркулирующих на территории Кировской области. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(4): 186-92. DOI: <http://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-4-186-192>
28. Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Гулюкин А.М., Шабейкин А.А., Полякова И.В., Метлин А.Е. Молекулярно-генетическая характеристика полевых изолятов вируса бешенства, выявленных на территории Владимирской, Московской, Тверской, Нижегородской и Рязанской областей. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(3): 101-8. DOI: <http://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-101-108>
29. Гулюкин А.М. Значимость современных методов лабораторной диагностики и идентификации возбудителя бешенства для иммунологического мониторинга данного зооноза. *Вопросы вирусологии*. 2014; 59(3): 5-10.

30. Поleshchuk E.M., Sidorov G.N., Gribencha S.V. Итоги изучения антигенного и генетического разнообразия вируса бешенства в популяциях наземных млекопитающих России. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(3): 9-16.
31. Ботвинкин А.Д., Кузьмин И.В., Хисматуллина Н.А. Итоги изучения антигенного разнообразия вируса бешенства на территории бывшего СССР. *Ветеринарная патология*. 2004; (3): 117-27.
- ### REFERENCES
- L'vov D.K., ed. *Virology Guide. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii. Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
 - Vasil'ev D.A., Lugovtsev V.Yu., ed. *Disease-Causing Viruses are Common to Many Types of Farm Animals. Course of Lectures on Virology. Part Two [Virusy, vyzyvayushchie bolezni obshchie dlya mnogikh vidov sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh. Kurs lektsiy po virusologii. Chast' vtoraya]*. Ul'yankovsk; 2004. (in Russian)
 - Cai L., Tao X., Liu Y., Zhang H., Gao L., Hu S., et al. Molecular characteristics and phylogenetic analysis of N gene of human derived rabies virus. *Biomed. Environ. Sci.* 2011; 24(4): 431-7. DOI: <http://doi.org/10.3967/0895-3988.2011.04.015>.
 - International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV. Available at: <http://www.ictvonline.org/>
 - Hayman D.T., Fooks A.R., Marston D.A., Garcia-R J.C. The global phylogeography of lyssaviruses – challenging the 'out of Africa' hypothesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(12): e0005266. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005266>
 - Gribencha S.V., Kozlov A.Yu., Kostina L.V., Elakov A.L., Losich M.A., Tsimbezov V.V., et al. Production of the monoclonal antibodies to the rabies virus nucleoprotein. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(5): 38-43. (in Russian)
 - Chupin S.A., Chernyshova E.V., Metlin A.E. Genetic characterization of the rabies virus field isolates detected in Russian Federation within the period 2008-2011. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(4): 44-9. (in Russian)
 - Botvinkin A.D. Fatal human cases of rabies in Eurasia after contacts with bats. (Review of the literature). *Plecotus et al.* 2011; (14): 75-86. (in Russian)
 - Kuzmin I.V., Orciari L.A., Arai Y.T., Smith J.S., Hanlon C.A., Kameoka Y., et al. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. *Virus Res.* 2003; 97(2): 65-79. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0168-1702\(03\)00217-X](http://doi.org/10.1016/S0168-1702(03)00217-X)
 - Botvinkin A.D., Poleschuk E.M., Kuzmin I.V., Borisova T.I., Gazaryan S.V., Yager P., et al. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9(12): 1623-5. DOI: <http://doi.org/10.3201/eid0912.030374>
 - World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/>
 - Shulpin M.I., Nazarov N.A., Chupin S.A., Korennoy F.I., Metlin A.Y., Mischenko A.V. Rabies surveillance in the Russian Federation. *Rev. Sci. Tech.* 2018; 37(2): 483-95. DOI: <http://doi.org/10.20506/rst.37.2.2817>
 - Hampson K., Coudeville L., Limbo T., Sambo M., Kieffer A., Atlan M., et al. Estimating the global burden of endemic canine rabies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(4): e0003709. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003709>
 - Shabeykin A.A., Gulyukin A.M., Zaykova O.N. Overview on epizootic situation on rabies in the Russian Federation for the period from 1991 to 2015. *Veterinariya Kubani*. 2016; (4): 4-6. (in Russian)
 - Fehlner-Gardiner C., Nardine-Davis S., Armstrong J., Muldoon F., Bachmann P., Wandeler A. ERA vaccine-derived cases of rabies in wildlife and domestic animals in Ontario, Canada, 1989 – 2004. *J. Wildl. Dis.* 2008; 44(1): 71-85. DOI: <http://doi.org/10.7589/0090-3558-44.1.71>
 - Müller T., Bätz H.J., Beckert A., Bunzenthall C., Cox J.H., Freuling C.M., et al. Analysis of vaccine-virus-associated rabies cases in red foxes (*Vulpes vulpes*) after oral rabies vaccination campaigns in Germany and Austria. *Arch. Virol.* 2009; 154(7): 1081-91. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00705-009-0408-7>
 - Forró B., Marton S., Kecskeméti S., Hornyák A., Bányai K. Vaccine-associated rabies in red fox. Hungary. *Vaccine*. 2019; 37(27): 3535-3538. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.05.014>
 - Elakov A.L., Ulasov V.I., Ban'kovskiy D.O., Safonov G.A. Studying of biological properties rabies virus strain ERA G333. *Veterinariya*. 2011; (2): 22-4. (in Russian)
 - Metlin A., Paulin L., Suomalain S., Neuvonen E., Rybakov S., Mikhailishin V., et al. Characterization of Russian rabies virus vaccine strain RV-97. *Virus Res.* 2008; 132(1-2): 242-7. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.11.016>
 - Poleschuk E.M., Sidorov G.N., Nashatyreva D.N., Gradoboeva E.A., Pakschina N.D., Popova I.V. *Rabies in Russian Federation: Informational Analytical Bulletin [Beshenstvo v Rossiyskoy Federatsii: informatsionno-analiticheskiy byulleten']*. Omsk: KAN; 2019.
 - OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). Available at: <https://www.oie.int/standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
 - Heaton P.R., Johnstone P., McElhinney L.M., Cowley R., O'Sullivan E., Whitby J.E. Heminested PCR assay for detection of six genotypes of rabies and rabies-related viruses. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(11): 2762-6.
 - Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp.* 1999; (41): 95-8.
 - Kumar S., Stecher G., Li M., Niyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547-9. DOI: <http://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
 - Hall B.G. Building Phylogenetic trees from molecular data with MEGA. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30(5): 1229-35. DOI: <http://doi.org/10.1093/molbev/mst012>
 - Elakov A.L., Zaykova O.N., Kochergin-Nikitskiy K.S., Grebennikova T.V., Aliper T.I. Rabies monitoring in wildlife animals from Bryansk region after oral vaccination. *Veterinariya*. 2015; (1): 11-4. (in Russian)
 - Zaykova O.N., Grebennikova T.V., Elakov A.L., Kochergin-Nikitskiy K.S., Aliper T.I., Chuchalin S.F., et al. Molecular genetic characteristics of the genomes of field isolates of rabies virus circulating in the Kirov region. *Voprosy virusologii*. 2016; 61(4): 186-92. DOI: <http://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-4-186-192> (in Russian)
 - Zaykova O.N., Grebennikova T.V., Gulyukin A.M., Shabeykin A.A., Polyakova I.V., Metlin A.E. Molecular genetic characteristics of rabies virus field isolates detected in the territory Vladimir, Moscow, Tver, Nizhny Novgorod and Ryazan regions. *Voprosy virusologii*. 2017; 62(3): 101-8. DOI: <http://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-3-101-108> (in Russian)
 - Gulyukin A.M. Significance of modern methods for laboratory detection of rabies agents and identification of the zoonose immunological survey. *Voprosy virusologii*. 2014; 59(3): 5-10. (in Russian)
 - Poleschuk E.M., Sidorov G.N., Gribencha S.V. A summary of the data about antigenic and genetic diversity of rabies virus circulating in the terrestrial mammals in Russia. *Voprosy virusologii*. 2013; 58(3): 9-16. (in Russian)
 - Botvinkin A.D., Kuz'min I.V., Khismatullina N.A. The results of the study of antigen diversity of rabies virus in the territory of the former USSR. *Veterinarnaya patologiya*. 2004; (3): 117-27. (in Russian)
 - Metlin A.E., Rybakov S., Gruzdev K., Neuvonen E., Huovilainen A. Genetic heterogeneity of Russian, Estonian and Finnish field rabies viruses. *Arch. Virol.* 2007; 152(9): 1645-54. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00705-007-1001-6>
 - Deviatkin A.A., Lukashov A.N., Poleschuk E.M., Dedkov V.G., Tkachev S.E., Sidorov G.N., et al. The phylogenetics of the rabies virus in the Russian Federation. *PLoS One*. 2017; 12(2): e0171855. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0171855>
 - Picard-Meyer E., Robardet E., Laurent A., Cliquet F., et al. Bat rabies in France: a 24-year retrospective epidemiological study. *PLoS One*. 2014; 9(6): e98622. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0098622>
 - Troupin C., Picard-Meyer E., Dellicour S., Casademont I., Kergoat L., Lepelletier A., et al. Host Genetic Variation Does Not Determine Spatio-Temporal Patterns of European Bat 1 Lyssavirus. *Genome Biol. Evol.* 2017; 9(11): 3202-13. DOI: <http://doi.org/10.1093/gbe/evx236>



