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. 3A.

Тел.: +7(925) 011-87-79.

Полные тексты статей журнала доступны на сайтах www.virusjour.elpub.ru, www.elibrary.ru, www. cyberleninka.ru и www.rucont.ru/efd/331542 К публикации принимаются

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

Курушина Тамара Михайловна 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.

2

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.)

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., членкорр. РАН; Сергиев Посад, Россия)

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

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

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

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

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

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

Иванов Л.И. (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)

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

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

Михайлов М.И. (д.м.н., проф., членкорр. 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., членкорр. 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)

Шелканов 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.; Jerusalim, 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 VIRUSOLOGII

PROBLEMS OF VIROLOGY (Russian Journal)

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

Volume 65 • 2 • 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: **Zaberezhnyv 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,

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.; Jerusalim, 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. Истоки пандемии COVID-19: экология и генетика коронавирусов (<i>Betacoronavirus: Coronaviridae</i>) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (подрод <i>Sarbecovirus</i>), MERS-CoV (подрод <i>Merbecovirus</i>)	62
Зуев В.А., Кальнов С.Л., Куликова Н.Ю., Гребенникова Т.В. Современное состояние проблемы прионных болезней и причины их опасности для человека и животных	71
ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	
Смирнова К.В., Сенюта Н.Б., Лубенская А.К., Душенькина Т.Е., Гурцевич В.Э. Древние варианты вируса Эпштейна–Барр (<i>Herpesviridae</i> , <i>Lymphocryptovirus</i> , HHV-4): гипотезы и факты	77
Наровлянский А.Н., Полосков В.В., Иванова А.М., Мезенцева М.В., Суетина И.А., Руссу Л.И., Челарская Е.С., Изместьева А.В., Оспельникова Т.П., Зубашев И.К., Сарымсаков А.А., Ершов Ф.И. Интерферон-регулирующая активность препарата ЦелАгрип и его влияние на образование активных форм кислорода и экспрессию генов врожденного иммунитета в перевиваемых культурах клеток лимфомы Бёркитта	87
Нефедченко А.В., Котенева С.В., Глотова Т.И., Глотов А.Г. Выявление пестивирусов крупного рогатого скота при помощи мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени	95
Мима К.А., Каторкина Е.И., Каторкин С.А., Цыбанов С.Ж., Малоголовкин А.С. In silico идентификация В- и Т-клеточных эпитопов белка CD2v вируса африканской чумы свиней (African swine fever virus, Asfivirus, Asfarviridae)	103
В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ	
Фёдоров А.Ю., Жирнов О.П. Метод оценки нейраминидазной активности препаратов RDE с помощью вируса гриппа	113
РЕЦЕНЗИИ	
<i>Гребенникова Т.В.</i> – Ф.И. Ершов «История вирусологии от Д.И. Ивановского до наших дней»	119
НЕКРОЛОГ	
Памяти Петра Григорьевича Лерябина (09 06 1947 – 25 04 2020)	120

CONTENTS

REVIEWS

Lvov D.K., Alkhovsky S.V. Source of the COVID-19 pandemic: ecology and genetics of coronaviruses (Betacoronavirus: Coronaviridae) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (subgenus Sarbecovirus), and MERS-CoV (subgenus Merbecovirus) 62
Zuev V.A., Kalnov S.L., Kulikova N.Yu., Grebennikova T.V. Prion diseases and the biosecurity problems
ORIGINAL RESEARCH
Smirnova K.V., Senyuta N.B., Lubenskaya A.K., Dushenkina T.E., Gurtsevich V.E. Ancient variants of the Epstein–Barr virus (Herpesviridae, Lymphocryptovirus, HHV-4): hypotheses and facts 77
Narovlyansky A.N., Poloskov V.V., Ivanova A.M., Mezentseva M.V., Suetina I.A., Russu L.I., Chelarskaya E.S., Izmest'eva A.V., Ospelnikova T.P., Zubashev I.K., Sarymsakov A.A., Ershov F.I. Interferon-regulating activity of the CelAgrip drug and its influence on the formation of reactive oxygen species and expression of innate immunity genes in Burkitt's lymphome cells cultures 87
Nefedchenko A.V., Koteneva S.V., Glotova T.I., Glotov A.G. Detection of bovine pestiviruses by a multiplex real-time polymerase chain reaction
Mima K.A., Katorkina E.I., Katorkin S.A., Tsybanov S.Zh., Malogolovkin A.S. In silico prediction of B- and T-cell epitopes in the CD2v protein of african swine fever virus (African swine fever virus, Asfivirus, Asfarviridae)
TO VIROLOGIST'S AID
Fedorov A.Yu., Zhirnov O.P. Method for evaluating the neuraminidase activity of receptor-destroying enzyme (RDE) compounds using the influenza virus
BOOK REVIEWS
Grebennikova T.V. – F.I. Ershov «History of virology from D.I. Ivanovsky to the present day»
OBITUARY
In memory of P.G. Deryabin (09.06.1947–25.04.2020)

ОБЗОРЫ



© ЛЬВОВ Д.К., АЛЬХОВСКИЙ С.В., 2020

Истоки пандемии COVID-19: экология и генетика коронавирусов (*Betacoronavirus: Coronaviridae*) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (подрод *Sarbecovirus*), MERS-CoV (подрод *Merbecovirus*)

Львов Д.К., Альховский С.В.

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

С начала 2000-х годов зарегистрировано три независимых случая появления новых зооантропонозных коронавирусов (Betacoronavirus) человека, обладающих эпидемическим и пандемическим потенциалом. Первая вспышка инфекции (TOPC, SARS), вызванная вирусом SARS-CoV, возникла осенью 2002 г. в КНР (провинция Гуандун). Вторая вспышка (БВРС, MERS), связанная с новым вирусом MERS-CoV, появилась осенью 2012 г. в Саудовской Аравии. Третья эпидемия, переросшая в пандемию COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, возникла осенью 2019 г. в КНР (провинция Хубэй). В настоящем обзоре рассмотрены экологические и генетические аспекты, обусловившие появление новых зооантропонозных коронавирусов человека. Основным механизмом адаптации зоонозных бетакоронавирусов к человеку является изменение структуры рецептор-связывающего домена поверхностного белка S, в результате чего он приобретает способность связывать клеточные рецепторы эпителиальных клеток респираторного и пищеварительного трактов человека. Этот процесс определяется высокой генетической изменчивостью коронавирусов и их способностью к рекомбинации в процессе межпопуляционных взаимоотношений вирусов и их природных резервуаров – летучих мышей (Microchiroptera, Chiroptera). Появление вирусов SARS-CoV, SARS-CoV-2 (подрод Sarbecovirus) и MERS-CoV (подрод Merbecovirus) связано с эволюцией этих и других вирусов, протекающей в популяциях летучих мышей, с их дальнейшей передачей человеку напрямую или через промежуточных позвоночных хозяев, экологически связанных с летучими мышами.

Статья подготовлена по материалам доклада на заседании Научного совета РАН «Науки о жизни» «Коронавирус – глобальный вызов науке»: *Львов Д.К., Альховский С.В., Бурцева Е.И.* Истоки пандемии COVID-19: происхождение, биология и генетика коронавирусов SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV (16 апреля 2020 г., зал заседаний Президиума РАН, Москва Ленинский проспект, д. 14).

Ключевые слова: коронавирус; SARS-CoV; MERS-CoV; SARS-CoV-2; летучие мыши; экология; секвенирование; филогенетика; рецептор-связывающий домен.

Для цитирования: Львов Д.К., Альховский С.В. Истоки пандемии COVID-19: экология и генетика коронавирусов (*Betacoronavirus: Coronaviridae*) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (подрод *Sarbecovirus*), MERS-CoV (подрод *Merbecovirus*). Вопросы вирусологии. 2020; 65(2): 62-70. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-62-70

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

Финансирование. Работа не имела целевого финансирования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила 20.04.2020 Принята в печать 29.04.2020

Source of the COVID-19 pandemic: ecology and genetics of coronaviruses (*Betacoronavirus: Coronaviridae*) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (subgenus *Sarbecovirus*), and MERS-CoV (subgenus *Merbecovirus*)

Dmitry K. Lvov, Sergey V. Alkhovsky

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

Since the early 2000s, three novel zooanthroponous coronaviruses (*Betacoronavirus*) have emerged. The first outbreak of infection (SARS) caused by SARS-CoV virus occurred in the fall of 2002 in China (Guangdong Province). A second

outbreak (MERS) associated with the new MERS-CoV virus appeared in Saudi Arabia in autumn 2012. The third epidemic, which turned into a COVID-19 pandemic caused by SARS-CoV-2 virus, emerged in China (Hubei Province) in the autumn 2019. This review focuses on ecological and genetic aspects that lead to the emergence of new human zoanthroponous coronaviruses. The main mechanism of adaptation of zoonotic betacoronaviruses to humans is to changes in the receptor-binding domain of surface protein (S), as a result of which it gains the ability to bind human cellular receptors of epithelial cells in respiratory and gastrointestinal tract. This process is caused by the high genetic diversity and variability combined with frequent recombination, during virus circulation in their natural reservoir – bats (*Microchiroptera*, *Chiroptera*). Appearance of SARS-CoV, SARS-CoV-2 (subgenus *Sarbecovirus*), and MERS (subgenus *Merbecovirus*) viruses is a result of evolutionary events occurring in bat populations with further transfer of viruses to the human directly or through the intermediate vertebrate hosts, ecologically connected with bats.

This review is based on the report at the meeting «Coronavirus – a global challenge to science» of the Scientific Council «Life Science» of the Russian Academy of Science: Lvov D.K., Alkhovsky S.V., Burtseva E.I. COVID-19 pandemic sources: origin, biology and genetics of coronaviruses of SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV (Conference hall of Presidium of RAS, 14 Leninsky Prospect, Moscow, Russia. April 16, 2020)

Keywords: Coronaviridae; Betacoronavirus; SARS-CoV; MERS-CoV; SARS-CoV-2; bats; ecology; sequencing; phylogenetic; receptor-binding domain.

For citation: Lvov D.K., Alkhovsky S.V. Source of the COVID-19 pandemic: ecology and genetics of coronaviruses (*Betacoronavirus: Coronaviridae*) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (subgenus *Sarbecovirus*), and MERS-CoV (subgenus *Merbecovirus*). *Voprosy Virusologii* (*Problems of Virology*). 2020; 65(2): 62-70. (In Russian). DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-62-70

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 the authors:

Lvov D.K., https://orcid.org/0000-0001-8176-6582 Alkhovsky S.V., https://orcid.org/0000-0001-6913-5841

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

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

Received 20 April 2020 Accepted 29 April 2020

Введение

Коронавирусы (CoV, семейство Coronaviridae) представляют собой обширное семейство зоонозных РНК-содержащих вирусов, инфицирующих широкий круг позвоночных, включая млекопитающих, птиц и земноводных. Семейство Coronaviridae принадлежит к отряду Nidovirales и по современной таксономии включает два подсемейства и 8 родов. Коронавирусы человека и животных принадлежат подсемейству Orthocoronavirinae, в которое входят 5 родов и 33 подрода (рис. 1) [1]. Многие короновирусы вызывают тяжёлые заболевания домашних и сельскохозяйственных животных, тогда как у своих основных хозяев в дикой природе вызывают в основном бессимптомную, персистирующую инфекцию. Коронавирусы двух родов (Alphacoronavirus и Betacoronavirus) способны инфицировать человека и вызывать у людей тяжёлые заболевания [1, 2].

Альфакоронавирусы (HCoV-229E) активно циркулируют среди людей и участвуют в сезонном подъёме заболеваемости острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ), наряду с другими респираторными вирусами [3, 4]. По разным оценкам, доля коронавирусов в структуре ОРВИ может достигать 10–15%, особенно среди детей. В России в эпидемический сезон с октября 2018 г. по апрель 2019 г. доля коронавирусов среди лабораторно диагностированных случаев ОРВИ составляла 4,6–9,4% [2].

До 2002 г. коронавирусы человека рассматривались как вирусы сезонного ОРВИ, не вызывающие серьёзных осложнений. В ноябре 2002 г. в сельской местности провинции Гуандун (КНР) возникла вспышка заболевания, получившего название «тяжёлый острый респираторный синдром» (ТОРС, SARS), с 11% летальностью, вызванная новым, неизвестным ранее коронавирусом. Вирус – возбудитель ТОРС получил название SARS-CoV и позднее был отнесён к новому виду Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus в составе рода Betacoronavirus (подрод Sarbecovirus) [5]. В сентябре 2012 г. на Ближнем Востоке (Саудовская Аравия, Оман), с последующим заносом в ряд других стран, начали регистрировать случаи тяжёлого респираторного заболевания, названного «ближневосточный респираторный синдром» (БВРС, MERS), вызванного другим ранее неизвестным коронавирусом (MERS-CoV), классифицированным как новый вид (Middle East respiratory syndrome related coronavirus) в составе рода Betacoronavirus (подрод Merbecovirus) [6]. Случаи инфекции MERS регистрируются и в настоящее время. На декабрь 2019 г. были подтверждены 2484 случая, из них 857 (34%) закончились летально [2]. В конце ноября 2019 г. в г. Ухань (провинция Хубэй, КНР) зарегистрирована вспышка респираторного заболевания, позднее получившего название COVID-19 (от англ. Coronavirus infectious <u>desease</u>), вызванная третьим, ранее неизвестным коронавирусом [7, 8]. Генетические исследования показали, что этиологический агент COVID-19 является близкородственным вирусу SARS-CoV (2002—2003 гг.) и относится к тому же виду Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus рода Betacoronavirus. В этой связи вирус получил название SARS-CoV-2 [9]. В настоящее время ВОЗ объявлена пандемия COVID-19. На 25 апреля 2020 г. общее число инфицированных в мире превысило 2,7 млн человек, число летальных случаев превысило 196 тыс.

Экология зооантропонозных коронавирусов SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV

Источником первичного инфицирования людей во всех трёх случаях новых коронавирусных инфекций были животные. Исследования, проведённые в КНР и в других странах, показали, что схожие с SARS-CoV вирусы активно циркулируют в популяциях летучих мышей (Microchiroptera, Chiroptera) и именно летучие мыши являются их природным резервуаром [10, 11]. Основным природным резервуаром SARS-CoV-подобных вирусов являются подковоносые летучие мыши – ринолофиды (Rhinolophus: Rhinolophidae). В КНР в циркуляцию вовлечены многие виды, но главное значение имеют китайский (R. sinicus), большой (R. ferrumequinum), средний (R. affinis) и королевский (R. rex) подковоносы [12]. В Европейских странах циркуляция родственных SARS-CoV вирусов обнаружена у большого, малого (R. hipposideros), южного (R. euryale), очкового (Rh. mehelyi) и средиземноморского (R. blasii) подковоносов [13-16]. Общую заражённость популяций подковоносов в пределах их ареала оценивают в 10%, но в некоторых колониях-пещерах это значение может достигать 60% [12, 15, 17-20]. Ареал видов – носителей SARS-CoV-подобных вирусов охватывает южные регионы России, включая Северный

Кавказ, Черноморское побережье и Крым, южные регионы азиатской части РФ.

Первичным источником инфицирования людей MERS являются одногорбые верблюды-дромадёры [21]. От верблюдов были выделены штаммы MERS-CoV, практически идентичные эпидемическим штаммам, изолированным от людей [22–24]. На основе серологических исследований показано, что вирус MERS-CoV активно циркулирует в популяциях верблюдов в Африке, Азии и на Ближнем Востоке как минимум с 1983 г. [25]. В отличие от SARS-CoV-подобных вирусов у летучих мышей пока не обнаружены вирусы, обладающие уровнем схожести, достаточным для отнесения их к одному виду с MERS-CoV. Однако описано несколько близкородственных видов вирусов, входящих вместе с MERS-CoV в подрод Merbecovirus. Резервуаром этих видов в Европе, Китае и на Ближнем Востоке являются в основном гладконосые летучие мыши (Vespertilionidae), такие как нетопыри (Pipistrellus) и кожаны (Eptesicus), всего до 14 видов. Родственные MERS-CoV виды вирусов найдены также в Африке у щелеморды (Nycteris, Nycteridae) [20].

За последние годы у различных видов рукокрылых (Chiroptera) было обнаружено множество штаммов, эволюционно близких практически ко всем известным группам коронавирусов. В циркуляцию альфа- и бетакоронавирусов вовлечены не менее 30 различных видов из 11 семейств этого отряда [20]. Это позволяет рассматривать представителей отряда Chiroptera как очень древний природный резервуар всех альфа- и бетакоронавирусов млекопитающих. Кроме коронавирусов, летучие мыши являются резервуаром и источником множества других зоонозных вирусов, включая вирусы геморрагических лихорадок Эбола, Марбург, Нипах, Хендра, а также рабдовирусов, буньявирусов и др. [26], что объясняется экологическими и биологическими особенностями этих животных. К ним относятся высокая численность и плотность по-

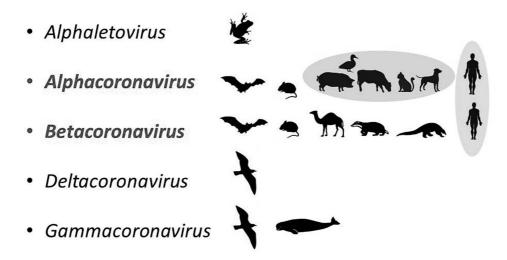


Рис. 1. Структура родов подсемейства *Orthocoronavirinae* семейства *Coronaviridae* с указанием видов животных, которых они инфицируют.

Fig. 1. List of genera of the subfamily Orthocoronavirinae of the family Coronaviridae, indicating vertebrate animals they infect.

пуляций во время днёвок и зимовок, перемешивание популяций во время ежегодных сезонных миграций, особенности биологии и иммунитета [27, 28]. В одной, часто смешанной, колонии летучих мышей могут одновременно циркулировать несколько зоонозных вирусов, которые выделяются в большом титре с фекалиями и мочой и заражают ближайших особей. Поскольку многие виды селятся непосредственно вблизи жилищ человека (и на чердаках), выделяемые ими вирусы могут или напрямую инфицировать людей и домашних животных, или же инфицировать животных, которые их ловят и поедают.

Филогения рода Betacoronavirus

К настоящему времени описаны несколько десятков бетакоронавирусов летучих мышей, филогенетически близких к зооантропонозным эпидемическим вирусам. На филогенетических деревьях эти вирусы формируют две ветви, которые представляют два подрода (Sarbecovirus и Merbecovirus) в составе рода Betacoronavirus. Геном коронавирусов представлен одной нитью РНК позитивной полярности, которая кодирует от 11 до 14 генов, включая белки полимеразного комплекса, структурные белки вириона и несколько неструктурных белков. В целом геномы вирусов летучих мышей на 75-95% схожи с геномами вирусов SARS, SARS-2 и MERS. Все они имеют схожую структуру генома, с некоторыми вариациями в составе неструктурных, вспомогательных протеинов. Генетический анализ показывает, что между известными штаммами SARS-подобных вирусов летучих мышей происходили многочисленные рекомбинации, в результате чего осуществляется постоянный обмен фрагментами различных генов.

Механизм адаптации бетакоронавирусов летучих мышей к человеку

Тропизм коронавирусов к клеткам тканей животных, которых они могут инфицировать, определяет-

ся S-протеином, который формирует на поверхности вириона характерные выросты – пепломеры. S-белок несёт специальный рецептор-связывающий домен, который расположен в N-терминальной части белка и состоит из 190 аминокислот [1]. Главные различия между SARS-CoV и близкородственными вирусами летучих мышей связаны со структурой данного домена. Это очень вариабельный регион, в котором встречаются многочисленные замены, делеции и инсерции. SARS-подобные вирусы в качестве рецептора используют ангиотензин-конвертирующий фермент-2 (АСЕ2) (рис. 2) [29]. Большинство вирусов летучих мышей не способно связывать человеческий АСЕ2-рецептор [30]. Таким образом, несмотря на высокую схожесть геномов подавляющее большинство вирусов летучих мышей не могут инфицировать клетки человека.

Изменение рецепторной специфичности у вирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2 связано с определёнными мутациями в рецептор-связывающем домене белка S [31]. Вероятно, рецепторная адаптация возможна в промежуточном хозяине, в качестве которого могли выступать циветы (в случае с SARS-CoV), панголины (в случае с SARS-2) и верблюды (в случае MERS-CoV). Адаптация SARS и SARS-2 происходила независимо друг от друга, и эти вирусы имеют разные аминокислоты в ключевых для связывания рецептора позициях. Уровень гомологии рецептор-связывающего домена между вирусами SARS-CoV и SARS-CoV-2 составляет только 75% а.к. АСЕ2-рецептор человека имеет практически одинаковый уровень отличий (82% схожести) от рецепторов летучих мышей, цивет и панголинов.

Способность связывать АСЕ2-рецептор человека, а также некоторые особенности в структуре генов *ORF3* и *ORF8*, которые, как предполагается, играют роль в патогенезе вируса, долго считались уникальными свойствами SARS-CoV. В результате масштабных исследований китайских популяций летучих мы-

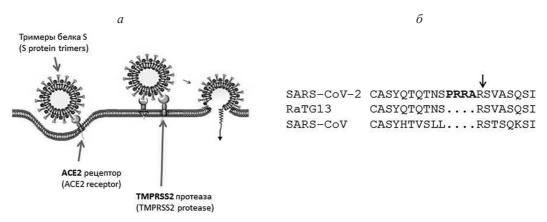


Рис. 2. Особенности вируса SARS-CoV-2: *a* − основные этапы проникновения вируса в клетку (адаптировано по G. Simmons et al. [40]); *б* − сравнение сайта нарезания S1/S2 белка S вирусов SARS-CoV, RaTG13 и SARS-CoV. Стрелкой указано место расщепления белка S клеточными протеазами. Дополнительный сайт для фуриновых протеаз PRRA вируса SARS-CoV-2 выделен жирным шрифтом.

Fig. 2. A. Features of the SARS-CoV-2 virus: *a* - schematic representation of the virus penetration into the cell (adapted from G. Simmons et al. [40]). *b* -comparison of S1/S2 cleavage site (arrow) in S protein of SARS-CoV, RaTG13 and SARS-CoV viruses. Additional site (PRRA) for cellular furin proteases is bolded.

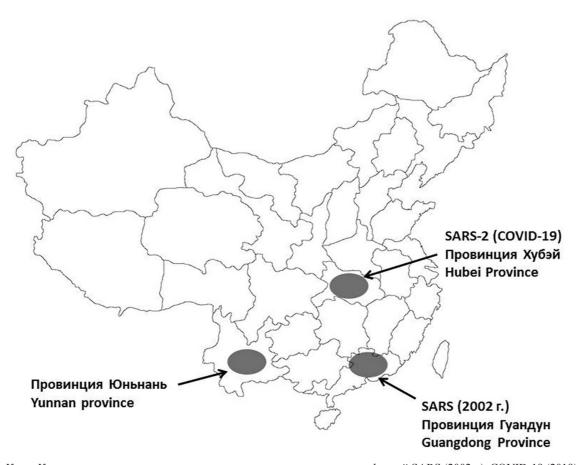


Рис. 3. Карта Китая с указанием мест возникновения новых коронавирусных инфекций SARS (2002 г.), COVID-19 (2019) г.). Указана провинция Юньнань, где в колониях китайского подковоноса (*R. sinicus*) выделены штаммы – предшественники вируса SARS-CoV. **Fig. 3.** Map of China showing the sites of origin coronavirus infections SARS (2002) and COVID-19 (2019). Yunnan province, where viruses - precursors of SARS-CoV were isolated from horseshoe bats (*R. sinicus*), are shown.

шей были изолированы несколько вирусов, схожих с SARS-CoV по структуре рецептор-связывающего домена. Было показано, что эти штаммы способны использовать рецептор и человека, и летучих мышей, и цивет для проникновения в клетку [32]. Ряд других штаммов имели схожее строение генов ORF3 и ORF8 [33, 34]. Таким образом, среди циркулирующих в колониях летучих мышей вирусов встречаются варианты, уже обладающие необходимым тропизмом и способностью инфицировать людей без необходимости дополнительной адаптации в промежуточном хозяине. Вирусы, способные использовать человеческий рецептор, и вирусы со схожим с SARS-CoV строением генов ORF3 и ORF8 были найдены пока только у китайского подковоноса (Rh. sinicus) в китайской провинции Юньнань (рис. 3). Тогда как в других провинциях и у других видов подковоносов обнаруживались только вирусы, не способные инфицировать связывать АСЕ2-рецептор человека. При этом многолетнее наблюдение за одной из пещер в данной провинции выявило в ней весь спектр вариантов вирусов, обнаруженных в других регионах КНР, что говорит о постоянном перемешивании вирусных популяций [33, 35]. Несмотря на то что вспышка SARS началась в 2002 г. в сельской местности в окрестностях г. Фошань (провинция Гуандун, КНР) и была связана с фермами и рынками животных, наиболее вероятным местом появления вируса рассматриваются колонии китайского подковоноса, в частности в провинции Юньнань, где вирус возник в результате серии рекомбинаций. Более того, серологические исследования показали, что в этой провинции в сельской местности вблизи пещер с колониями летучих мышей антитела к SARS встречаются у 2,7% жителей [36].

Вирус SARS-CoV-2 имеет только 75% схожести с вирусом SARS-CoV и, соответственно, его происхождение является независимым. Наиболее близкий к вирусу SARS-CoV-2 штамм был обнаружен в 2013 г. у среднего подковоноса (*Rh. affinis*) в провинции Юньнань (КНР) [8]. Этот штамм, названный RaTG13, имеет в среднем 96% идентичности с SARS-CoV-2 при сравнении полных геномов. При этом некоторые структурные белки RaTG13 (N, M, E, ORF8) имеют 100% совпадение с SARS-CoV-2 по аминокислотному составу. Другие близкие к SARS-CoV-2 штаммы были изолированы от малайских панголинов (*Pholoidota*) [37]. Эти вирусы также имеют высокую степень гомологии с SARS-CoV-2 (94%). Отсюда воз-

никло предположение, что именно панголины являются источником вируса SARS-CoV-2 [38]. Однако если рассматривать отдельные белки, то их схожесть оказывается несколько ниже, чем у штамма RaTG13. Вместе с тем структура рецептор-связывающего домена у вирусов панголина более близка к SARS-CoV-2, чем у вирусов летучих мышей. Таким образом, так же как и в случае с SARS-CoV, можно заключить, что предшественник SARS-CoV-2 или его отдельные гены циркулировали в популяциях подковоносов уже в 2013 г., а сам вирус появился вследствие рекомбинации между различными вирусами летучих мышей и, возможно, вирусами других животных.

Характерной особенностью вируса SARS-CoV-2, которая отличает его от других коронавирусов, является вставка дополнительного сайта нарезания для фуриновых протеаз в месте протеолитического расщепления S-протеина (см. рис. 2) [39]. Нарезание S-протеина на две субъединицы (S1 и S2) необходимо для проникновения вируса в клетку. Эту функцию выполняют клеточные сериновые (TMPRSS2) и цистеиновые (CatB/L) протеазы [40]. Привлечение дополнительных протеаз для нарезания S-протеина, вероятно, расширяет спектр чувствительных клеток и является одним из факторов патогенности вируса. Здесь вирус использует механизм, схожий с появлением высокопатогенных штаммов вируса птичьего гриппа А/ H5N1, связанных с изменением сайта протеолитического нарезания гемагглютинина [41].

В отличие от SARS-подобных вирусов, чьи непосредственные предшественники найдены в летучих мышах, вирус MERS-CoV имеет более сложную историю происхождения. Его резервуаром являются верблюды, от которых изолированы штаммы, практически идентичные эпидемическим. Вирусная популяция у верблюдов неоднородна и состоит из двух генотипов (L1 и L2), из которых только L1 (от верблюдов Ближнего Востока: Объединённые Арабские Эмираты, Саудовская Аравия, Оман, Иордания) инфицируют людей. Тогда как вирусы генотипа L2 (Северная Африка) инфекции у человека не вызывают. Филогенетические исследования показывают, что MERS-CoV эволюционно происходит от вирусов летучих мышей, с которыми он обладает до 85% схожести при сравнении полных геномов [42, 43]. Вирус MERS использует для связывания с клеткой рецептор DPP4 (CD26) [44]. Схожесть рецептор-связывающего домена у MERS-CoV с вирусами летучих мышей составляет только 60-70% а.к. Различия в рецептор-связывающем домене S-белка определяют торопизм вируса к клеткам определённых видов [45].

Таким образом, основным механизмом адаптации зоонозных бетакоронавирусов к человеку являются мутации в рецептор-связывающем домене поверхностного белка S, определяемые высокой генетической изменчивостью коронавирусов, их способностью к рекомбинации, а также экологическими особенностями их природного резервуара – летучих мышей. Появление зооантропонозных вирусов SARS-CoV, SARS-CoV-2 и MERS связано с эволюционными процессами, протекающими непосредственно в популяциях лету-

чих мышей, и с их дальнейшей передачей человеку или напрямую или через промежуточных хозяев.

Генетическая изменчивость вируса SARS-CoV-2 (COVID-19) во время пандемии

Попав в человеческую популяцию, вирус SARSначал стремительно распространяться по странам и континентам. Сравнительный анализ генетических данных, полученных из разных стран, показывает, что вирусная популяция остаётся относительно гомогенной. К настоящему времени в мире секвенировано более 10 000 штаммов (https://www. gisaid.org/). При этом максимальная разница между ними составляет до 20 нуклеотидных замен по всей длине генома. Рассчитанная скорость накопления мутаций вируса сопоставима с таковой у других РНК-содержащих вирусов, но несколько ниже, чем у вирусов гриппа. Анализ накопления мутаций и рассчитанная скорость изменчивости позволили сделать важный вывод: все циркулирующие в настоящее время штаммы происходят из одного источника, т.е. проникновение вируса в человеческую популяцию было единичным событием. А первый штамм, от которого происходят все остальные варианты, появился в КНР в период с середины октября до середины ноября 2019 г., т.е. в период осенней миграции летучих мышей. Таким образом, эволюция вируса в настоящее время интенсивно продолжается, начинают формироваться его географические варианты, которые, возможно, лягут в основу его будущей гетерогенности.

Заключение

Пандемия COVID-19 – частный случай проблемы новых и возвращающихся инфекций (emerging and reemerging infections). Все возбудители вирусных инфекций проникли в популяцию людей от животных. Процесс происходил на протяжении по крайней мере 10 тыс. лет и будет продолжаться в обозримом будущем [27, 28, 46]. Возникающие новые инфекции зоонозного происхождения, подобные COVID-19, пандемии гриппа A(H1N1)pdm09 и др., служат причиной непредсказуемых эпидемических катаклизмов с тяжёлыми последствиями. Именно поэтому в Советском Союзе существовала мощная система мониторинга вирусных популяций в различных экосистемах, направленная на минимизацию последствий чрезвычайных ситуаций, возникающих, в частности, в связи с пандемиями гриппа [47]. Возобновление подобной системы с использованием современных методов анализа вирусных геномов для мониторинга генофондов вирусных популяций необходимо на национальном и международном уровнях [48].

ЛИТЕРАТУРА

 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.