Разработка препарата для онколитической иммунотерапии на основе вируса осповакцины (*Vaccinia virus*, *Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*) против рака молочной железы

Бауэр Т.В., Трегубчак Т.В., Максютов А.З., Колосова И.В., Максютов Р.А., Гаврилова Е.В.

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

Введение. В настоящее время активно развиваются новые направления в лечении рака, одним из которых является онколитическая иммунотерапия. Этот подход заключается в использовании вирусов в качестве онкоселективных цитолитических агентов, способных стимулировать опухолеспецифический и неспецифический иммунный ответ организма.

Цель работы – получение рекомбинантного вируса осповакцины, содержащего в геноме гены, кодирующие иммуностимулирующие молекулы, и изучение его онколитических и иммуностимулирующих свойств в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Материал и методы. Рекомбинантный вирус осповакцины получен с использованием метода временной доминантной селекции. Цитолитическую эффективность вируса оценивали колориметрическим методом (МТТ-тест). Иммуногенность полиэпитопной конструкции в составе вирусного генома оценивали *ex vivo* стимуляцией клеток цельной крови иммунизированных мышей линии BALB/c в ответ на антигены с последующим определением уровня цитокинов методом иммуноферментного анализа.

Результаты. Получен рекомбинантный вирус осповакцины L-IVP_опсоВ, содержащий ген, кодирующий гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор в области гена J2R, который кодирует тимидинкиназу. Кроме того, данный вирус содержит искусственно синтезированную генетическую конструкцию, кодирующую иммуноген, состоящий из эпитопов антигенов, гиперэкспрессируемых в злокачественных клетках при раке молочной железы, встроенную в область гена С11L (кодирует вирусный фактор роста). Показано, что проведённые модификации вирусного генома не оказывают влияния на ростовые характеристики вируса при культивировании на культурах клеток CV-1 и 4647, а также определена цитолитическая эффективность вируса в отношении раковых культур клеток различного генеза. В эксперименте *in vivo* выявлено, что полиэпитопная конструкция в составе генома L-IVP_опсоВ способна инициировать изменение профиля цитокинов.

Обсуждение. Полученные данные охарактеризовали L-IVP_опсоВ как перспективный цитолитический и иммуностимулирующий агент и показали необходимость дальнейшего изучения его свойств в качестве средства онколитической иммунотерапии.

Заключение. Проведены основные эксперименты по оценке биологических свойств полученного L-IVP_опсоВ, которые необходимы для характеристики онколитического вируса.

Ключевые слова: онколитический вирус; вирус осповакцины; опухоль-ассоциированный антиген; цитотоксический Т-лимфоцит.

Для цитирования: Бауэр Т.В., Трегубчак Т.В., Максютов А.З., Колосова И.В., Максютов Р.А., Гаврилова Е.В. Разработка препарата для онколитической иммунотерапии на основе вируса осповакцины (*Vaccinia virus*, *Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*) против рака молочной железы. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(1): 49-56.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-49-56>

Для корреспонденции: Бауэр Татьяна Валерьевна, аспирант, младший научный сотрудник отдела геномных исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область. E-mail: bauer_tv@vector.nsc.ru

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-10101).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов в написании статьи: Бауэр Т.В. – 20%; Трегубчак Т.В. – 20%; Максютов А.З. – 10%; Колосова И.В. – 10%; Максютов Р.А. – 20%; Гаврилова Е.В. – 20%.

Поступила 27.06.19

Принята в печать 28.11.19

Development of the drug oncolytic immunotherapy based on vaccinia viruses (*Vaccinia virus*, *Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*) against breast cancer

Bauer T.V., Tregubchak T.V., Maksyutov A.Z., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V.

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia

Introduction. Currently, new directions in cancer therapy are actively developing, one of which is oncolytic immunotherapy. This approach would be to use of viruses as cancer specific cytolytic agents capable of stimulating both the tumor-specific and non-specific immune response.