- 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), ассоци- ированной с вирусом 2019-пСоV (Nidovirales, Coronaviridae, Coronavirinae, Betacoronavirus, подрод Sarbecovirus): уроки эпидемии SARS-CoV. Вопросы вирусологии. 2020; 65(1): 6-16. DOI: http://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-6-15
- Hamre D., Procknow J.J. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1966; 121(1): 190-3. DOI: http://doi.org/10.3181/00379727-121-30734
- McIntosh K., Dees J.H., Becker W.B., Kapikian A.Z., Chanock R.M. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1967; 57(4): 933-40. DOI: http://doi.org/10.1073/pnas.57.4.933
- 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
- Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A., et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. N. Engl. J. Med. 2012; 367(19): 1814-20. DOI: http://doi.org/10.1056/NEJMoa1211721
- Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(8): 727-33.
 DOI: http://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017
- Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579(7798): 270-3.
 DOI: http://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7
- Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020; 395(10224): 565-74. DOI: http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8
- 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
- 11. 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
 Fan Y., Zhao K., Shi Z.L., Zhou P. Bat coronaviruses in China. *Viruses*. 2019; 11(3): pii E210.
 DOI: http://doi.org/10.3390/v11030210
- Rihtaric D., Hostnik P., Steyer A., Grom J., Toplak I. Identification of SARS-like coronaviruses in horseshoe bats (Rhinolophus hipposideros) in Slovenia. Arch. Virol. 2010; 155(4): 507-14. DOI: http://doi.org/10.1007/s00705-010-0612-5
- Ar Gouilh M., Puechmaille S.J., Diancourt L., Vandenbogaert M., Serra-Cobo J., Lopez Roïg M., et al. SARS-CoV related Betacoronavirus and diverse Alphacoronavirus members found in western old-world. *Virology*. 2018; 517: 88-97.
 DOI: http://doi.org/10.1016/j.virol.2018.01.014
- Balboni A., Palladini A., Bogliani G., Battilani M. Detection of a virus related to betacoronaviruses in Italian greater horseshoe bats. *Epidemiol. Infect.* 2011; 139(2): 216-9. DOI: http://doi.org/10.1017/S0950268810001147
- Drexler J.F., Gloza-Rausch F., Glende J., Corman V.M., Muth D., Goettsche M., et al. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J. Virol.* 2010; 84(21): 11336-49. DOI: http://doi.org/10.1128/jvi.00650-10
- Donaldson E.F., Haskew A.N., Gates J.E., Huynh J., Moore C.J., Frieman M.B. Metagenomic analysis of the viromes of three North American bat species: viral diversity among different bat species that share a common habitat. *J. Virol.* 2010; 84(24): 13004-18. DOI: http://doi.org/10.1128/JVI.01255-10
- 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
- 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

- Drexler J.F., Corman V.M., Drosten C. Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. *Antiviral Res.* 2014; 101: 45-56.
 DOI: http://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2013.10.013
- Haagmans B.L., Al Dhahiry S.H.S., Reusken C.B.E.M., Raj V.S., Galiano M., Myers R., et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus in dromedary camels: An outbreak investigation. *Lan*cet Infect. Dis. 2014; 14(2): 140-5.
 DOI: http://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70690-X
- Sabir J.S., Lam T.T., Ahmed M.M., Li L., Shen Y., Abo-Aba S.E., et al. Co-circulation of three camel coronavirus species and recombination of MERS-CoVs in Saudi Arabia. *Science*. 2016; 351(6268): 81-4. DOI: http://doi.org/10.1126/science.aac8608
- Raj V.S., Farag E.A., Reusken C.B., Lamers M.M., Pas S.D., Voermans J., et al. Isolation of MERS coronavirus from dromedary camel, Qatar, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(8): 1339-42. DOI: http://doi.org/10.3201/eid2008.140663
- Paden C.R., Yusof M.F.B.M., Al Hammadi Z.M., Queen K., Tao Y., Eltahir Y.M., et al. Zoonotic origin and transmission of Middle East respiratory syndrome coronavirus in the UAE. *Zoonoses Public Health*. 2018; 65(3): 322-33.
 DOI: http://doi.org/10.1111/zph.12435
- Müller M.A., Corman V.M., Jores J., Meyer B., Younan M., Liljander A., et al. MERS coronavirus neutralizing antibodies in camels, eastern Africa, 1983-1997. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(12): 2093-5. DOI: http://doi.org/10.3201/eid2012.141026
- Calisher C.H., Childs J.E., Field H.E., Holmes K.V., Schountz T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19(3): 531-45.
 DOI: http://doi.org/10.1128/CMR.00017-06
- Lvov D.K., Shchelkanov M.Y., Alkhovsky S.V., Deryabin P.G. Zoonotic Viruses of Northern Eurasia. Taxonomy and Ecology. London: Academic Press, Elsevier; 2015.
- 28. Львов Д.К. Экология вирусов. В кн.: Львов Д.К., ред. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. М.: МИА; 2013: 66-86.
- Li W., Moore M.J., Vasllieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 2003; 426(6965): 450-4. DOI: http://doi.org/10.1038/nature02145
- Ren W., Qu X., Li W., Han Z., Yu M., Zhou P., et al. Difference in receptor usage between severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and SARS-like coronavirus of bat origin. *J. Virol.* 2008; 82(4): 1899-907.
 - DOI: http://doi.org/10.1128/jvi.01085-07
- Wan Y., Shang J., Graham R., Baric R.S., Li F. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virol.* 2020; 94(7): pii e00127-20.
 DOI: http://doi.org/10.1128/jvi.00127-20
- Ge X.Y., Li J.L., Yang X.L., Chmura A.A., Zhu G., Epstein J.H., et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*. 2013; 503(7477): 535-8. DOI: http://doi.org/10.1038/nature12711
- Lau S.K., Feng Y., Chen H., Luk H.K., Yang W.H., Li K.S., et al. Severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus ORF8 protein is acquired from SARS-related coronavirus from greater horseshoe bats through recombination. *J. Virol.* 2015; 89(20): 10532-47. DOI: http://doi.org/10.1128/jvi.01048-15
- Hu B., Zeng L.P., Yang X.L., Ge X.Y., Zhang W., Li B., et al. Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLoS Pathog.* 2017; 13(11): e1006698.
 DOI: http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006698
- Ge X.Y., Wang N., Zhang W., Hu B., Li B., Zhang Y.Z., et al. Co-existence of multiple coronaviruses in several bat colonies in an abandoned mineshaft. *Virol. Sin.* 2016; 31(1): 31-40. DOI: http://doi.org/10.1007/s12250-016-3713-9
- Wang N., Li S.Y., Yang X.L., Huang H.M., Zhang Y.J., Guo H., et al. Serological evidence of bat SARS-related coronavirus infection in humans, China. *Virol. Sin.* 2018; 33(1): 104-7. DOI: http://doi.org/10.1007/s12250-018-0012-7
- Lam T.T., Shum M.H., Zhu H.C., Tong Y.G., Ni X.B., Liao Y.S., et al. Identifying SARS-CoV-2 related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*. 2020.

- DOI: http://doi.org/10.1038/s41586-020-2169-0
- 38. Zhang T., Wu Q., Zhang Z. Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. *Curr. Biol.* 2020; 30(7): 1346-51.e2.
 - DOI: http://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.022 Coutard B., Valle C., de Lamballerie X., Canard B., Seidah
- Coutard B., Valle C., de Lamballerie X., Canard B., Seidah N.G., Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res.* 2020; 176: 104742.
 DOI: http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104742
- Simmons G., Zmora P., Gierer S., Heurich A., Pöhlmann S. Proteolytic activation of the SARS-coronavirus spike protein: Cutting enzymes at the cutting edge of antiviral research. *Antiviral Res.* 2013; 100(3): 605-14.
 - DOI: http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.028
- Claas E.C.J., Osterhaus A.D., van Beek R., De Jong J.C., Rimmelzwaan G.F., Senne D.A., et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet*. 1998; 351(9101): 472-7.
 DOI: http://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)11212-0
- Corman V.M., Ithete N.L., Richards L.R., Schoeman M.C., Preiser W., Drosten C., et al. Rooting the phylogenetic tree of Middle East respiratory syndrome coronavirus by characterization of a conspecific virus from an African bat. *J. Virol.* 2014; 88(19): 11297-303. DOI: http://doi.org/10.1128/jvi.01498-14
- Yang L., Wu Z., Ren X., Yang F., Zhang J., He G., et al. MERS-related betacoronavirus in Vespertilio superans bats, China. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(7): 1260-2.
 DOI: http://doi.org/10.3201/eid2007.140318
- Raj V.S., Mou H., Smits S.L., Dekkers D.H., Müller M.A., Dijkman R., et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature*. 2003; 495(7440): 251-4. DOI: http://doi.org/10.1038/nature12005
- van Doremalen N., Miazgowicz K.L., Milne-Price S., Bushmaker T., Robertson S., Scott D., et al. Host species restriction of middle East respiratory syndrome coronavirus through its receptor, dipeptidyl peptidase 4. *J. Virol.* 2014; 88(16): 9220-32. DOI: http://doi.org/10.1128/JVI.00676-14
- Львов Д.К. Рождение и развитие вирусологии история изучения новых и возвращающихся инфекций. Вопросы вирусологии. 2012; (S1): 5-20.
- Львов Д.К., ред. Методические рекомендации. Организация эколого-эпидемиологического мониторинга территорий Российской Федерации с целью противоэпидемической защиты населения и войск. М.; 1993.
- Львов Д.К., Борисевич С.В., Альховский С.В., Бурцева Е.И. Актуальные подходы к анализу вирусных геномов в интересах биобезопасности. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2019; 8(2): 96-101.
 - DOI: http://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-12012

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., Al'khovskiy S.V., Kolobukhina L.V., Burtseva E.I. Etiology of epidemic outbreaks covid-19 in Wuhan (Hubei province, People's Republic of China) associated with 2019-nCoV (Nidovirales, Coronaviridae, Coronavirinae, Betacoronavirus, subgenus Sarbecovirus): lessons of SARS-CoV outbreak. *Voprosy virusologii*. 2020; 65(1): 6-16. DOI: http://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-6-15 (in Russian)
- Hamre D., Procknow J.J. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1966; 121(1): 190-3. DOI: http://doi.org/10.3181/00379727-121-30734
- McIntosh K., Dees J.H., Becker W.B., Kapikian A.Z., Chanock R.M. Recovery in tracheal organ cultures of novel viruses from patients with respiratory disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1967; 57(4): 933-40. DOI: http://doi.org/10.1073/pnas.57.4.933
- 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
- Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A., et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367(19): 1814-20. DOI: http://doi.org/10.1056/NEJMoa1211721
 Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., et al. A novel
- Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. N. Engl. J. Med. 2020; 382(8): 727-33.
 - DOI: http://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017
- Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579(7798): 270-3.
 DOI: http://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7
- Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020; 395(10224): 565-74.
 DOI: http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8
- 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
- 11. 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.
- DOÌ: http://doi.org/10.1126/science.1118391
 Fan Y., Zhao K., Shi Z.L., Zhou P. Bat coronaviruses in China. *Viruses*. 2019; 11(3): pii E210.
 DOI: http://doi.org/10.3390/v11030210
- Rihtaric D., Hostnik P., Steyer A., Grom J., Toplak I. Identification of SARS-like coronaviruses in horseshoe bats (Rhinolophus hipposideros) in Slovenia. *Arch. Virol.* 2010; 155(4): 507-14. DOI: http://doi.org/10.1007/s00705-010-0612-5
- Ar Gouilh M., Puechmaille S.J., Diancourt L., Vandenbogaert M., Serra-Cobo J., Lopez Roïg M., et al. SARS-CoV related Betacoronavirus and diverse Alphacoronavirus members found in western old-world. *Virology*. 2018; 517: 88-97. DOI: http://doi.org/10.1016/j.virol.2018.01.014
- Balboni A., Palladini A., Bogliani G., Battilani M. Detection of a virus related to betacoronaviruses in Italian greater horseshoe bats. *Epidemiol. Infect.* 2011; 139(2): 216-9.
 DOI: http://doi.org/10.1017/S0950268810001147
- Drexler J.F., Gloza-Rausch F., Glende J., Corman V.M., Muth D., Goettsche M., et al. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J. Virol.* 2010; 84(21): 11336-49.
 DOI: http://doi.org/10.1128/jvi.00650-10
- Donaldson E.F., Haskew A.N., Gates J.E., Huynh J., Moore C.J., Frieman M.B. Metagenomic analysis of the viromes of three North American bat species: viral diversity among different bat species that share a common habitat. *J. Virol.* 2010; 84(24): 13004-18. DOI: http://doi.org/10.1128/JVI.01255-10
- 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
- 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
- Drexler J.F., Corman V.M., Drosten C. Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. *Antiviral Res.* 2014; 101: 45-56.
 DOI: http://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2013.10.013
- Haagmans B.L., Al Dhahiry S.H.S., Reusken C.B.E.M., Raj V.S., Galiano M., Myers R., et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus in dromedary camels: An outbreak investigation. *Lancet Infect. Dis.* 2014; 14(2): 140-5. DOI: http://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70690-X
- Sabir J.S., Lam T.T., Ahmed M.M., Li L., Shen Y., Abo-Aba S.E., et al. Co-circulation of three camel coronavirus species and recombination of MERS-CoVs in Saudi Arabia. *Science*. 2016; 351(6268): 81-4. DOI: http://doi.org/10.1126/science.aac8608

- Raj V.S., Farag E.A., Reusken C.B., Lamers M.M., Pas S.D., Voermans J., et al. Isolation of MERS coronavirus from dromedary camel, Qatar, 2014. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(8): 1339-42.
 DOI: http://doi.org/10.3201/eid2008.140663
- Paden C.R., Yusof M.F.B.M., Al Hammadi Z.M., Queen K., Tao Y., Eltahir Y.M., et al. Zoonotic origin and transmission of Middle East respiratory syndrome coronavirus in the UAE. *Zoonoses Public Health*. 2018; 65(3): 322-33.
 DOI: http://doi.org/10.1111/zph.12435
- Müller M.A., Corman V.M., Jores J., Meyer B., Younan M., Liljander A., et al. MERS coronavirus neutralizing antibodies in camels, eastern Africa, 1983-1997. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(12): 2093-5. DOI: http://doi.org/10.3201/eid2012.141026
- Calisher C.H., Childs J.E., Field H.E., Holmes K.V., Schountz T. Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19(3): 531-45.
 DOI: http://doi.org/10.1128/CMR.00017-06
- Lvov D.K., Shchelkanov M.Y., Alkhovsky S.V., Deryabin P.G. Zoonotic Viruses of Northern Eurasia. Taxonomy and Ecology. London: Academic Press, Elsevier; 2015.
- 28. L'vov D.K. Ecology of viruses. 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: 66-86. (in Russian)
- Li W., Moore M.J., Vasllieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 2003; 426(6965): 450-4. DOI: http://doi.org/10.1038/nature02145
- Ren W., Qu X., Li W., Han Z., Yu M., Zhou P., et al. Difference in receptor usage between severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and SARS-like coronavirus of bat origin. *J. Virol.* 2008; 82(4): 1899-907.
 DOI: http://doi.org/10.1128/jvi.01085-07
- Wan Y., Shang J., Graham R., Baric R.S., Li F. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virol.* 2020; 94(7): pii e00127-20. DOI: http://doi.org/10.1128/jvi.00127-20
- Ge X.Y., Li J.L., Yang X.L., Chmura A.A., Zhu G., Epstein J.H., et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*. 2013; 503(7477): 535-8. DOI: http://doi.org/10.1038/nature12711
- Lau S.K., Feng Y., Chen H., Luk H.K., Yang W.H., Li K.S., et al. Severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus ORF8 protein is acquired from SARS-related coronavirus from greater horseshoe bats through recombination. *J. Virol.* 2015; 89(20): 10532-47. DOI: http://doi.org/10.1128/jvi.01048-15
- Hu B., Zeng L.P., Yang X.L., Ge X.Y., Zhang W., Li B., et al. Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLoS Pathog.* 2017; 13(11): e1006698.
 DOI: http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006698
- Ge X.Y., Wang N., Zhang W., Hu B., Li B., Zhang Y.Z., et al. Co-existence of multiple coronaviruses in several bat colonies in an abandoned mineshaft. *Virol. Sin.* 2016; 31(1): 31-40. DOI: http://doi.org/10.1007/s12250-016-3713-9

- Wang N., Li S.Y., Yang X.L., Huang H.M., Zhang Y.J., Guo H., et al. Serological evidence of bat SARS-related coronavirus infection in humans, China. *Virol. Sin.* 2018; 33(1): 104-7. DOI: http://doi.org/10.1007/s12250-018-0012-7
- Lam T.T., Shum M.H., Zhu H.C., Tong Y.G., Ni X.B., Liao Y.S., et al. Identifying SARS-CoV-2 related coronaviruses in Malayan pangolins. *Nature*. 2020.
- DOI: http://doi.org/10.1038/s41586-020-2169-0
 38. Zhang T., Wu Q., Zhang Z. Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak. *Curr. Biol.* 2020; 30(7): 1346-51.e2.
 - DOI: http://doi.org/10.1016/j.cub.2020.03.022
- Coutard B., Valle C., de Lamballerie X., Canard B., Seidah N.G., Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade. *Antiviral Res.* 2020; 176: 104742. DOI: http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104742
- Simmons G., Zmora P., Gierer S., Heurich A., Pöhlmann S. Proteolytic activation of the SARS-coronavirus spike protein: Cutting enzymes at the cutting edge of antiviral research. *Antiviral Res.* 2013; 100(3): 605-14.
 - DOI: http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.028
- 41. Claas E.C.J., Osterhaus A.D., van Beek R., De Jong J.C., Rimmelzwaan G.F., Senne D.A., et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet*. 1998; 351(9101): 472-7.
- DOI: http://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)11212-0
 12. Corman V.M., Ithete N.L., Richards L.R., Schoeman M.C., Preiser W.,
- Drosten C., et al. Rooting the phylogenetic tree of Middle East respiratory syndrome coronavirus by characterization of a conspecific virus from an African bat. *J. Virol.* 2014; 88(19): 11297-303. DOI: http://doi.org/10.1128/jvi.01498-14
- Yang L., Wu Z., Ren X., Yang F., Zhang J., He G., et al. MERS-related betacoronavirus in Vespertilio superans bats, China. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(7): 1260-2.
 DOI: http://doi.org/10.3201/eid2007.140318
- Raj V.S., Mou H., Smits S.L., Dekkers D.H., Müller M.A., Dijkman R., et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature*. 2003; 495(7440): 251-4. DOI: http://doi.org/10.1038/nature12005
- van Doremalen N., Miazgowicz K.L., Milne-Price S., Bushmaker T., Robertson S., Scott D., et al. Host species restriction of middle East respiratory syndrome coronavirus through its receptor, dipeptidyl peptidase 4. *J. Virol.* 2014; 88(16): 9220-32.
 DOI: http://doi.org/10.1128/JVI.00676-14
- L'vov D.K. Birth and development of Virology the history of emerging-reemerging viral infection investigation. *Voprosy viruso-logii*. 2012; (S1): 5-20. (in Russian)
- 47. L'vov D.K., ed. Guidelines. Organization of environmental and epidemiological monitoring of the territories of the Russian Federation with the aim of anti-epidemic protection of the population and troops. Moscow; 1993. (in Russian)
- L'vov D.K., Borisevich S.V., Al'khovskiy S.V., Burtseva E.I. Relevant approaches to 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)

REV/IEW/

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020



Современное состояние проблемы прионных болезней и причины их опасности для человека и животных

Зуев В.А., Кальнов С.Л., Куликова Н.Ю., Гребенникова Т.В.

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

В обзоре представлено современное состояние проблемы прионов и прионных болезней с акцентом на эпидемическую и эпизоотическую опасность возбудителей, вызывающих смертельные нейродегенеративные болезни человека и животных. Описаны результаты молекулярно-генетических исследований конверсии нормальных молекул прионного белка (PrP°) в их инфекционные формы (PrPd), устойчивость последних к физическим методам дезинфекции, особенно к высоким температурам, а также их способность преодолевать межвидовые барьеры, увеличивая при этом вирулентность. Подчёркнуты необычно продолжительный инкубационный период, возможность заражения не только алиментарным путём, — при употреблении в пищу даже термически обработанного мяса заражённых животных, но и вследствие хирургических вмешательств, особенно нейрохирургических и офтальмологических, а также в результате использования иммунобиологических препаратов. Отсутствие средств лечения прионных болезней обосновывает крайнюю необходимость разработки отечественных высокочувствительных тест-систем, способных эффективно обнаруживать инфекционный прионный белок прижизненно, на доклинической стадии заболевания. Кратко описаны новейшие методы автоматической белковой амплификации и идентификации прионных белков как наиболее перспективные направления исследований в области диагностики прионных болезней.

Ключевые слова: обзор; инфекционный прионный белок PrP^d ; термостабильность; конверсия.

Для цитирования: Зуев В.А., Кальнов С.Л., Куликова Н.Ю., Гребенникова Т.В. Современное состояние проблемы прионных болезней и причины их опасности для человека и животных. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(2): 71-76. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-71-76

Для корреспонденции: Зуев Виктор Абрамович, д-р мед. наук, проф., глав. науч. сотр. ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва. E-mail: zuev.factor@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: сбор и обработка материалов – Зуев В.А., Кальнов С.Л.; написание текста – Зуев В.А., Кальнов С.Л., Гребенникова Т.В.; заключение, научное редактирование – Гребенникова Т.В.; резюме, общая редакция – Куликова Н.Ю.

Поступила 18.03.2020 Принята в печать 31.03.2020

Prion diseases and the biosecurity problems

Victor A. Zuev, Sergey L. Kalnov, Nadezhda Yu. Kulikova, Tatyana V. Grebennikova

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

The review presents the current state of the problem of prions and prion diseases with an emphasis on the epidemiological and epizootological risks of pathogens that cause fatal neurodegenerative diseases in humans and animals. The results of molecular genetic studies of the conversion of normal PrP° prion protein molecules to infectious forms of PrPd, resistance to physical disinfection methods, in particular exceptional thermal stability, and their ability to overcome interspecific barriers, while increasing virulence, are described. The possibility of infection not only by nutrition, when eating even heat-treated meat of sick animals, but also due to surgical interventions, especially neurosurgical and ophthalmic, as well as the use of immunobiological preparations, are emphasized. Since there are currently no means for the effective treatment of prion diseases in the world, attention is drawn to the high degree of relevance for the biosafety of the country to develop domestic highly sensitive test systems that can effectively detect prion infectious protein *in vivo* at the preclinical stage of the disease. The latest methods of automatic protein amplification and identification of prion proteins are briefly described as the most promising areas of research in the field of diagnosis of prion diseases.

Keywords: review; proteinaceous infectious particle PrPd; conversion; thermal stability.

For citation: Zuev V.A., Kalnov S.L., Kulikova N.Yu., Grebennikova T.V. Prion diseases and the biosecurity problems. *Voprosy Virusologii* (*Problems of Virology.*). 2020; 65(2): 71-76. (In Russian). DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-71-76

ОБЗОРЫ

For correspondence: Victor A. Zuev, MD, PhD, DSc, Professor, Chief Scientist of the National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia. E-mail: zuev.factor@mail.ru

Information about the authors:

Zuev V.A., https://orcid.org/0000-0002-7371-6662 Kalnov S.L., https://orcid.org/0000-0002-3130-4790 Kulikova N.Yu., https://orcid.org/0000-0002-3008-3383 Grebennikova T.V., https://orcid.org/0000-0002-6141-9361

Acknowledgments. The study had no sponsorship. Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Contribution: collection and processing of materials – Zuev V.A., Kalnov S.L.; spelling text – Zuev V.A., Kalnov S.L., Grebennikova T.V.; conclusion, scientific editing -- Grebennikova T.V.; Summary, general edition – Kulikova N.Yu.

Received 18 March 2020 Accepted 31 March 2020

В 2020 г. исполнилось 38 лет открытию этиологии группы особо опасных «медленных» инфекций прионных болезней (ПБ) человека и животных. Установление роли инфекционного прионного белка (PrPd), как единственного фактора патогенности ПБ [1], оказалось шокирующим для научной общественности, но впоследствии изменило подходы к исследованиям даже таких конформационных болезней, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, диабет и других, патогенез которых характеризуется выраженным амилоидообразованием. Главный вывод пионерной работы лаборатории S. Prusiner и соавт. [1, 2] заключался в том, что единственным этиологическим агентом наиболее широко распространённой ПБ – скрепи овец – является только высокоочищенный белок. Данный факт, установленный впервые и противоречивший генетической парадигме, - о безусловной необходимости содержания одной или обеих нуклеиновых кислот (РНК/ДНК) в составе любого инфекционного агента, будь то вирусы, бактерии или простейшие, - породил многолетние исследования, имевшие целью опровергнуть высказанную гипотезу.

Однако все эти попытки, хотя и отсрочили получение S. Prusiner Нобелевской премии до 1997 г. (он был вторым после D. Gajdusek за открытия в области ПБ), но, тем не менее, даже внесли существенный вклад в патогенез ПБ [3]. Вместе с тем коллеги и последователи S. Prusiner в лабораториях разных стран более 25 лет совершенствовали доказательную базу «белковой гипотезы», расширяя методы диагностики ПБ и тем окончательно подтверждая её. Так, в 2018 г. были получены инфекционные рекомбинантные изоформы PrP^d в бесклеточной системе *in vitro* со строго фиксированными реагентами, не содержащими нуклеиновых кислот [4]. За прошедшие годы накоплены значительные знания о биологии прионных белков и о патогенезе вызываемых ими болезней, первоначально на основе патогенетического сходства объединённых в понятие «трансмиссивных губкообразных энцефалопатий», а также был определён круг мишеней, поражаемых данными этиологическими агентами [5]. И именно в связи с открытием прионов вызываемые ими заболевания получили этиологическое название «прионные болезни», к лечению которых, к сожалению, до сих пор нет подходов.

В организме млекопитающих прионный белок может существовать в двух изоформах, т.е. в здоровом организме неинфекционный прионный белок, обозначенный как «нормальный» или «клеточный» (PrPc, cellular), имеет ту же молекулярную массу и также состоит из 253 аминокислот, но отличается от инфекционного лишь по своей третичной и даже четвертичной структуре [6]. Инфекционный прионный белок сначала обозначали как PrP^{Sc} , где апостроф Sc использовался в связи с наибольшим распространением в природе ПБ скрепи у овец. Однако в современной литературе чаще используют более короткий апостроф d, как символ слова disease (болезнь). Предположительно, нормальный прионный белок PrP^c поддерживает сохранность нейронов и глии, играет важную роль в эмбриогенезе, плюрипотенции и дифференциации эмбриональных стволовых клеток, участвует в процессах мышечной регенерации, поддержании циркадианных (околосуточных) ритмов [7, 8]. Процесс пространственных изменений, т.е. третичной или четвертичной структуры в молекуле PrP^c и превращение его в инфекционный PrP^d, носит название «конформационного перехода» или конверсии [9]. Патогенная изоформа приона представляет собой инфекционный белок с молекулярной массой 27-30 кДа, устойчивый к действию ультрафиолета, ультразвука, проникающей радиации и, что очень важно, к кипячению, и даже к фламбированию (при сжигании образца, содержащего PrPd, в течение 10 мин, в нём сохраняется 10% инфекционной активности). S. Prusiner обозначил обнаруженный им этиологический агент как «инфекционный прионный белок» и в качестве инфекционной единицы предложил термин «прион» (prion) как анаграмму английских слов proteinaceous infectious (particles). В зарубежной литературе встречаются сокращения с указанием на прионы, полученные от конкретного вида, т.е. из тканей определенного животного или человека (PrPSc, PrPBSE, PrPCJD, PrPCWD, PrPCSE – от овец, коров, человека, оленей, кошек).

Характерна устойчивость патогенных изоформ прионов к протеазе K, что длительное время считали

патогномоничным признаком инфекционного приона [1–3] и обозначали как PrPres (resistant). А недавно были открыты патогенные изоформы, чувствительные к протеолизу эндопептидазой К и обозначенные как PrPsens (sensitive). Установлено, что инфекционные изоформы PrPd в ходе патогенеза преобразуют путём конверсии нормальные клеточные мономеры белков PrPc в PrPd-подобные олигомеры (фолдинг) и далее в протофибриллы, которые, в свою очередь, формируют амилоидные бляшки, поражающие нейроны и клетки глии головного мозга, вызывая губкообразную вакуолизацию мозга и гибель всего организма [1–5].

Накопление клеточного прионного белка PrP^c является результатом экспрессии гена *PRNP* (хромосома 20 у человека). У различных видов животных длина его полипептидной цепи изменяется слабо: от 252 аминокислотных остатков (а.о.) у кролика до 264 а.о. у крупного рогатого скота (КРС). Наличие на N-конце белковой молекулы PrP^c 22-членной сигнальной последовательности обеспечивает котрансляционный перенос новообразующейся полипептидной цепи через мембрану эндоплазматического ретикулума (ЭР). При прохождении полипептидной цепи через канал (SEC61) в стенке мембраны ЭР происходят удаление лидерной сигнальной последовательности, а также свёртывание молекулы в глобулу и её ковалентная модификация. Два сайта N-гликозилирования типа Asn-Ile-Thr и Asn-Phe-Thr расположены у 181 и 197 а.о. соответственно (прионный белок человека). Распределение ди-, моно- и негликозилированных форм приона может варьировать как у различных организмов одного вида, так и в пределах одного организма. Гликозилированные формы белка также разнообразны, что позволяет выделить около 400 различных гликоформ PrP^c. Установлен ряд фактов, свидетельствующих о влиянии степени гликозилирования прионных белков на эффективность трансмиссии ПБ, а также на процесс образования различных штаммов возбудителя ПБ. Предпосылкой к подобной множественности гликоформ прионной молекулы, возможно, служит способность к формированию белком политопных мембранных форм. Обнаружено, что прионный белок человека может существовать в трёх формах: секретируемой (secPrP), мембранной с двумя трансмембранными доменами и свободным N-концом в люмене ЭР (NtmPrP), мембранной с двумя трансмембранными доменами и свободным С-концом в люмене ретикулума (CtmPrP). Подвижные трансмембранные комплексы нормальных прионных молекул образуют так называемые плоты (rafts) или рецепторные комплексы, через которые взаимодействуют с патогенной изоформой PrPd [10].

Природные и индуцированные мутации в гидрофобной последовательности, расположенной в средней части молекулы, вблизи неё, а также в области N-концевого участка, приводят к увеличению доли ^{Сtm}PrP, который вызывает нейродегенеративные заболевания. Установлен ряд фактов, свидетельствующих о влиянии степени гликозилирования прионных

белков на эффективность трансмиссии ПБ, а также на процесс образования различных штаммов возбудителя ПБ. К настоящему времени описано более 30 возможных мутаций прионного белка человека, из них большая часть достоверно связана с наследственными прионными заболеваниями. Вместе с инфекционной изоформой они не превышают 10–20% всех зарегистрированных случаев ПБ, остальные приходятся на спорадическую форму болезни Крейтцфельда — Якоба (БКЯ) [10, 11].