The objective paper was obtain a recombinant vaccinia virus containing genes encoding immunostimulating molecules and study oncolytic and immunostimulating properties of recombinant virus.

Material and methods. MTT test, ELISA, methods of transient dominant selection.

Results. The recombinant vaccinia virus (L-IVP_опсоВ) were obtained with deletion of the gene encoding thymidine kinase and had an integrated gene encoding GM-CSF. Also the virus have deletion of the gene encoding

viral growth factor and integrated genes encoding synthetic tumor-specific polyepitopic immunogens. It was shown that the modifications made to the viral genome did not affect the growth characteristics of the virus when cultured on CV-1 and 4647 cell cultures, and the cytopathogenic efficacy of the virus was determined in relation to cancer cultures of cells of various genesis. In *in vivo* experiment, it was revealed that the polyepitopic construct in the genome L-IVP_oncoB is able to initiate a change in the profile of cytokines.

Discussion. The obtained data characterized L-IVP_oncoB as a promising cytopathogenic and immunostimulating agent and showed the need for further study of its properties as means of oncolytic immunotherapy.

Conclusion. The basic experiments on the evaluation of the biological properties of the obtained L-IVP_oncoB, which are necessary for the characterization of the oncolytic virus, have been carried out.

Keywords: oncolytic virus; vaccinia virus; tumor-associated antigen; cytotoxic T-lymphocyte; breast cancer.

For citation: Bauer T.V., Tregubchak T.V., Maksyutov A.Z., Kolosova I.V., Maksyutov R.A., Gavrilova E.V. Development of the drug oncolytic immunotherapy based on vaccinia viruses (*Vaccinia virus*, *Orthopoxvirus*, *Chordopoxvirinae*, *Poxviridae*) against breast cancer. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian Journal)*. 2020; 65(1): 49-56. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-49-56>

For correspondence: Tatyana V. Bauer, PhD student, Junior Research Scientist of the department of genomic research of the State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region, 630559, Russia. E-mail: bauer_tv@vector.nsc.ru

Information about authors:

Bauer T.V., <https://orcid.org/0000-0002-4954-9905>

Tregubchak T.V., <https://orcid.org/0000-0001-9608-2044>

Maksyutov A.Z., <https://orcid.org/0000-0002-4027-8299>

Maksyutov R.A., <https://orcid.org/0000-0003-1314-281X>

Kolosova I.V., <https://orcid.org/0000-0003-2317-4153>

Gavrilova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-7118-5749>

Acknowledgments. The study was carried out for the grant of the Russian Science Foundation (project No. 16-15-10101).

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

Contribution: Bauer T.V. – 20%; Tregubchak T.V. – 20%; Maksyutov A.Z. – 10%; Kolosova I.V. – 10%; Maksyutov R.A. – 20%; Gavrilova E.V. – 20%.

Received 27 June 2019

Accepted 28 November 2019

Введение

Рак молочной железы является одним из наиболее распространённых видов злокачественных новообразований у женщин во всём мире. На него приходится около 14% летальных исходов, обусловленных онкологическими заболеваниями [1]. Однако за последние несколько десятилетий наблюдается значительное снижение показателей смертности больных раком молочной железы благодаря совершенствованию диагностических средств и разработке новых методов терапии [2]. Накопленные данные о молекулярных механизмах канцерогенеза позволяют применять различные подходы к терапии, учитывающие подтип рака молочной железы, профиль экспрессии генов и мутационный статус неопластических клеток опухолей молочной железы. Данные подходы включают гормональную терапию для больных люминальным раком молочной железы подтипов А и В [3], применение ингибиторов рецептора эпидермального фактора роста 2 (HER2) для лечения больных раком молочной железы, для которого характерна гиперэкспрессия HER2 [4], использование поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) для таргетного воздействия на клетки опухоли, несущие мутации по BRCA1 (breast cancer gene 1) [5]. Однако применение указанных препаратов часто сопровождается развитием лекарственной устойчивости у пациентов. Её механизм в первую очередь обусловлен наличием популяции неопластических клеток, представляющих собой раковые стволовые клетки, способные адаптироваться к изменяющимся условиям микроокружения опухоли и сохранять способность к пролиферации [6]. Раковые

стволовые клетки при раке молочной железы подвергаются дифференцировке в эндотелиальные клетки, обеспечивая активную васкуляризацию опухолевой ткани [7], что способствует процессам метастазирования и повышает риск рецидива заболевания [8], поэтому возникает острая потребность в разработке новых препаратов и методов лечения.

При поиске новых терапевтических агентов онколитические вирусы рассматриваются в качестве перспективных основ для создания противоопухолевых средств, о чём свидетельствуют появление и применение в клинической практике препаратов на основе вирусов различных семейств. Так, в 2005 г. в Китае был одобрен первый онколитический препарат на основе аденовируса 5-го типа «Oncorine» для лечения злокачественных опухолей головы и шеи [9]. С 2007 г. в Латвии для терапии меланомы разрешён к использованию в клинической практике препарат «Rigivir» на основе энтеровируса группы ЕСНО 7-го типа, прошедшего адаптацию путём пассирования на перевиваемых культурах клеток, полученных из биопсийного материала опухолей при диагностированной меланоме [10]. Кроме того, для терапии меланомы применяется препарат на основе вируса простого герпеса 1-го типа *Talitogene laherparepvec*, одобренный в США с 2015 г. [11].

Однако, как и у большинства лекарственных средств, у препаратов на основе вирусов существуют недостатки, ограничивающие их применение. Основная проблема заключается в природных иммуномодулирующих свойствах вирусов, что обуславливает необходимость создания панели препаратов виро-терапии для успешного длительного лечения злока-

чественных новообразований и возможности при необходимости проводить замену препарата, чтобы избежать снижения эффективности лечения. Кроме того, иммуностимулирующие свойства вирусов обеспечивают их противоопухолевый эффект, наряду с прямым цитодеструктивным действием на опухолевые клетки. Таким образом, препараты для терапии рака, полученные на основе вирусов, целесообразно относить к средствам онколитической иммунотерапии, что обусловлено их цитолитическими, онкоселективными и иммуностимулирующими свойствами.

В данной работе реализуется комплексный подход, включающий использование онколитического вируса и иммунотерапии рака, направленный на снятие иммунологической толерантности и индукцию противоопухолевого иммунитета, результативность которого зависит от подходящего антигена-мишени и эффективного представления данного антигена иммунной системе организма. Сочетание иммуно- и виротерапии может стать перспективным направлением в разработке препаратов для лечения онкологических заболеваний.