В 1986 г. эпизоотии прионного заболевания КРС, или «коровьего бешенства», в Великобритании привели опосредованно к возникновению нового варианта БКЯ среди людей (нвБКЯ), с многолетними тяжёлыми последствиями для многих стран мира [8–10]. Высокая термостабильность инфекционного прионного белка, попавшего в мясо-костную муку, широко использовавшуюся в качестве кормовой добавки скоту, стала причиной развития варианта ПБ, подобного куру, выявленному в 1957 г. D. Gajdusek и V. Zigas у папуасов-каннибалов Новой Гвинеи [12]. Последовавшие активные молекулярно-генетические исследования значения инфекционного прионного белка в изучении функции белковых структур in vitro и in vivo в зависимости от их конформационного состояния, а именно ключевой роли «складкообразования» (folding) и последующей олигомеризации и фибрилизации мономерных молекул PrPd, позволили сформировать экспериментальные модели «конформационных болезней» [9, 15, 16]. Сегодня практически установлено, как «цепная реакция» конверсии нормальных молекул PrPc, индуцированная взаимодействием с «затравкой» (seed), может приводить к образованию амилоидных структур и вызывать патологический процесс и в других тканях или органах [13–15]. В этот период также было доказано, что наиболее агрессивная форма нвБКЯ, отличающаяся коротким инкубационным периодом (до нескольких месяцев) и поражающая молодых людей до 30 лет, вызвана употреблением мясопродуктов от заражённых коров [17], т.е. заражение происходит алиментарным путём.

Подводя итог вышесказанному, следует зафиксировать установленные и экспериментально доказанные признаки летальных и особо опасных прионных инфекционных заболеваний (см. таблицу). ПБ представляют собой группу нейродегенеративных заболеваний животных и человека, вызываемых инфекционными изоформами одного из белков организма-хозяина, названного прионом (PrP) и кодируемого клеточным геномом. В настоящее время термин PrP используют как для обозначения изоформы белка, образующейся при нормальном метаболизме клеток (PrPc), так и его патологической (инфекционной) изоформы (PrPd), вызывающей ПБ у человека и разных видов животных. Отличительными особенностями PrP^d являются, во-первых, его способность перестраивать по собственному подобию молекулы PrPc, а во-вторых, высокая резистентность к протеиназам, позволяющая PrPd накапливаться в виде практически ОБЗОРЫ

нерастворимых агрегатов (олигомеров и протофибрилл) в клетках и межклеточном пространстве организма-хозяина, что приводит к болезни и смерти. Для ПБ существуют как внутри-, так и межвидовая передача PrP^d. До настоящего времени в мировой практике диагностика ПБ человека и животных осуществляется посмертно путём выявления PrP^d в тканях головного или спинного мозга с помощью гистологического, иммуногистохимического, иммуноферментного, иммунохроматографического методов и иммуноблоттинга. При этом лишь немногие системы диагностики ПБ достигли уровня коммерческих продуктов. Все они рассчитаны на посмертную диагностику ПБ и не отличаются высокой надёжностью.

В России отечественные аналоги тест-систем для диагностики ПБ отсутствуют. Между тем передача инфекционных агентов возможна при хирургическом вмешательстве (особенно нейрохирургическом и офтальмологическом), применении препаратов крови, иммунобиологических препаратов и трансплантации органов. Развитие прионных инфекций до появления симптомов может происходить как относительно быстро (в течение полугода), так и чрезвычайно медленно, иногда в течение нескольких десятков лет с момента попадания инфекционного приона в организм человека. Таким образом, для обеспечения биобезопасности населения государству необходимы сверхчувствительные аналитические системы для мониторинга как установленных прионных инфекций, так и возникающих их вариантов, подобно штаммам бактериальных и вирусных возбудителей в биологических образцах различного происхождения.

Недавно была описана так называемая протеазачувствительная прионопатия, при которой возбудитель – инфекционный прионный белок – оказался чувствительным к инактивирующему действию протеазы К [18]. Другой пример связан с описанием случаев новой прионной патологии, проявляющейся в признаках специфической нейропатии в сочетании с прогрессирующей потерей чувствительности в разных областях организма и хронической диареей [17,19]. Большого внимания заслуживают характеристики восприимчивости и невосприимчивости организма млекопитающих к прионной инфекции. Установленная ранее и генетически обусловленная степень восприимчивости к инфекционному прионному белку у разных пород овец и коз была реализована сотрудником Исследовательского центра Департамента сельского хозяйства США К. O'Rourke – автором первой прижизненной диагностики скрепи овец [20]. В течение ряда лет селекцией и выбраковкой К. O'Rourke и соавт. удалось добиться практически полного искоренения на территории США скрепи, которая нанесла очень большой урон нашей отечественной Романовской породе овец [21].

Генотипирование прионового локуса *PRNP* показало, что замена всего лишь одной аминокислоты в человеческом прионном белке – глицина в 127-м положении на валин – будучи в одном аллеле защищает от куру и классического варианта БКЯ, а в двух

Особо опасные прионные болезни человека и животных Especially dangerous prion diseases of humans and animals

Заболевание	Хозяин
Disease name	Carrier
Kypy	Человек
Kuru	Нитап
Болезнь Крейтцфельда — Якоба: Creutzfeldt — Jakob Disease: — спорадическая — sporadic — инфекционная — infectious — семейная — family — ятрогенная — iatrogenic	Человек Human
Новый вариант болезни Крейтцфельда – Якоба New variant of Creutzfeldt's – Jakob Disease	Человек Human
Смертельная семейная бессонница	Человек
Fatal familial insomnia	Нитап
Спорадическая смертельная бессонница	Человек
Sporadic fatal insomnia	Нитап
Протеаза-чувствительная нейропатия Protease-sensitive neuropathy	Человек Нитап
Нейропатия с диареей	Человек
Neuropathy with diarrhea	Нитап
Хроническая прогрессирующая энцефалопатия детского возраста (болезнь Альперса) Alpers's disease	Человек Human
Спонгиоформный миозит	Человек
Spongiform myositis	Нитап
Скрепи	Овцы, козы
Scrapie	Sheep, goats
Хроническая изнуряющая болезнь диких копытных Chronic wasting disease	Олени, лоси Deer, moose
Трансмиссивная энцефалопатия норок	Норки
Transmissible encephalopathy of minks	Minks
Типичная губкообразная энцефалопатия крупно- го рогатого скота Type bovine spongiform encephalopathy	Коровы, быки Cattle
Атипичная губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота Atypical bovine spongiform encdephalopathy	Коровы, быки Cattle
Губкообразная энцефалопатия кошек	Кошки
Cats spongiform encephalopathy	Cats
Губкообразная энцефалопатия экзотических копытных Hoofs spongiform encephalopathy	Антилопы, большой куду Antilope, kudu

аллелях — делает невосприимчивым ко всем штаммам инфекционного прионного белка. Оказалось также, что в структуре нормального прионного белка замена метионина на валин в 129-м положении в одном аллеле зашищает её носителя от всех ПБ [22].

Все вышеперечисленные особенности ПБ значительно расширяют и усложняют рамки понимания рисков этой патологии, выдвигают совершенно новые задачи и обосновывают необходимость разра-

ботки и применения особых мер биобезопасности. Поскольку до настоящего времени в мире нет средств эффективного лечения ПБ, следует сосредоточить основное внимание на профилактических мероприятиях и средствах опережающей доклинической диагностики ПБ. Благодаря зоонозному характеру патологии профилактические меры, естественно, должны носить и медицинскую, и ветеринарную направленность. Поэтому профилактика ПБ прежде всего основывается на исключении инфицированных мясных продуктов, что и было своевременно обеспечено Минсельхозом России предупреждением о запрете закупок мяса, мясных продуктов и продуктов убоя КРС без предоставления соответствующих документов, подтверждающих в стране-экспортёре отсутствие ПБ среди этих животных. В этой связи ветеринарными службами были предприняты меры строгого предварительного контроля на местах закупок мяса и мясных продуктов за рубежом. Эти положения также были отражены Главным государственным санитарным врачом РФ Г.Г. Онищенко в постановлении от 15.12.2000 № 15 «О мерах по предупреждению распространения болезни Крейтцфельда – Якоба на территории Российской Федерации» [23, 24].

Хотя в отношении ПБ до настоящего времени не выделены группы риска по профессиям, известны документированные случаи внутрибольничных заражений персонала (лаборанты-гистологи, нейропатоморфолог, хирурги, нейрохирурги), а также довольно широкий круг так называемых ятрогенных случаев [4, 10], что обосновывает принятие мер к широкому информационному обеспечению больниц, поликлиник, фельдшерско-акушерских пунктов и отдельных поселковых медицинских пунктов. Эти меры направлены на выявление болезней, которые сегодня, несмотря на распоряжения вышестоящих организаций, чаще всего проходят мимо учёта и регистрации. Выявленного больного или с подозрением на заболевание следует госпитализировать в инфекционное отделение неврологического стационара, где подтверждение диагноза и уход могут быть обеспечены в наибольшем объёме. Сказываются и отсутствие обеспечения служб клинической лабораторной диагностики современными тест-системами, и низкая квалификация медицинского персонала. Эти соображения должны быть приняты во внимание в связи с постепенно расширяющимся кругом ПБ человека, появлением различных «штаммов», т.е. конформеров этого возбудителя, различной патогенности.

Особенно опасна способность возбудителя не только преодолевать межвидовые барьеры, что особенно наглядно было продемонстрировано во время эпизоотии ПБ в Великобритании, но, что не менее опасно, значительно повышать вирулентность инфекционного прионного белка [25–27]. К особенностям ПБ следует отнести и 100% летальность, а также необычайно продолжительный инкубационный период (иногда десятилетия), что как бы маскирует время заражения, и особенно длительно скрытый процесс распространения болезней в популяции [28]. Установлено, что все при-

онные белки как антигены иммунотолерантны, т.е. отсутствие образования антител в заражённом организме создаёт особые трудности в лабораторной диагностике ПБ, сама симптоматика которых, как отмечено выше, нередко отличается достаточным разнообразием [29].

До настоящего времени в мировой практике лабораторная диагностика ПБ людей и животных, как правило, осуществлялась посмертно путём выявления прионной формы белка в биоптатах головного или спинного мозга с помощью морфологических или иммунохимических методов анализа [30]. Однако в последние годы стали появляться варианты прижизненной, в том числе доклинической диагностики. Поэтому одной из наиболее актуальных исследовательских задач для обеспечения прионной биобезопасности страны остаётся разработка современных высокочувствительных отечественных тест-систем, способных эффективно обнаруживать инфекционный прионный белок в биологических жидкостях (кровь, моча, слюна, слеза) на доклинической стадии заболевания. Формат журнала не позволяет в этом обзоре даже кратко обозначить все эти методы, поэтому укажем наиболее перспективные из них. Современными новейшими методами автоматизированной белковой амплификации и идентификации прионных белков являются:

- MDCK метод циклической амплификации с дезинтеграцией образующихся (на первичных молекулах инфекционных прионов в исходном образце) ультразвуком PrP^d-подобных олигомеров;
- метод индуцированной вибрацией конверсии (рекомбинантных прионов) в реальном времени (ИВК-PB, quacking-induced conversion, QuIC) в амилоидоподобные фибриллы [31].

Важным направлением является изучение природы возможного происхождения различных «штаммов» прионов и, соответственно, их патогенных изоформ (изолятов) как естественным, так и искусственным, т.е. экспериментальным, путём *in vivo* и *in vitro* в опытах по межвидовой трансмисссии ПБ между животными (включая высших приматов).

В 2000 г. в Институте вирусологии им Д.И. Ивановского в рамках международных проектов были впервые в нашей стране получены полноразмерные рекомбинантные антигены прионных белков КРС, оленей и уникальная панель моноклональных антител к прионным белкам, апробированная в России и за рубежом [32, 33]. Прототипы тест-систем для выявления прионов были успешно испытаны в форматах иммуногистохимического исследования, иммуноферментного анализа и вестерн-блоттинга.

В настоящее время в ФГБУ «НИЦЭМ им. Гамалеи» Минздрава России такие исследования продолжаются для последующего создания прототипных тест-систем на основе иммуноферментных методик и белковой амплификации [31]. Современные подходы к диагностике ПБ человека и животных позволят разработать отечественные тест-системы с высокой чувствительностью и специфичностью для выявления прионов не только посмертно, но и в доклинической стадии развития заболевания.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-4, 6-15, 17-22, 25, 27-31, 33 cm. REFERENCES)

- 5. Кальнов С.Л., Верховский О.А., Алипер Т.И. Прионные болезни животных. В кн.: Львов Д.К., ред. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. М.: МИА; 2013: 910-21
- 16. Зуев В.А., Завалишин И.А., Ройхель В.М. Прионные болезни человека и животных. Руководство для врачей. М.: Медицина; 1999 8-12
- 23. Покровский В.И., Киселев О.И., Черкасский Б.Л. Прионы и прионные болезни. М.: РАМН; 2004
- 24. Зуев В.А. Медленные инфекции человека и животных. Вопросы вирусологии. 2014; 59(5): 5-12.
- 26. Иллариошкин С.Н. Конформационные болезни мозга. М.: Янус-К; 2002
- 32. Кальнов С.Л., Григорьев В.Б., Алексеев К.Н., Власова А.П., Гибадулин Р.А., Покидышев А.Н. и др. Получение и характеристика полноразмерного рекомбинантного РГРС белка крупного рогатого скота. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2006; 141(1): 68-71.

REFERENCES

- Prusiner S.B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. Science. 1982; 216(4542): 136-44 DOI: http://doi.org/10.1126/science.6801762
- Bolton D.C., McKinley M.P., Prusiner S.B. Identification of protein that purifies with the scrapie prion. Science. 1982; 218(4579): 1309-11. DOI: http://doi.org/10.1126/science.6815801
- Prusiner S.B. Molecular biology of prion diseases. Science. 1991; 3. 252(5012): 1515-22. DOI: http://doi.org/10.1126/science.1675487
- Kim C., Xiao X., Chen S., Haldiman T., Smirnovas V., Kofskey D., Warren M., et al. Artificial strain of human prions created in vitro. Nat. Commun. 2018; 9(1): 2166. DOI: http://doi.org/10.1038/ s41467-018-04584-z
- Kal'nov S.L., Verkhovskiy O.A., Aliper T.I. Prion diseases of animals. 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: 910-21. (in Russian)
- McKinley M.P., Bolton D.C., Prusiner S.B. A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion. Cell. 1983; 35(1): 57-62. DOI: http://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90207-6
- 7. Imran M., Mahmood S. An overview of human prion diseases. Virol. J. 2011; 8: 559. DOI: http://doi.org/10.1186/1743-422X-8-559
- Stella R., Massimino M.L., Sandri M., Sorgato M.S., Bertoli A. Cellular prion protein promotes regeneration of adult muscle A tissue. Mol. Cell. Biol. 2010; 30(20): 4864-76. DOI: http://doi.org/10.1128/MCB.01040-09
- Miranda A., Ramos-Ibeas P., Pericuesta E., Ramirez M.A., Gutierrez-Adan A. The role of prion protein in stem cell regulation. Reproduction. 2013; 146(3): R91-9 DOI: http://doi.org/10.1530/REP-13-0100
- Prusiner S.B. An introduction to prion biology and diseases. In: Prusiner S.B., ed. *Prion Biology and Diseases*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2004: 1-87.
- Chakrabortee S., Byers J.S., Jones S., Garcia D.M., Bhullar B., Chang A., et al. Intrinsically disordered proteins drive emergence and inheritance of biological traits. Cell. 2016; 167(2): 369-81. DOI: http://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.017
- Gajdusek D.C., Zigas V. Degenerative disease in the central nervous system in the New Guinea - the endemic occurrence of "Kuru" in the native population. N. Engl. J. Med. 1957; 257(20): 974-8. DOI: http://doi.org/10.1056/NEJM195711142572005
- 13. Gambetti P., Dong Z., Yuan J., Xiao X., Zheng M., Alshekhlee A., et al. A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. Ann. Neurol. 2008; 63(6): 697-708. DOI: http://doi.org/10.1002/ana.21420
- Zou W.Q., Puoti G., Xiao X., Yuan J., Qing L., Gali I., et al. Variably protease-sensitive prionopathy: A new sporadic disease of the prion protein. Ann. Neurol. 2010; 68(2): 162-72. DOI: http://doi.org/10.1002/ana.22094

- Prusiner S.B. Prions and neurodegenerative diseases. N. Engl. J. Med. 1987; 317(25): 1571-81 DOI: http://doi.org/10.1056/NEJM198712173172505
- Zuev V.A., Zavalishin I.A., Roykhel' V.M. Prion Diseases of Humans and Animals. A Guide for Doctors [Prionnye bolezni cheloveka i zhivotnykh. Rukovodstvo dlya vrachey]. Moscow: Meditsina; 1999: 8-12. (in Russian)
- Brander S., Whitfeld J., Boone K., Puwa A., O'Malley C., Linehan J.M., et al. Central and peripheral pathology of kuru: pathological analysis of a recent case and comparison with other forms of human prion disease. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2008; 363(1510): 3755-63
- DOI: http://doi.org/10.1098/rstb.2008.0091 Mead S., Gandhi S., Beck J., Caine D., Gallujipali D., Carswell C., et al. A novel prion disease associated with diarrhea and autonomic neuropathy. New Engl. J. Med. 2013; 369(20): 1904-14. DOI: http://doi.org/10.1056/NEJMoa1214747
- O'Rourke K.I., Baszler T.V., Besser T.E., Miller J.M., Cutlip R.C., Wells G.A., et al. Preclinical diagnosis of scrapie be the immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. J. Clin. Microbiol. 2000; 38(9): 3254-9
- O'Rourke K.I., Melco R.P., Mickelson J.R. Allelic frequencies of an ovine scrapie susceptibility gene. Anim. Biotech. 1996; 7(2): 155-62. DOI: http://doi.org/10.1080/10495399609525856
- Asante E.A., Smidak M., Grimshaw A., Houghton R., Tomlinson A., Jeelani A., et al. A naturally occurring variant of the human prion protein completely prevents prion disease. Nature. 2015; 522(7557): 478-81 DOI: http://doi.org/10.1038/nature14510
- Collinge J., Whitfield D.J., McKintosh E., Beck J., Mead S., Thomas D.J., et al. Kuru in the 21st century – an acquired human prion disease with very long incubation period. Lancet. 2006; 367(9528): 2068-74. DOI: http://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68930-7
- Pokrovskiy V.I., Kiselev O.I., Cherkasskiy B.L. Prions and Prion Diseases [Priony i prionnye bolezni]. Moscow: RAMN; 2004. (in Russian)
- Zuev V.A. Slow infections of humans and animals. Voprosy virusologii. 2014; 59(5): 5-12. (in Russian)
- Carrel R.W., Lomas D.A. Conformational disease. Lancet. 1997; 350(9071): 134-8. DOI: http://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)02073-4
- Illarioshkin S.N. Conformational Diseases of the Brain [Konfor-
- matsionnye bolezni mozga]. Moscow: Yanus-K; 2002. (in Russian) Bu X.L., Xiang Y., Jin W.S., Wang J., Shen L.L., Huang Z.L., et al. Blood-derived amyloid-β protein induces Alzheimer's disease pathologies. Mol. Psychiatry. 2018; 23(9): 1948-56. DOI: http://doi.org/10.1038/mp.2017.204
- Gajdusek D.C., Zigas V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; endemic occurrence of kuru in the native population. New Engl. J. Med. 1957; 257(20): 974-8. DOI: http://doi.org/10.1056/NEJM195711142572005
- Telling G. Neurodegeneration: Evolved protection against human prion. Nature. 2015; 522(7557): 423-4. DOI: http://doi.org/10.1038/nature14534
- Will R.J., Ironside J.W., Zeidler M., Cousens S.N., Estibeiro K., Alperovitch A., et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. Lancet. 1996; 347(9006): 921-5 DOI: http://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)91412-9
- Sano K., Satoh K., Atarashi R., Takashima H., Iwasaki Y., Yoshida M., et al. Early detection of abnormal prion protein in genetic human prion diseases now possible using real-time QUIC assay. PLoS One. 2013; 8(1): 54915 DOI: http://doi.org/10.1371/journal.pone.0054915
- Kal'nov S.L., Grigor'ev V.B., Alekseev K.N., Vlasova A.P., Gibadulin R.A., Pokidyshev A.N., et al. Isolation and characterization of full-length recombinant cattle PrPC protein. *Byulleten'eksperimental'noy* biologii i meditsiny. 2006; 141(1): 68-71. (in Russian)
- Grigoriev V.B., Kalnov S.L., Pokidyshev A.N., Tsibezov V. V., Balandina M.V., Gibadulin R.A., et al. Fibrillization of recombinant bovine prion protein (rec-PrP) in vitro. Doklady Biochem. Biophys. 2008; 420(1): 112-4 DOI: http://doi.org/10.1134/S1607672908030046

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020



Древние варианты вируса Эпштейна–Барр (Herpesviridae, Lymphocryptovirus, HHV-4): гипотезы и факты

Смирнова К.В.^{1, 2}, Сенюта Н.Б.¹, Лубенская А.К.¹, Душенькина Т.Е.¹, Гурцевич В.Э.¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Россия;

² ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, Москва, Россия

Введение. Молекулярные исследования показали, что вирусы появились на ранних этапах эволюции жизни на земле. В течение миллионов лет они развивались за счёт изменения старых и приобретения новых последовательностей в РНК или ДНК. Предполагается, что у большинства вирусов есть общие предки. Такой предок, древний штамм, вероятно, существовал и у вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ).

Цель исследования – поиск персистирующих в наши дни в исторически сложившихся этносах России древних штаммов ВЭБ.

Материал и методы. Объектом исследования стал онкоген *LMP1* ВЭБ как наиболее пригодный для молекулярно-генетического анализа. *LMP1* амплифицировали из смывов полости рта представителей двух древних этносов России – татар и славян в третьем поколении. Ампликоны *LMP1* секвенировали в обоих направлениях, их нуклеотидные последовательности, транслированные в аминокислотные, оценивали с помощью классификации R. Edwards и соавт. (1999). Для установления генетического родства между образцами LMP1 построили филогенетическое древо методом «присоединения соседа» (neighbour-joining) с использованием пакета программ MEGA.

Результаты и обсуждение. Анализ образцов LMP1 из смывов полости рта славян выявил среди них варианты LMP1 с разной степенью трансформирующего потенциала: B95.8/A, China1, Med- и NC. Анализ образцов LMP1 из смывов полости рта татар позволил идентифицировать такие варианты онкобелка, как B95.8/A, China1, Med-, а также группу образцов вне классификации. Важной находкой стало обнаружение у татар 7 образцов LMP1, обозначенных как LMP1-Tat^к, содержавших две уникальные делеции 5 а.к. в кодонах 312—316 и 382—386, отсутствующие в образцах LMP1 славян и в контрольных группах — онкологических больных и здоровых лиц, а также в открытых компьютерных базах данных. Уникальность варианта LMP1-Tat^к подтверждается и при филогенетическом анализе образцов LMP1 татарского происхождения, и при анализе 11 а.к. повторов и 5 а.к. вставок в С-терминальной области онкобелка. Показатели заболеваемости и смертности от новообразований, включающих ВЭБ-ассоциированные патологии, у двух изучаемых этносов, инфицированных разными штаммами ВЭБ, практически не различались.

Заключение. Полученные данные позволили предположить, что, во-первых, LMP1-Tat^к относится к эволюционно древнему штамму ВЭБ, персистирующему у татар, а во-вторых, LMP1-Tat^к относится к так называемому Волжскому штамму вируса, распространённому среди населения Поволжья. Исследование изолятов ВЭБ от жителей этого региона, возможно, прольёт свет на происхождение LMP1-Tat^к.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр; латентный мембранный белок 1; полимеразная цепная реакция; сиквенсный анализ; филогенетический анализ; татары; славяне.

Для цитирования: Смирнова К.В., Сенюта Н.Б., Лубенская А.К., Душенькина Т.Е., Гурцевич В.Э. Древние варианты вируса Эпштейна–Барр (*Herpesviridae*, *Lymphocryptovirus*, HHV-4): гипотезы и факты. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(2): 77-86. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-77-86

Для корреспонденции: Смирнова Ксения Валерьевна, канд. биол. наук, зав. лабораторией вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва. E-mail: skv.lab@yandex.ru

Финансирование. Исследование выполнено в рамках экспериментального государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации при координации ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Минздрава России, а также поддержано грантом Российского научного фонда (проект № 18-015-00505A).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: филогенетический анализ образцов LMP1, оформление рукописи – Смирнова К.В.; сиквенсный анализ белковых вариантов LMP1, их классификация – Сенюта Н.Б.; экстракция ДНК из смывов полости рта, амплификация LMP1 – Лубенская А.К.; первичная обработка смывов полости рта – Душенькина Т.Е.; идея, организация исследования и написание рукописи – Гурцевич В.Э.

Поступила 05.03.2020 Принята в печать 31.03.2020

77

Ancient variants of the Epstein–Barr virus (*Herpesviridae*, *Lymphocryptovirus*, HHV-4): hypotheses and facts

Kseniya V. Smirnova ^{1, 2}, Natalya B. Senyuta ¹, Alexandra K. Lubenskaya ¹, Tatyana E. Dushenkina ¹, Vladimir E. Gurtsevich ¹

- ¹ Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, 115478, Russia:
- ² Pirogov Russian National Research Medical University (RNRMU), Moscow, 117997, Russia

Introduction. Molecular studies have shown that viruses appeared in the early stages of the evolution of life. For millions of years, viruses have evolved by changing old and acquiring new sequences in their RNA or DNA. It is assumed that most viruses have common ancestors. Such an ancestor, an ancient strain, probably existed for Epstein-Barr virus (EBV) as well.

Aim. To find out whether ancient strains of EBV persist in modern Russian ethnic groups today.

Material and methods. The object of the study was the EBV *LMP1* oncogene, which is most suitable for molecular genetic analysis. *LMP1* was amplified from the oral cavity washings obtained from representatives of two ancient ethnic groups of Russia – Tatars and Slavs. The *LMP1* amplicons were sequenced in both directions; their nucleotide sequences translated into amino acid (LMP1) were evaluated using the classification suggested by Edwards et al. 1999. To establish genetic relationships between LMP1 variants, a phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method using the MEGA software package.

Results and discussion. Analysis of LMP1 sequences from washings of the Slavs oral cavity demonstrated the presence of LMP1 variants with varying degrees of transforming potential: B98.5/A, China1, Med-, and NC. The analysis of LMP1 sequences from washings of Tatar oral cavity also made it possible to identify oncoprotein variants such as B95.8/A, China1, Med-, as well as a group of variants out of classifications (LMP1-OK). An important finding was the identification of 7 variants of LMP1 from Tatars, designated as LMP1-Tat^K, that contained two unique deletions of 5 aa in codons 312–316 and 382–386, which were absent in the LMP1 variants from Slavs and from previously examined cancer patients and healthy individuals, as well as in sequences from open computer databases. The uniqueness of the LMP1-Tat^K variant is confirmed both by phylogenetic analysis of LMP1 sequences of Tatar origin and by the analysis of 11 aa repeats and 5 aa insertions in the C-terminal region of the oncoprotein. The morbidity and mortality rates from neoplasms, including EBV-associated pathologies, did not differ significantly between two studied ethnic groups infected with different EBV strains.

Conclusion. The data obtained allowed us to suggest that: 1) LMP1-Tat^K could be referred to an evolutionarily ancient EBV strain that persists among Tatars and; 2) LMP1-Tat^K belongs to the so-called "Volga" EBV virus strain, the common strain among the population of the Volga region. Extended studies of EBV isolates from residents of this region may probably shed the light on the origin of LMP1-Tat^K.

Keywords: Epstein–Barr virus; latent membrane protein 1; polymerase chain reaction; sequence analysis; phylogenetic analysis: Tatars: Slavs.

For citation: Smirnova K.V., Senyuta N.B., Lubenskaya A.K., Dushenkina T.E., Gurtsevich V.E. Ancient variants of the Epstein–Barr virus (*Herpesviridae*, *Lymphocryptovirus*, HHV-4): hypotheses and facts. *Voprosy Virusologii* (*Problems of Virology*). 2020; 65(2): 77-86. (In Russian).

DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-77-86

For correspondence: Kseniya V. Smirnova, PhD, Head of the Laboratory of Viral Carcinogenesis of the N.N. Blokhin NMRC of Oncology, Moscow, 115478, Russia. E-mail: skv.lab@yandex.ru

Information about the authors:

Smirnova K.V., http://orcid.org/0000-0001-6209-977X Senyuta N.B., http://orcid.org/0000-0001-8915-8274 Gurtsevitch E.V., http://orcid.org/0000-0003-1840-4364

Lubenskaya A.K., http://orcid.org/0000-0003-3953-7449

Dushenkina T.E., http://orcid.org/0000-0001-8279-514X

Acknowledgments. Research is conducted under the auspices of the experimental governmental assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation and coordinated by the Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Ministry of Health of the Russia, also it was financially supported by the grant of the Russian Science Foundation (project No 18-015-00505A).

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

Contribution: phylogenetic analysis of LMP1 samples, manuscript design – Smirnova K.V.;

analysis of LMP1 protein variants, classification - Senyuta N.B.;

DNA recovery from oral washing samples, LMP1 amplification - Lubenskaya A.K.;

primary treatment of oral washing samples – Dushenkina T.E.;

idea, organization of research and manuscript writing - Gurtsevich V.E.

Received 05 March 2020 Accepted 31 March 2020

Введение

Молекулярные исследования показали, что вирусы появились на ранних этапах эволюции жизни [1] и, вероятно, могли возникать многократно [2]. В настоящее время обсуждаются три классические гипотезы о происхождении вирусов. Согласно первой из них, вирусы являются потомками бактерий или других одноклеточных организмов, претерпевших дегенеративную эволюцию. Согласно второй гипотезе, вирусы являются потомками древних доклеточных форм жизни, перешедших к паразитическому способу существования. Согласно третьей, вирусы являются дериватами клеточных генетических структур, ставших относительно автономными, но сохранивших зависимость от клеток [3]. Учитывая разнообразие мира вирусов, каждая из этих гипотез базируется на соответствующем наборе доказательств, но ни одна не является общепризнанной. В последнее время вирусологи начали пересматривать и переоценивать все три гипотезы [4].

Эволюция существующих и появление новых групп вирусов происходили за счёт изменения старых и приобретения новых последовательностей в их РНК или ДНК [5, 6]. Причём мутировавшие вирусы, как правило, начинали доминировать среди «устаревших» аналогов. Генетические изменения в клетках, воспроизводимые вирусами, приводили к генетическим изменениям и в вирусах, ускоряя их эволюцию [7, 8].

В настоящее время известно, что у большинства видов вирусов есть общие предки, и хотя гипотеза «первичности вирусов» ещё не получила полного признания, нет сомнений в том, что тысячи видов современных вирусов развились из менее многочисленных древних [7]. Если это так, то возникает вопрос: можно ли в наше время обнаружить древние варианты вирусов, например, для вируса Эпштейна—Барр (ВЭБ).

Известно, что ВЭБ принадлежит к большому семейству герпесвирусов человека. Это наиболее яркий представитель нескольких известных родственных вирусов, эндогенных для обезьян Старого и Нового Света. Весьма вероятно, что ВЭБ развивался вместе со своим хозяином (Homo sapiens и его предками) в течение миллионов лет. Однако эволюция генетической изменчивости ВЭБ изучена недостаточно. Поскольку ген латентного мембранного белка-1 (LMP1) ВЭБ обладает выраженным полиморфизмом, его последовательности могут быть полезны в качестве инструмента для идентификации генотипа вируса, его штамма [9]. Три типа генетической изменчивости способствуют эволюции гена LMP1. Первый – это точечная мутация. Вариация нуклеотидной последовательности субстрата либо отражает географическую вариацию штамма, либо возникает de novo во время продуктивной репликации ВЭБ [9]. Второй тип – делеции последовательностей и дублирование. Генотипы ВЭБ с делециями *LMP1* существуют в популяции человека как независимые штаммы [10, 11]. Третий – гомологичная рекомбинация. Внутриштаммовая гомологичная рекомбинация происходит в области повтора LMP1, а также в других повторяющихся последовательностях ВЭБ [12, 13]. Потомство продуктивной репликации ВЭБ часто имеет иное количество повторяющихся единиц LMP1, чем родительский штамм.