Для реализации данного подхода на основе штамма Л-ИВП вируса осповакцины (ВОВ), принадлежащего к роду *Orthopoxvirus*, семейству *Poxviridae*, был создан рекомбинантный онколитический вирус L-IVP_onsoB, содержащий в геноме искусственный ген, кодирующий полиэпитопный иммуноген, состоящий из эпитопов антигенов, гиперэкспрессирующихся в опухолевых клетках при раке молочной железы. В результате использования искусственной полиэпитопной конструкции можно добиться высокого уровня иммунного ответа на доминантные и субдоминантные эпитопы опухолевых антигенов. Для лучшего представления опухолеспецифических эпитопов иммунной системе в состав ВОВ встроен ген, кодирующий иммуностимулирующий белок гранулоцитарно-макрофагальный колоннестимулирующий фактор (GM-CSF). Целевые встройки осуществлены в участки генов J2R и C11L, кодирующих тимидинкиназу (ТК) и вирусный ростовой фактор (VGF) соответственно. Данные модификации генома обеспечивают высокую эффективность размножения ВОВ в опухолевых клетках и приводят к практически полному подавлению репликации вируса в неделящихся здоровых клетках. В работе оценены цитолитическая эффективность L-IVP_onsoB в отношении раковых культур клеток различного генеза, в том числе рака молочной железы, и эффективность продукции цитокинов клетками цельной крови мышей, иммунизированных L-IVP_onsoB, в ответ на стимуляцию лизатом раковой культуры клеток MDA-MB-231.

Материал и методы

Материал. В работе использовали ВОВ – штамм Л-ИВП, полученный из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора; эукариотические культуры клеток 4647 и CV-1, полученные из коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотреб-

надзора; культуры клеток SW 620, A 431, OVCAR-3, C33A, MDA-MB-231, DU-145, SK-Mel-5, SK-Mel-28, полученные из коллекции Института цитологии и генетики СО РАН; мышей линии BALB/c из вивария ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Получение рекомбинантного вируса L-IVP_onsoB. Предсказание эпитопов для конструирования полиэпитопного иммуногена проводили на сервере IEDB с использованием метода ANN. Рекомбинантный вирус получали при помощи метода временной доминантной селекции [12].

МТТ-тест. Сравнительное изучение цитолитических свойств вариантов ВОВ проводили, используя МТТ-тест. 50% монослой клеток заражали изучаемыми вирусами с множественностью инфекции 0,001, 0,01, 0,1, 1,0 и 10,0 БОЕ/кл. Через 72 ч добавляли 5 мг/мл МТТ (Sigma, США) и инкубировали 4 ч при 37 °С, после чего добавляли 200 мкл диметилсульфоксида и продолжали инкубацию при тех же условиях в течение 1 ч. Затем измеряли оптическую плотность спектрофотометрически при длине волны 540 нм на приборе Multiskan FC (Thermo Scientific, США) и определяли полулетальную дозу (ЦПД₅₀) для исследуемых вирусов.

Оценка ростовых свойств L-IVP_onsoB. Для изучения динамики роста L-IVP_onsoB 90% монослой клеток линий 4647 и CV-1, полученный на 6-луночных планшетах, инфицировали с множественностью заражения 1 БОЕ/кл. в трёх повторах и инкубировали 24, 48, 72 ч при 37 °С в условиях 5% CO₂. Далее трехкратно замораживали и оттаивали полученные вирусосодержащие препараты и определяли концентрацию вируса в них при помощи титрования методом бляшек на монослой клеток линии CV-1. Помимо клеток CV-1 использовали линию 4647, аттестованную для производства иммунобиологических препаратов.

Оценка активации цитотоксических Т-лимфоцитов. Эффективность индукции CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), специфичной для опухолевых антигенов в составе исследуемого рекомбинантного ВОВ, оценивали по изменению уровня продукции цитокинов в ответ на стимуляцию цельной крови животных антигенами. Для этого самок мышей линии BALB/c внутрибрюшинно инфицировали вирусом в дозе 10⁷ БОЕ/мышь в 100 мкл физиологического раствора (6 животных). Мышам контрольной группы (6 животных) внутрибрюшинно вводили 100 мкл физиологического раствора. По истечении 21 сут после инъекции исследуемого препарата брали кровь у животных из ретроорбитального синуса. После этого кровь разводили 1 : 4 раствором, содержащим питательную среду DMEM/F12, стрептомицин 100 мкг/мл, ампициллин 100 Ед/мл, гепарин 2,5 Ед/мл.

От каждой пробы отбирали аликвоты для дальнейшей стимуляции:

- 1) митогеном – смесью фитогемагглютинаина (0,05 мг/мл) и липополисахарида (0,1 мг/мл);
- 2) специфичными антигенами – лизатом перевиваемой культуры клеток MDA-MB-231.

Перечень эпитопов, входящих в состав полиэпитопной конструкции

The list of epitopes that make up the polyepitope construct

Опухоль-ассоциированные антигены Tumor-associated antigens	Аминокислотная последовательность специфического эпитопа Amino acid sequence of a specific epitope
HER2	YLEEITGYL, KIFGSLAFL, SIISAVVGI, QLFEDNYAL, QLMPYGCLL, RLLQETELV, YISAWPDSL, YMIMVKCWMI, SIISAVVGILLVVVLGVVFGI
Mammoglobin-A NY-BR-1	KLLMVLMLAAL, FLNQTDETL, TINPQVSKT, MQLIYDSSLCDL, KLLMVLMLAAL LLSHGAVIEV, SLSKILDTV, YLLHENCML, SLDQKLFQL, SLFESSAKI, AVYSEILSV, KVMEINREV
hMena	GLMEEMSALL, FASAMMHAEVL, GLAAAIAGA, LMEEMSALL
hTERT	RLFFYRKSIV, YLFFYRKSIV, YLQVNSLQTV, RLVDDFLLV, LLARCALFV, LLDTRTLEV, ILAKFLHWL
MUC-1	ALGSTAPPVHNV, ALWGQDVTSV, FLLLLLVTLV, FLSFHISNL, FLLLLLVTLTV, SLSYTNPAV, ALLVLCVLLVAL

Кроме того, отбирали аликвоту пробы, которая не подвергалась стимуляции (контрольные образцы).

Далее инкубировали пробы при 37 °С в течение 20 ч и осаждали клеточные компоненты крови при 0,2g в течение 10 мин. Затем отбирали супернатант и хранили его при -20 °С.

Концентрацию цитокинов в *ex vivo* обработанных пробах цельной крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем «Quantikine Mouse IL-6 ELISA» и «Quantikine Mouse IL-10 ELISA», согласно протоколу фирмы-производителя.

Результаты

Рекомбинантный BOB L-IVP_oncoB. На первом этапе работы выбирали антигены для включения в полиэпитопную конструкцию, предназначенную для дальнейшей инсерции в состав рекомбинантного BOB. Для выбора антигенов анализировали публикации в реферируемых журналах [13] и в базах данных клинических испытаний ClinicalTrials.gov.

Помимо антигенов, характерных для определённых видов рака, выделяют «метастатические» антигены. Поскольку против крупной первичной опухоли иммунный ответ неэффективен, её всегда иссекают хирургическим путём, существует необходимость бороться с метастазами. К таким «метастатическим» антигенам относятся MUC-1, HER2 [14].

Важным критерием выбора антигенов для включения эпитопов в состав вакцинных конструкций является выполнение следующих условий:

- вакцина, созданная на основе такого антигена, находится на I–III стадиях клинических испытаний;
- проведены испытания вакцины на основе данного антигена на животных;
- для недавно открытых антигенов необходимо подтверждение их высокой иммуногенности в литературе [15].

Для конструирования полиэпитопного иммуногена выбрали наиболее часто встречающиеся при раке молочной железы антигенные детерминанты (см. таблицу).

Для улучшения протеосомальной деградации полиэпитопных конструкций и дополнительной стиму-

ляции цитотоксического ответа на все включённые в состав конструкции антигенные детерминанты на N-конец полиэпитопа добавлен убиквитин с заменённой C-концевой аминокислотой Gly76-Val [16, 17]. Для усиления ответа ЦТЛ в состав полиэпитопных конструкций добавлены универсальные Т-хелперные эпитопы p2 из Tetanus toxin, PADRE. Универсальные Т-хелперные эпитопы располагаются на C-конце конструкций.

В качестве спейсера на C-конце ЦТЛ-эпитопов использовали дипептид AD [18]. Универсальные Т-хелперные эпитопы p2 из Tetanus toxin и PADRE отделены трипептидом ARY. Использование спейсерных последовательностей между всеми эпитопами приводит к более точному и надёжному представлению каждого целевого эпитопа, что в свою очередь повышает общую эффективность вакцинных полиэпитопных конструкций.

Нуклеотидная последовательность, кодирующая полиэпитопный иммуноген, была синтезирована ЗАО «Евроген» (Россия).

Для получения целевого рекомбинантного BOB использовали ранее сконструированный BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(K151E_D110N) (неопубликованные данные). Данный вирус получен на основе BOB L-IVP 5 cl и содержит две аминокислотные замены в составе мембранного гликопротеина A34R. Введение таких замен в белок A34 в составе BOB усиливает формирование внеклеточных оболочечных вирионов, обладающих низкой иммуногенностью и обеспечивающих эффективный транспорт вируса в тканях инфицируемого организма, что может повысить онколитический потенциал BOB относительно первичных опухолей и метастазов, а также частично решает вопрос относительно снижения эффективности терапии онколитическим вирусом вследствие иммунной реакции организма при длительном или повторном применении препарата.

На основе BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_A34R_(K151E_D110N) в ходе серии пассажей под селективным давлением был получен рекомбинантный BOB_TK(-)_GM-CSF(+)_VGF(-)_BC(+)_A34R_(K151E_D110N) (L-IVP_oncoB). Данный штамм депонирован в коллекции ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзо-

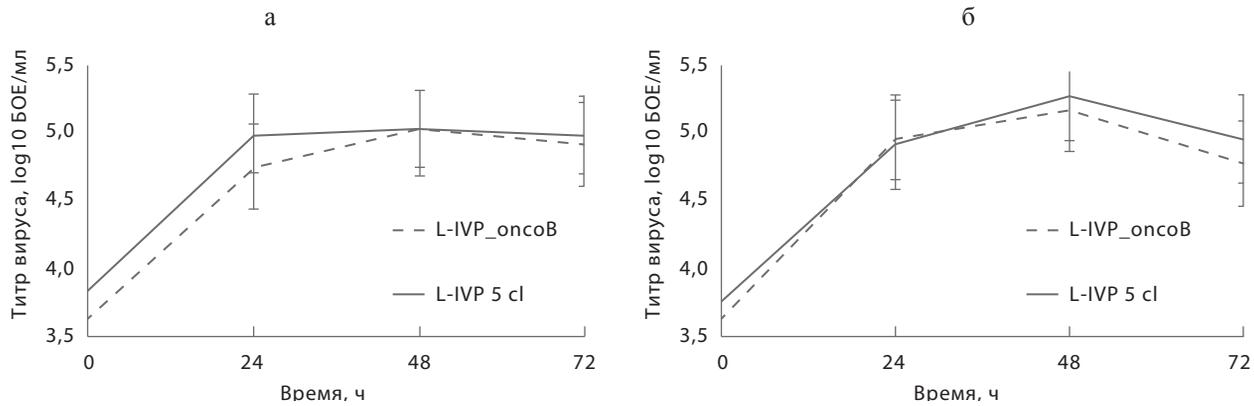


Рис. 1. Анализ динамики размножения L-IVP_oncoB по сравнению с исходным вариантом вируса (L-IVP 5 cl) на эукариотических культурах клеток 4647 (а) и CV-1 (б).

Fig. 1. Analysis of the propagation dynamics of L-IVP_oncoB comparing the original preserved viruses (L-IVP 5 cl) on eukaryotic cell cultures CV-1, 4647. On the abscissa axis – time of incubation of the monolayer of cells after infection with viruses; on the ordinate axis – virus titer, lg PFU/ml.

ра под номером V-796. Полная последовательность представлена в GenBank под номером MN341445.1.

Ростовые характеристики L-IVP_oncoB. L-IVP_oncoB получен путём модификаций генома исходного варианта вируса (L-IVP 5 cl) в районах, ответственных за ростовые свойства вируса, его история составляет 18 пассажей под селективным давлением и 10 пассажей без селективного давления. В связи с этим возникает потребность в изучении репликативных свойств полученного L-IVP_oncoB.

В проведённых экспериментах по изучению ростовых характеристик исследуемых ВОВ не выявлено достоверно значимых различий между ростовыми свойствами L-IVP_oncoB и исходным вариантом вируса (рис. 1), что свидетельствует об отсутствии

влияния модификации генома L-IVP_oncoB на вирусную репродукцию в эукариотических культурах клеток 4647 и CV-1.