Цель настоящего исследования – на основании вышеприведённых данных выяснить, существуют ли в наше время древние варианты ВЭБ.

Было принято решение осуществлять поиск среди вариантов гена *LMP1* в штаммах вируса, персистирующих у представителей двух древних этносов: славян и татар. Учитывая тот факт, что спектр штаммов вируса (и, соответственно, вариантов *LMP1* с разным онкогенным потенциалом), инфицирующих население самого крупного мегаполиса — Москвы и Республики Татарстан, может отличаться, представлялось важным сравнить в этих популяциях показатели заболеваемости и смертности от новообразований, в состав которых входят опухоли, ассоциированные с ВЭБ.

Материал и методы

Материалы. Объектом исследования стали образцы онкогена ВЭБ *LMP1* в инфицированных вирусом клетках, содержащихся в смывах полости рта славян и татар. Этнические славяне (славяне не менее чем в трёх поколениях) были представлены группой взрослых жителей Москвы (21 мужчина и 19 женщин; средний возраст — 47,5 года). Этнические татары (татары не менее чем в трёх поколениях) были представлены 60 студентами ФГБОУ ВО «Казанский ГМУ» Минздрава России (15 мужчин и 45 женщин, средний возраст — 21,5 года). Все обследуемые лица, включённые в исследование в результате случайной выборки, подписали информированное согласие на участие.

Сравниваемые группы отличались не только вероисповеданием (православные христиане и мусульмане), но и генетически: поволжские татары входят в урало-каспийский кластер с генофондом гаплогрупп Y-хромосомы N1c-LLY22g и I1-M253, а славяне характеризуются четырьмя наиболее распространёнными гаплогруппами: R1a1, N1c1, I2 и I1.

Каждый смыв представлял собой суспензию инфицированных вирусом отшелушившихся эпителиальных клеток, полученных индивидуально от каждого лица, после полоскания полости рта 20 мл стерильного физиологического раствора в течение 30 с. Образцы смывов, собранные в герметично закрывающиеся пластиковые пробирки, хранили при температуре +4 °C не более 2 сут до изучения.

Экстракция ДНК и амплификация вирусных генов. Из клеток, собранных после центрифугирования смывов полости рта методом фенол-хлороформной экстракции, выделяли ДНК. Наличие вирусной ДНК в выделенных образцах анализировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, описанном нами ранее [14]. Для определения вирусной ДНК штаммов ВЭБ 1-го и 2-го типа использовали метод гнёздной ПЦР с ранее разработанными парами праймеров [15]. Амплификацию онкогена LMP1 про-

водили в два этапа с соответствующими внешними и внутренними праймерами по ранее использованной нами методике [16]. Каждый ПЦР-продукт очищали на мини-колонке Qiagen (Германия), согласно инструкции производителя. Для реакции использовали примерно 100–200 нг ПЦР-продукта, концентрацию ДНК оценивали визуально в агарозном геле. В качестве положительного контроля применяли 1 мкг ДНК, выделенной из используемой в качестве стандарта клеточной линии В95.8, а в качестве отрицательного контроля – дистиллированную воду.

Секвенирование ПЦР-продуктов LMP1. Ампликоны онкогена LMP1 секвенировали в обоих направлениях с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDyeTM Terminator 3.1 (США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avan (США). Обработку данных секвенирования выполняли с использованием программ Chromas 230 и Vector NTI (Invitrogene, США).

Классификация LMP1. Нуклеотидные последовательности образцов LMP1, амплифицированных из ДНК смывов полости рта и транслированных в аминокислотные последовательности, классифицировали на основании совокупности мутаций, ведущих к заменам отдельных аминокислот, формированию делеций и дупликаций. За основу была принята известная в литературе классификация, сформированная на базе сиквенсного анализа белковых аналогов гена *LMP1*, полученных от больных ВЭБ-ассоциированной патологией и здоровых вирусоносителей из различных географических регионов мира [17]. При этом показано, что вариант LMP1-China1 является аналогом высокотрансформирующего варианта LMP1-Cao, а вариант LMP1-B95.8 – прототипным вариантом гена с низкой трансформирующей активностью [17, 18].

Филогенетический анализ. Для установления генетического родства между образцами LMP1, полученными от татар, их нуклеотидные последовательности транслировали в аминокислотные последовательности, соответствующие кодонам 212–387 прототипного варианта LMP1-B95.8 (NCBI, валидированная последовательность Х01995), с помощью пакета программ Vector NTI (Invitrogene, США). Дистанционные матрицы рассчитывали с использованием двухпараметрической модели Кимура. Филогенетическое древо строили на основе полученных данных методом «присоединения соседа» (neighbour joining) с использованием пакета программ MEGA. Достоверность построенного древа оценивали методом бутстреп-анализа. Для филогенетического сравнения использовали доступные в GenBank основные варианты LMP1 ВЭБ (Alaskan, NC, B95.8/A, Med-, China1, China2).

Стандартизированные показатели (SR) для заболеваемости и смертности и их стандартные ошибки (SE) в 2015–2017 гг. для некоторых злокачественных опухолей, среди которых встречаются ВЭБ-ассоциированные, в Москве и Татарстане, были получены из публикации [19]. Сред-

ние значения SR и их SE были проанализированы для заболеваемости и смертности в 2015-2017 гг. для обоих полов. 95% доверительные интервалы (ДИ) были рассчитаны как $SR \pm 1,96$ SE. Отсутствие перекрытия ДИ для Москвы и Татарстана свидетельствует о статистически значимой разнице между SR на уровне p=0,05, а перекрытие ДИ показывает, что разница незначительна.

Результаты

Выбор славян и татар для поиска древних вариантов ВЭБ обусловлен их достаточно высокой генетической чистотой и обитанием на территории страны с давних времён. Следует отметить, что не менее половины (а по данным ряда источников, даже более половины) населения Москвы составляют представители славянской национальности. В то же время в Республике Татарстан, в частности в Казани, этнический состав более однороден, а численность татар ненамного, но всё же превышает число представителей славянских народов.

О штаммах ВЭБ, циркулирующих среди московских славян и казанских татар, можно судить по полиморфным формам специфических фрагментов генома ВЭБ, а также вирусного онкогена *LMP1*, обнаруженных в вирусных изолятах обследованных (табл. 1). Показано, что штаммы ВЭБ с определёнными генетическими мутациями обладают разной трансформирующей способностью. В частности, основное фенотипическое различие известных двух типов вируса состоит в том, что ВЭБ 1-го типа способен трансформировать В-лимфоциты человека в лимфобластоидную клеточную линию более эффективно нежели ВЭБ 2-го типа.

Анализ персистирующих штаммов ВЭБ среди изученной группы татар показал доминирование ВЭБ 1-го типа (84,3% против 15,7% ВЭБ 2-го типа). При этом результаты наших исследований согласуются с данными других авторов, согласно которым ВЭБ 1-го типа наиболее распространён в Европейских странах и на территории США, в то время как ВЭБ 2-го типа — среди населения Африканского континента. Помимо вышеперечисленного изучаемые штаммы вируса отличаются и на молекулярном уровне в плане существенных изменений последовательностей, кодирующих ЕВNАЗА, ЗВ и ЗС, что также отражается на функциональных особенностях изучаемых штаммов.

Анализ нуклеотидных и дедуктивных аминокислотных последовательностей 40 образцов LMP1, полученных из 40 смывов полости рта славян, показал доминирование среди них низкотрансформирующего варианта LMP1-B95.8 (n=33, 82,5%). Обнаружено также несколько вариантов онкобелка с более выраженным по сравнению с B95.8 трансформирующим потенциалом: NC (n=3, 7,5%) и Med- (n=1, 2,5%), а также высокотрансформирующий вариант China1 (n=3, 7,5%).

Анализ 41 ампликона *LMP1*, полученного из 60 смывов полости рта татар, позволил идентифицировать

Таблица 1. Полиморфизм LMP1 в штаммах вируса Эпштейна–Барр, циркулирующих среди московских славян и казанских татар **Table 1.** Polymorphism of LMP1 in Epstein–Barr virus strains circulating among Slavs and Tatars

Число смывов полости рта Количеств амплифици ванных обра <i>LMP1</i> ,			MP1 в соответ Edwards и coar according to R [17]	вт. [17], абс. (% . Edwards et al.	Варианты <i>LMP1</i> вне классификации R. Edwards и соавт. [17], абс. (%) LMP1 variants out of R. Edwards et al. classification [17] (%)				
Numbers of oral washes	afc. (%) Numbers of amplified <i>LMP1</i> sequences (%)	B95.8/A	Med-	China1	NC	бессистемные мутации (вне классификации) unsystematic mutations (out of classification)	уникальные мутации unique mutations		
				Славяне Slavs					
		33/40 (82,5)	1/40 (2,5)	3/40 (7,5)	3/40 (7,5)	0/40 (0)	0/40(0)		
40	40 (100)		Bcero 40 (100) образцов Total 40 (100) samples			Bcero 0 (0) образцов Total 0 (0) samples			
				Татары Tatars					
60	41 (69,5)	12/41 (29,3)	6/41 (14,6)	3/41 (7,3)	0/41 (0)	13/41 (31,7)	7/41 (17,1)		
		Bcero 21 (51,2) образец Total 21 (51.2) samples				Bcero 20 (48,8) образцов Total 20 (48.8) samples			

Примечание. LMP1 – латентный мембранный белок 1 вируса Эпштейна–Барр; B95.8/A, Med-, China1, NC – варианты онкобелка LMP1. *Note.* LMP1 – Epstein–Barr virus latent membrane protein 1; B95.8/A, Med-, China1, NC – LMP1 oncoprotein variants.

Таблица 2. Специфические мутации С-терминального домена у 7 образцов LMP1-Tat^K **Table 2.** Specific mutations of the C-terminal domain in 7 samples of LMP1-Tat^K

Образ- цы LMP1 LMP1 samples		ии в CTAR обл Mutations in CT of LMP1			no-ассоциированные мутации LMP1 Cao-associated mutation	Мутации LMP1 вне извест- ных классификаций* LMP1 mutations outside of known classifications*				
	CTAR 1 191–232 191–232 CTAR 1	CTAR 2 351–386 351–386 CTAR 2	CTAR 3 275–330 275–330 CTAR 3	делеция 276–280 (5 а.к.) 276–280 (5 a.a.) deletion	вставка 302–303 (11 а.к. × 3) 302–303 (11 а.а. × 3) insertion	делеция 346–355 (10 а.к.) 346–355 (10 a.a.) deletion	делеция 312–316 (5 а.к.) 312–316 (5 а.а.) deletion	делеция 382–386 (5 а.к.) 382–386 (5 a.a.) deletion		
Варианты LMP1-B95.8 и LMP1-Cao										
B95.8	LMP1-B95.8 and LMP1-Cao variants									
Cao	Мутация G212S G212S mutation	Мутация S366T S366T mutation	Делеция 276–280, мутация Q322N 276–280 deletion, Q322N mutation	+	+	+	-	-		
				Варианты LMP LMP1-Tat ^к var						
T2	-	=	276–280, Q322N	+	+	_	+	+		
T4	S229T	_	276–280, Q322N	+	+	_	+	+		
T5	S229T	S366T	276-280, Q322N	+	+	_	+	+		
Т6	S229T	_	276–280, Q322N	+	+	_	+	+		
T33	S229T	S366A	_	-	+	_	+	+		
T44	_	S366T	276–280, Q322N	+	+	_	+	+		
T45	S229T		_		_		+	+		

Примечание. LMP1-B95.8 – прототипный вариант LMP1; LMP1-Cao – высокотрансформирующий вариант LMP1; LMP1-Tat^k – вариант LMP1, характерный только для татар; Т2...T45 – образцы LMP1-Tat^k; * специфические мутации С-терминального домена LMP1 у 7 образцов LMP1-Tat^k, характерные только для татар.

Note. LMP1-B95.8 is a prototype variant of LMP1; LMP1-Cao is a highly transforming variant of LMP1; LMP1-Tat^K - a variant of LMP1, characteristic only for Tatars; T2 ... T45 - samples of LMP1-Tat^K, * specific mutations of the C-terminal domain of LMP1 in 7 samples of LMP1-Tat^K, characteristic only for Tatars.

по классификации R. Edwards и соавт. [17] лишь 21 образец. В том числе низкотрансформирующий вариант B95.8/A (n=12, 29,3%), а также варианты, обладающие умеренным и высокотрансформирующим потенциалом, соответственно Med- (n=6, 14,6%) и China1 (n=3, 7,3%). Среди оставшихся 20 образцов LMP1, полученных от этнических татар, 13 не поддавались классификации из-за набора в них нетипичных хаотично расположенных мутаций. Эта группа образцов LMP1 была обозначена как ВК (вне классификации). Но группа из 7 образцов представила особый интерес благодаря содержанию в них уникальной пары делеций 5 а.к. в кодонах 312–316 и 382–386 (табл. 2).

Указанный вариант LMP1, обозначенный как LMP1-Tat^к, не был характерен для прототипного варианта LMP1-B95.8 и высокотрансформирующего варианта LMP1-Cao, не обнаружен он и у этнических славян. Указанную делецию нам также не удалось обнаружить в образцах гена, амплифицированных в предыдущие годы из плазмы крови и смывов полости рта больных злокачественными и доброкачественными опухолями из разных регионов России [20] и доноров крови (табл. 3). Не было их и в компьютерной базе данных.

Учитывая генеалогию изучаемых лиц (татары по крайней мере в третьем поколении), нельзя исключить, что монолитная группа образцов LMP1 с двумя уникальными мутациями, названная LMP1-Tat^к, относится к эволюционно древнему штамму ВЭБ, обозначенному нами как ВЭБ-Тat^к. Уникальность варианта LMP1-Tat^к чётко прослеживается и при филогенетическом анализе образцов LMP1 татарского происхождения (рис. 1).

В созданном древе для сравнения использовали аминокислотные последовательности ных вариантов LMP1-В95.8 и LMP1-Сао. Выявлено, что спектр вариантов образцов LMP1 среди этнических татар (по классификации R. Edwards и соавт., 1999) [17] был ограничен вариантами В95.8, Med- и China1. Образцы варианта LMP1-Tat^K и группы ВК в филогенетическом древе сформировали два отдельно расположенных кластера. Обращает на себя внимание близость образцов кластера LMP1-Tat^к к образцам кластера LMP1-China1, обладающих высоким трансформирующим и онкогенным потенциалом, и, наоборот, удалённость образцов кластера $LMP1-Tat^{K}$ от образцов кластера LMP1-B95.8 с невысокой трансформирующей активностью. Уникальность образцов, относящихся к варианту LMP1-Tat^к, также видна при анализе аминокислотных повторов и вставок в С-терминальной области онкобелка. Ранее было показано, что эта область LMP1 содержит варьирующее число 11-членных аминокислотных повторов (PQDPDNTDDNG) на участке 253-306 а.к. [20]. Прототипный вариант LMP1-B95.8 имеет 4 подобных повторяющихся элементов и две 5-аминокислотные (PHDPL) вставки: одна расположена между 2-м и 3-м повторами (275–279-й аминокислотные остатки), а вторая в конце повторов (302–306-й аминокислотные остатки) [21]. Высокотрансформирующий вариант LMP1-Cao содержит семь 11-членных повторов и не содержит 5-членных вставок.