Оценка цитолитической активности L-IVP_oncoB в раковых культурах клеток различного генеза. При помощи МТТ-теста изучена чувствительность раковых культур клеток различного генеза: SW 620 (колоректальный рак), А 431 (рак кожи), OVCAR-3 (рак яичников), С33А, MDA-MB-231 (рак молочной железы), DU-145 (рак простаты), SK-Mel-5 (меланома), SK-Mel-28 (меланома) – к L-IVP_oncoB (рис. 2).

Полученные данные свидетельствуют о чувствительности линий клеток, используемых в эксперименте, к исследуемому вариантам ВОВ, что подтверждает широкий тропизм L-IVP_oncoB в отношении опухолевых клеток человека различного генеза. Данное свойство полученного вируса может оказать положительный эффект не только при терапии первичного опухолевого узла, но и при метастазирующих формах рака молочной железы.

Оценка активации ЦТЛ в ответ на опухоль-ассоциированные антигены (ОАА). На примере IL-6 и IL-10 показана активация продукции цитокинов клетками цельной крови мышей в ответ на стимуляцию лизатом клеток MDA-MB-231, в связи с чем можно сделать вывод об активации ЦТЛ (рис. 3).

Основным количественным параметром напряжённости специфического клеточного иммунитета является цитокиновый индекс (CI) – отношение антиген-стимулированной продукции к митоген-стимулированной. Другим параметром для количественной оценки реакции иммунной системы на целевой антиген является индекс влияния (II) – отношение антиген-стимулированной продукции цитокинов к спонтанной или индекс влияния антигена (МИ) – отношение митоген-стимулированной продукции цитокинов к спонтанной. Достоверной считается стимуляция, при которой II > 2, при этом важно, чтобы МИ > 2. Данные представлены как отношение средних арифметических разниц значений оптической плотности при 450 и 540 нм.

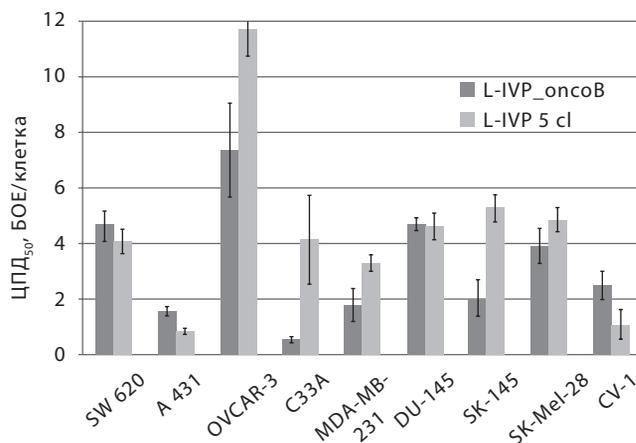


Рис. 2. Определение полулетальной дозы вариантов вируса осповакцины для раковых культур клеток различного генеза.

TCID₅₀ – доза вируса, при которой жизнеспособными остаются 50% клеток в лунке 96-луночного планшета через 72 ч после инфицирования.

Fig. 2. Determination of a semi-lethal dose of VV variants for cancer cells of various genesis.

TCID₅₀ is the dose of virus lysing 50% of cells in a well of a 96-well plate 72 h after infection. On the abscissa axis – cell cultures; on the ordinate axis – values of TCID₅₀, PFU/cell.

Обсуждение

В ходе жизненного цикла клетки делятся, дифференцируются, мигрируют, подвергаются апоптозу. Соблюдение баланса между этими четырьмя основными клеточными процессами в результате регуляции множества внутриклеточных сигнальных путей обуславливает рост и морфогенез организма, а на более поздних этапах онтогенеза обеспечивает состояние гомеостаза. Когда в клетке происходит ряд мутаций, высвобождающих её от воздействия факторов, регулирующих клеточное деление, запускается активация протоонкогенов, а также снижается экспрессия генов – супрессоров опухолевого роста, что приводит к неуправляемой клеточной пролиферации [19]. В ряде случаев на данном этапе развития онкопатологии иммунная система организма способна бороться с неопластическими клетками и противодействовать развитию новообразований, приводя к спонтанной ремиссии опухоли. Однако вероятность спонтанной ремиссии довольно низкая [20], так как клетки опухоли обладают низкой иммуногенностью и активируют механизмы, позволяющие им избегать иммунного ответа, из чего можно заключить, что течение многих онкологических заболеваний связано с развитием опухоль-ассоциированной иммуносупрессии.

Иммунорезистентность опухоли связывают с различными механизмами, главными из которых являются:

- сдвиг цитокинового баланса в сторону иммуносупрессорных медиаторов;
- значительное преобладание CD4⁺CD25⁺ Т-регуляторных лимфоцитов, эффективно подавляющих иммунный ответ на развивающуюся опухоль;
- низкая иммуногенность ОАА.

Низкая иммуногенность ОАА объясняется тем, что они представляют собой нормальные белки организма, хотя и с возможными незначительными изменениями, сверхэкспрессируемые или экспрессируемые в нехарактерных для них тканях или временных промежутках [21].

Для комплексного преодоления механизмов, обеспечивающих иммунорезистентность опухоли и формирование полноценного противоопухолевого иммунитета, нами был получен рекомбинантный ВОВ L-IVP_оncоВ и изучены его свойства. Целесообразность использования онколитических вирусов в комбинированной терапии рака обусловлена их способностью, помимо прямого цитодеструктивного действия, влиять как на чувствительность опухолевых клеток к терапевтическим воздействиям и эндогенным противоопухолевым механизмам, так и на организм в целом, восстанавливая его естественные антиканцерогенные молекулярные механизмы.

ВОВ способен активировать иммунную систему организма как естественный природный антиген. С целью усилить способность ВОВ стимулировать специфический клеточный противоопухолевый иммунитет нами была создана полиэпитопная конструкция из эпитопов антигенов, гиперэкспрессирующихся опухолевыми клетками при раке молочной железы.

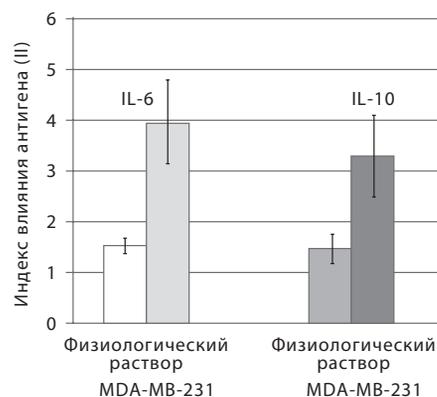


Рис. 3. Результат измерения уровня продукции цитокинов клетками цельной крови мышей, которым предварительно вводили 10^7 БОЕ L-IVP_оncоВ, в ответ на стимуляцию лизатом клеток MDA-MB-231. Различия между группами достоверны при $p < 0,05$.

Fig. 3. The result of measuring the level of cytokine production by whole blood cells of mice in response to the stimulation by cell lysate MDA-MB-231. Mice were injected in advance with 10^7 PFU L-IVP_оncоВ. Differences between groups are significant at $p < 0.05$.

On the abscissa axis – physiological solution; on the ordinate axis – the index of influence of the antigen (II).

Предположительно, полиэпитопная конструкция в составе вирусного генома будет с высокой эффективностью проникать в клетки организма и усиливать иммуногенные свойства вируса, необходимые для стимуляции естественного противоопухолевого иммунитета. Рациональность применения таких конструкций заключается в том, что использование полиэпитопных вакцин, основанных на целом ряде основных ОАА, может преодолеть гетерогенность экспрессии антигенов различными раковыми клетками внутри одной опухоли, запуская механизм контроля роста опухоли посредством презентации ОАА молекулами главного комплекса гистосовместимости класса I (МНС I) ЦТЛ [22].

Таким образом, нами осуществлены дизайн нуклеотидной последовательности, кодирующей полиэпитопный иммуноген, и его встройка в вирусный геном при помощи метода временной доминантной селекции [12]. Ростовые характеристики полученного рекомбинантного вируса L-IVP_оncоВ были изучены на культурах клеток. При создании онколитического препарата на основе вируса важно, чтобы полученный вариант вируса сохранил репродуктивные свойства на культуре клеток, использование которой планируется при производстве препарата на его основе. Нами было показано, что в ходе длительной пассажной истории ростовые характеристики рекомбинантного вируса не изменились относительно исходного варианта.

Одним из главных природных свойств любого вируса является специфический клеточный тропизм, определяющий, какие ткани организма преимущественно будут инфицированы, и, следовательно, какое заболевание будет вызвано. Так, вирус бешенства

повреждает нейроны, вирус гепатита В – гепатоциты, ВИЧ повреждает Т-хелперы, а вирус гриппа – клетки эпителия дыхательных путей. Многие вирусы характеризуются преимущественным, хотя и не исключительным, тропизмом к опухолевым клеткам. В частности, это может объясняться нарушением в системе апоптоза раковых клеток и опухоль-ассоциированной иммуносупрессией, в то время как в здоровых тканях организма запускается процесс апоптоза и формируется специфический противовирусный иммунитет, являющиеся ключевыми механизмами для ограничения вирусной инфекции.

ВОВ характеризуется широким охватом восприимчивых к нему млекопитающих и способностью поражать обширный спектр тканей организма человека. ВОВ способен инфицировать неопластические клетки, образующиеся в разных органах и тканях, несмотря на протекающие в них молекулярные процессы канцерогенеза, что подтвердили результаты проведенного МТТ-теста, определившего высокую цитолитическую активность L-IVP_onsoB в отношении раковых клеток различного генеза.

Кроме того, ключевая роль в виротерапии злокачественных новообразований отведена формированию противоопухолевого иммунитета. Оценить иммунологические эффекты, опосредованные полиэпитопным иммуногеном, встроенным в вирусный геном, в экспериментах *in vitro* невозможно, а в системах *in vivo* на животных можно получить только косвенные данные о способности стимулировать Т-клеточный ответ, поскольку искусственно синтезированный иммуноген состоит из эпитопов ОАА, экспрессируемых злокачественными клетками опухолей человека. Поэтому способность полиэпитопа в составе L-IVP_onsoB активировать ЦТЛ проверяли опосредованно – путём оценки уровня секреции цитокинов в цельной крови мышей в ответ на стимуляцию митогенами или лизатом клеток рака молочной железы человека MDA-MB-231. Полученные данные свидетельствуют о влиянии полиэпитопного иммуногена на сдвиг цитокинового профиля, что свидетельствует об активации клеток иммунной системы.

Сдвиг цитокинового баланса в микроокружении опухоли имеет большое значение в терапии злокачественных новообразований. Цитокины могут как активировать, так и угнетать рост опухоли [23] в зависимости от её микроокружения [24]. Так, роль IL-10 в патогенезе и развитии опухоли крайне противоречива. В литературе представлены результаты исследований, в которых подтверждено действие IL-10 как иммуносупрессивного цитокина, способного снизить противоопухолевый иммунный ответ в микроокружении опухоли, а также обнаружена способность опухолевых клеток продуцировать IL-10 для ухода из-под иммунного надзора [25]. Наряду с этим получены данные, подтверждающие, что IL-10 оказывает противоопухолевое действие. В мышинной модели опухоли с повышенной экспрессией mIL-10 показано отторжение опухоли, которое усиливалось с повышением секреции mIL-10 [26].

На эффекты, оказываемые тем или иным цитокином, может влиять пул других цитокинов, формирующих цитокиновый профиль крови или микроокружения опухоли. IL-10 при введении в комбинации с IL-4 и/или IL-2 стимулирует пролиферацию зрелых мышиных CD8⁺ Т-клеток *in vitro* [27]. IL-10 можно использовать в качестве эффективного адъюванта для вакцины на основе поксвируса. При совместном введении вируса и IL-10 показана повышенная активация ЦТЛ у мышей [28].

Таким образом, полученные нами данные, характеризующие рекомбинантный вирус L-IVP_onsoB, свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения свойств вируса и перспективности его использования в качестве средства онколитической иммунотерапии.

Заключение

С развитием молекулярной биологии появились новые направления в терапии рака, одно из которых – онколитическая иммунотерапия, сочетающая действие препаратов на основе вирусов и белков, стимулирующих противоопухолевый иммунитет. Метод онколитической иммунотерапии имеет ряд преимуществ, но нуждается в дальнейших исследованиях.

На данный момент проведены основные эксперименты по оценке биологических свойств полученного L-IVP_onsoB, которые необходимы для характеристики онколитического вируса. Предположительно литические способности вируса, эффективная доставка терапевтических молекул посредством ВОВ и активация ЦТЛ эффективной презентацией полиэпитопов ОАА молекулами МНС I должны показать синергическое действие в борьбе со злокачественными опухолевыми тканями при раке молочной железы. Свойства L-IVP_onsoB в дальнейшем будут изучены *in vivo* на мышинных онкологических моделях – ксеногraftах.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Youlden D.R., Cramb S.M., Dunn N.A., Muller J.M., Pyke C.M., Baade P.D. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol.* 2012; 36(3): 237-48. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canep.2012.02.007>
2. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J. Clin.* 2017; 67(1): 7-30. DOI: <https://doi.org/10.3322/caac.21387>
3. Rouzier R., Perou C.M., Symmang W.F., Ibrahim N., Cristofanilli M., Anderson K., et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 2005; 11(16): 5678-85. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2421>
4. Nixon N.A., Hannouf M.B., Verma S. A review of the value of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-targeted therapies in breast cancer. *Euro. J. Cancer.* 2018; 89: 72-81. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2017.10.037>
5. Fong P.C., Boss D.S., Yap T.A., Tutt A., Wu P., Mergui-Roelvink M., et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N. Engl. J. Med.* 2009; 361(2): 123-34. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0900212>
6. Butti R., Gunasekaran V.P., Kumar T.V.S., Banerjee P., Kundu G.C. Breast cancer stem cells: Biology and therapeutic implications. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2019; 107: 38-52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018>
7. Delgado-Bellido D., Serrano-Saenz S., Fernández-Cortés M., Oli-

- ver F.J. Vasculogenic mimicry signaling revisited: focus on non-vascular VE-cadherin. *Mol. Cancer*. 2017; 16(1): 65. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0631-x>
8. Economopoulou P., Kaklamani V.G., Siziopikou K. The role of Cancer stem cells in breast Cancer initiation and progression: potential Cancer stem cell-directed therapies. *Oncologist*. 2012; 17(11): 1394-401. DOI: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0163>
 9. Garber K. China approves world's first oncolytic. *J. Natl. Cancer Inst.* 2006; 98(5): 298-300. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/djj111>
 10. Jaunalksne I., Brokane L., Petroška D., Rasa A., Alberts P. ECHO-7 oncolytic virus Rigvir® in an adjuvant setting for stage I uveal melanoma; A retrospective case report. *Am. J. Ophthalmol. Case Rep.* 2020; 17: 100615. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ajoc.2020.100615>
 11. Adam J., Robertson J., Donegan E., Voicechovskaja I. NICE guidance for talimogene laherparepvec for unresectable metastatic melanoma. *Lancet Oncol.* 2016; 17(11): 1485-6. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30489-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30489-2)
 12. Falkner F.G., Moss B. Transient dominant selection of recombinant vaccinia viruses. *J. Virol.* 1990; 64(6): 3108-11.
 13. Cheever M.A., Allison J.P., Ferris A.S., Finn O.J., Hastings B.M., Hecht T.T., et al. The Prioritization of Cancer Antigens: A National Cancer Institute Pilot Project for the Acceleration of Translational Research. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15(17): 5323-37. DOI: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0737>
 14. Schlom J. Therapeutic Cancer Vaccines: Current Status and Moving Forward. *J. Natl. Cancer Inst.* 2012; 104(8): 599-613. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/djs033>
 15. Milani A., Sangiolo D., Aglietta M., Valabrega G. Recent advances in the development of breast cancer vaccines. *Breast Cancer (Dove Med. Press)*. 2014; 6: 159-68. DOI: <https://doi.org/10.2147/BCTT.S38428>
 16. Thomson S.A., Khanna R., Gardner J., Burrows S.R., Coupar B., Moss D.J., et al. Minimal epitopes expressed in a recombinant poly-epitope protein are processed and presented to CD8⁺ cytotoxic T cells: implications for vaccine design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92(13): 5845-9. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.92.13.5845>
 17. Eslami N.S., Shokrgozar M.A., Mousavi A., Azadmanesh K., Nomanian A., Apostolopoulos V., et al. Simultaneous immunisation with a Wilms' tumour 1 epitope and its ubiquitin fusions results in enhanced cell mediated immunity and tumour rejection in C57BL/6 mice. *Mol. Immunol.* 2012; 51(3-4): 325-31. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.03.033>
 18. Seyed N., Taheri T., Vauchy C., Dosset M., Godet Y., Eslamifard A., et al. Immunogenicity Evaluation of a Rationally Designed Polytope Construct Encoding HLA-A*0201 Restricted Epitopes Derived from Leishmania major Related Proteins in HLA-A2/DR1 Transgenic Mice: Steps toward Polytope Vaccine. *PLoS One*. 2014; 9(10): e108848. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108848>
 19. Nemecek A.A., Wallace S.S., Sweasy J.B. Variant base excision repair proteins: Contributors to genomic instability. *Semin. Cancer Biol.* 2010; 20(5): 320-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.10.010>
 20. Horii R., Akiyama F., Kasumi F., Koike M., Sakamoto G. Spontaneous healing of breast cancer. *Breast Cancer*. 2005; 12(2): 140-4. DOI: <https://doi.org/10.2325/jbcs.12.140>
 21. Allegrezza M.J., Conejo-Garcia J.R. Targeted Therapy and Immunosuppression in the Tumor Microenvironment. *Trends Cancer*. 2017; 3(1): 19-27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2016.11.009>
 22. Peres L.P., da Luz F.A., Pultz B.A., Brígido P.C., de Araújo R.A., Goulart L.R. Peptide vaccines in breast cancer: The immunological basis for clinical response. *Biotechnol. Adv.* 2015; 33(8): 1868-77. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.10.013>
 23. Borsig L., Wolf M.J., Roblek M., Lorentzen A., Heikenwalder M. Inflammatory chemokines and metastasis — tracing the accessory. *Oncogene*. 2013; 33(25): 3217-24. DOI: <https://doi.org/10.1038/onc.2013.272>
 24. Salazar-Onfray F., López M.N., Mendoza-Naranjo A. Paradoxical effects of cytokines in tumor immune surveillance and tumor immune escape. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007; 18(1-2): 171-82. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.01.015>
 25. Chen Q., Daniel V., Maher D.W., Hersey P. Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *Int. J. Cancer.* 1994; 56(5): 755-60. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.2910560524>
 26. Giovarelli M., Musiani P., Modesti A., Dellabona P., Casorati G., Allione A., et al. Local release of IL-10 by transfected mouse mammary adenocarcinoma cells does not suppress but enhances antitumor reaction and elicits a strong cytotoxic lymphocyte and antibody-dependent immune memory. *J. Immunol.* 1995; 155(6): 3112-23.
 27. Chen W., Zlotnik A. IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J. Immunol.* 1991; 147(2): 528-34.
 28. Kaufman H.L., Rao J.B., Irvine K.R., Bronte V., Rosenberg S.A., Restifo N.P. Interleukin-10 enhances the therapeutic effectiveness of a recombinant poxvirus-based vaccine in an experimental murine tumor model. *J. Immunother.* 1999; 22(6): 489-96. DOI: <https://doi.org/10.1097/00002371-199911000-00003>