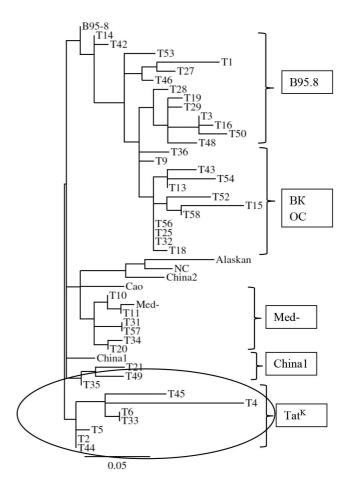


Рис. 1. Филогенетический анализ образцов LMP1 из смывов полости рта татар. Филогенетическое древо С-концевых последовательностей 41 образца LMP1, полученных от этнических татар, сконструировано с использованием метода «присоединения соседа» (neighbour joining). ВК – вне классификации.

Fig. 1. Phylogenetic analysis of LMP1 sequences isolated from oral washes obtained from the Tatars. The phylogenetic tree of 41 sequences of LMP1 C-terminal domain obtained from ethnic Tatars was constructed using the of neighbor-joining method. OC – out of classification.

На рис. 2 представлены результаты анализа 11 аминокислотных повторов и пятичленных вставок С-терминальной области белка в образцах LMP1 татар.

Большинство образцов уникального варианта LMP1-Таt^к (5/7) характеризуется семью повторами, состоящими из 11 а.к. и, за исключением двух (Т33 и Т45) из семи образцов, отсутствием вставок 5 а.к. между 2-м и 3-м повторами, что характерно для высокотрансформирующего варианта Сао. Для большинства образцов варианта Таt^к (5/7) также типична точковая мутация — замена аспарагиновой кислоты на глицин (D \rightarrow G). Для большей части остальных татарских образцов (23/34) были характерны вставки 5 а.к. между 2-м и 3-м повторами, типичные для прототипного варианта B95.8, а также частые че-

Таблица 3. Варианты LMP1 у больных ВЭБ-ассоциированной патологией и здоровых лиц в России **Table 3.** LMP1 variants in Russian patients with EBV-associated pathologies and healthy individuals

Типы образцов Sample types	Количество образцов Number of samples	Варианты LMP1 по классификациям R. Edwards и соавт. [17] LMP1 classifications by R. Edwards et al. [17]							
		B95.8	China 1	Med+	Med-	NC	вне классификации out of classification	Tat ^K	
			Рак нос Nasopharynge						
Опухоль Tumor	50*	7	9	16	12	5	1	_	
Смыв полости рта Oral washing	20	6	-	6	4	3	1	_	
			Лимфома Hodgkin's	Ходжкина lymphoma					
Опухоль Tumor	9	4	1	_	2	2	_	_	
Смыв полости рта Oral washing	2	1	_	-	-	1	_	-	
			Heходжкинск Non-Hodgkin						
Опухоль Гumor	6	3	1	1	_	1	_	_	
Смыв полости рта Oral washing	5	2	-	-	-	2	1	-	
			Рак же Stomacl						
Опухоль Гиmor	8	3	1	1	1	2	_	_	
Смыв полости рта Oral washing	6	6	_	-	_	-	_	_	
ДОПР (кровь) ЭТОС (blood)	40**	10	10	7	8	5	_	_	
Доноры (кровь) Donors (blood)	28***	15	4	2	2	5	-	_	
ИМ (кровь) M(blood)	10	5	_	_	2	1	2	_	
Всего Гоtal	184	62	26	33	31	27	5	_	

Примечание. ДОПР – больные с другими опухолями полости рта; ИМ – больные инфекционным мононуклеозом; доноры – здоровые лица; * среди больных раком носоглотки было 26 славян и 24 представителя Северо-Кавказского федерального округа России (в основном мусульмане); ** среди больных ДОПР было 32 представителя славян и 8 представителей Северо-Кавказского федерального округа России (в основном мусульмане); *** в числе доноров было 9 славян и 19 представителей Северо-Кавказского федерального округа России (в основном мусульмане).

Note. OTOC – patients with other tumors of the oral cavity; IM – patients with infectious mononucleosis; donors – healthy individuals; * among nasopharyngeal carcinoma patients there were 26 Slavs and 24 representatives of the North Caucasian Federal District of Russia (mainly Muslims); ** among patients with OTOC there were 32 representatives of the Slavs and 8 representatives of the North Caucasus Federal District of Russia (mainly Muslims); *** among the donors there were 9 Slavs and 19 representatives of the North Caucasus Federal District of Russia (mainly Muslims).

тырёхчленные 11 а.к. повторы (17/34) и достаточно редко встречающаяся точковая мутация $D \to G$, отсутствующая у прототипного варианта B95.8. Таким образом, можно сделать вывод, что по структуре аминокислотных повторов и вставок в С-терминальной области образцы варианта LMP1-Tat^K существенно отличаются от остальных образцов LMP1 этнических татар и схожи с высокотрансформирующим вариантом LMP1-Cao.

Обнаружение среди населения Татарстана персистенции штаммов ВЭБ, кодирующих высокотрансформирующий вариант LMP1-China1 и Сао-подобный вариант LMP1-Tat^к (отсутствующий у представителей славян), стимулировало нас сравнить показатели

заболеваемости и смертности от новообразований, в состав которых входят опухоли, ассоциированные с ВЭБ, для населения Республики Татарстан и Москвы (рис. 3).

По данным рис. 3, а, заболеваемость раком желудка среди населения Татарстана была выше (116,7), чем среди населения Москвы (90,0) при статистически значимом различии (*p*<0,05). Показатели заболеваемости злокачественными опухолями, возникающими в полости рта и глотки, были также несколько выше среди татарского населения, хотя заболеваемость злокачественными лимфомами оказалась выше у москвичей. Различия во всех этих случаях были статистически недостоверными

253 а.к. – 253 а.а.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

```
B95.8
        PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL
        PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL
     PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PPDPL
T2
     PQDPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PPDPL
T4
     PQDPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PPDPL
T5
     PQDPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL
T6
T33 PQDPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PHDPL PQGPDNTDDNG PQDPDNTTDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL
T44 PQDPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PDPL
     PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL
T45
     PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL
T1
     PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PDPL
T3
     PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL PQDPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PHDPL
T10 PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PDPL
T11 PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL
T13 PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL PQDPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PHDPL
T14 PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PDPL
T15 PQDPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQGPDNTTDNG PHDPL
T16 PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL
T18 PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL
T19 PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDSLDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL
T20 PQDPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PHDPL PQDPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PHDPL
     PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PDPDNTDDNG PHDPL
T21
      PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PDPL
T25
T27 PQDPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PHDPL PQGPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PHDPL
T28 PQDPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PHDPL PQDPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNGP******* PHDPL
T29
     PODPDNTDDNG PODPDNTDDNG PODPDNTTDNG PHDPL
T31 PQDPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTTDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNGP PHDPL
T32 PQDPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PHDPL PQGPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PHDPL
T34 PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL PQDPDNTDDNG PQGPDNTTDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL
T35
     PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL PQDPDNTDDNG PQDPDNTTDNG PHDPL
T36 PODPDNTDDNG POGPDNTDDNG PHDPL PODPDNTDDNG POGPDNTDDNG PHDPL
T42 PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL PQDPDNTDDNG PQGPDNTTDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL
      PQDPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PHDPL PQGPDNTDDNG PQDPDSTDDNG PHDPL
T46 PQDPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PDPL
T48 PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL PQDPDNTDDNG PQDPDNTTDNG PHDPL
T49
      PODPDNTDDNG PODPDNTDDNG PHDPL PODPDNTDDNG PODPDSTDDNG PHDPL
T50 PQDPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL
T53 PODPDNTDDNG PODPDNTDDNG **PLP PODPDNTDDNG PODPDNTDDNG PODPDNTDDNG PODPDNTDDNG PODPDNTDDNG PDPDNTDDNG PDPNDNTDDNG PDPDNTDDNG PDPDNTDDNG PDPDNTDDNG PDPDNTDDNG PDPDNTDDNG PDPDNTDDNG PDPNDNTDDNG PDPNDND PDPND
T54 PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDSLTDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL
T56 PQDPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PHDPL PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL
      PQDPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL PQGPDNTDDNG PQDPDNTDDNG PHDPL
T57
     PQDPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PHDPL PQDPDNTDDNG PQGPDNTDDNG PHDPL
```

306 а.к. – 306 а.а.

Рис. 2. Варианты 11 а.к. повторов в домене 253–306 а.к. С-терминального сайта LMP1 в изолятах ВЭБ от этнических татар. Т – обозначение образцов LMP1; PQDPDNTDDNG – повторяющиеся элементы 11 а.к.; PHDPL – вставка 5 а.к. последовательностей; D→G – точечные мутации в области 11 а.к.

Fig 2. Variants of 11 aa repeats of the C-terminal domain in LMP1 isolates from Tatars.

T – denotes the LMP1 isolates; PQDPDNTDDNG – 11 aa repeated elements; PHDPL – 5 aa insertion; D→G – site-specific mutations in 11 aa region.

(*p*>0,05). Показатели смертности от всех вышеперечисленных патологий (см. рис. 3, б) были несколько выше для населения Татарстана, но различия также были статистически недостоверными. Таким образом, можно сделать вывод, что персистенция среди населения Татарстана штаммов ВЭБ, кодирующих высокотрансформирующий вариант LMP1-Cao и Cao-подобный вариант LMP1-Tat^к, не оказывает влияния на показатели заболеваемости и смертности от злокачественных патологий, включая случаи, ассоциированные с ВЭБ. Такой вывод представляется логичным, учитывая тот факт, что процент опухолей, в возникновении которых ВЭБ играет роль этиологического фактора, как правило, крайне незначителен (1–3%), особенно для неэндемичных регионов, каковыми являются Республика Татарстан и центральные области России, в частности Москва и Московская область.

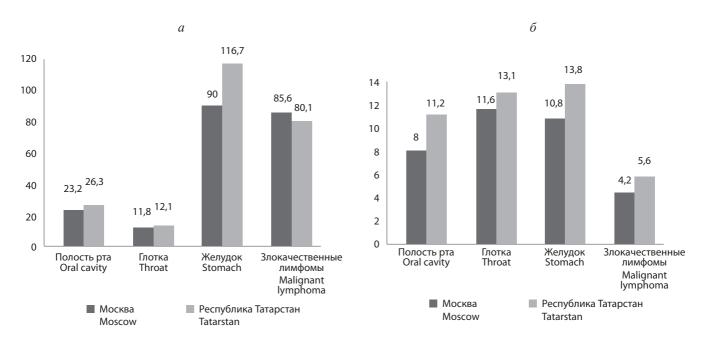


Рис. 3. Стандартизованные показатели заболеваемости (а) и смертности (б) от новообразований, включая случаи, ассоциированные с вирусом Эпштейна–Барр, среди населения Татарстана и Москвы в 2019 г. (оба пола).

Fig. 3. Standardized morbidity (a) and mortality (b) for some types of tumors including cases associated with the EBV among populations of Tatarstan and Moscow in 2019 (both of sexes).

Обсуждение

Результаты проведённых исследований позволили нам высказать предположение, что штамм ВЭБ-Таt^к, содержащий уникальный вариант LMP1, LMP1-Tat^к, с двумя делециями 5 а.к., в кодонах 312-316 и 382-386 а.к., относится к древним вариантам вируса. В пользу высказанного предположения, по-видимому, свидетельствует тот факт, что ВЭБ-Таt^к обнаружен только у представителей одного из древнейших этносов страны, татар, генетически ведущих свой род от монголо-татарских племён, сформировавших Казанское ханство в Поволжье после выделения его из состава Золотой Орды ещё в 1438 г. Указанный штамм вируса не был обнаружен ни среди представителей этнических славян, ни в компьютерной базе данных. Не выявлен он и у россиян, представителей других национальностей, при изучении образцов опухоли, крови и смывов полости рта от больных ВЭБ-ассоциированным раком носоглотки, больных с другими опухолями полости рта, раком желудка, лимфомой Ходжкина и другими патологиями, а также доноров крови.

Однако следует признать, что указанных аргументов недостаточно для утверждения древности штамма ВЭБ-Таt^к. Известно, что миллионы лет назад в процессе эволюции вновь возникающие вирусы оказывались более приспособленными к изменяющимся условиям окружающей среды, чем их предшественники. Старые штаммы, скорее всего, постепенно вытеснялись новыми, более жизнеспособными штаммами. Определённую ясность в этот непростой вопрос могло бы, вероятно, внести обнаружение родственных ВЭБ-Таt^к штаммов вируса у предшественников человека – человекообразных обезьян, которые

предположительно могли сохранить до наших дней аналоги древних штаммов вируса. Действительно, у приматов ВЭБ-подобные лимфокриптовирусы ассоциированы с лимфопролиферативными нарушениями и злокачественными новообразованиями, схожими с описанными у людей с иммунодефицитными состояниями [22]. Известно, также, что ВЭБ-подобные лимфокриптовирусы выявлены у человекообразных обезьян. Два типа лимфокриптовирусов, схожих с ВЭБ 1-го и 2-го типа у людей, были обнаружены у западных равнинных горилл и орангутангов, а лимфокриптовирус, схожий с ВЭБ 1-го типа, был продемонстрирован у шимпанзе [23, 24].

В связи с полученными данными возникает вопрос, не является ли обнаруженный нами уникальный штамм ВЭБ с вариантом LMP1-Тат^к так называемым локальным Волжским штаммом вируса, подобно географически привязанным штаммам ВЭБ в классификации R. Edwards и соавт. [17]. Как известно, эта классификация состоит из средиземноморских (Med+и Med-), китайских (China1, 2, 3) и американских (NC и Alaskan) вариантов LMP1. Ответ на поставленный нами вопрос, вероятно, можно будет получить, изучив изоляты ВЭБ от других этнических представителей Поволжья, в частности, жителей республик Калмыкия, Марий Эл и Чувашия.

В связи с обнаружением штамма ВЭБ, содержащего LMP1 с ранее не встречавшимися мутациями, делециями 5 а.к. в кодонах 312–316 и 382–386 а.к., также представляется важным выяснить функциональные свойства этого онкогена, его трансформирующий потенциал и другие свойства, что станет предметом наших дальнейших исследований. Дело в том, что

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

последствия эволюционных изменений в гене LMP1 практически не изучены. Неизвестно, являются ли новые или рекомбинантные варианты LMP1 более патогенными или специфически ответственными за высокий уровень заболеваемости ВЭБ-ассоциированными патологиями, в том числе у людей с ослабленным иммунитетом. В настоящее время мало данных для ответов на поставленные вопросы. Можно предположить, что новый вариант аминокислотных последовательностей LMP1, благодаря включению двух уникальных делеций 5 а.к. в кодонах 312-316 и 382-386, может изменить функцию или иммуногенность белка LMP1, тем самым изменив его роль в патогенезе заболевания. Попытка выявить повышенные показатели заболеваемости или смертности от злокачественных опухолей, включая ассоциированные с ВЭБ, среди жителей Татарстана, носителей уникального штамма вируса, ВЭБ- \hat{T} а t^K , оказалась несостоятельной, скорее всего, в силу низкого числа ВЭБ-ассоциированных случаев в каждой изученной нозологической группе опухолей. Изучение патогенеза и клинических проявлений опухолевого процесса в случаях новообразований, ассоциированных с ВЭБ-Таt^к, возможно, прольёт свет на функциональные и другие свойства LMP1-Tat^к вируса.

Благодарность. Авторы выражают признательность и глубокую благодарность С.В. Петрову, доктору медицинских наук, профессору Республиканского клинического онкологического диспансера Министерства здравоохранения Республики Татарстан, за помощь в организации и сборе биологического материала от представителей татар в третьем поколении.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-13, 15-18, 20-24 см. REFERENCES)

- Гурцевич В.Э., Яковлева Л.С., Щербак Л.Н., Гончарова Е.В., Смирнова К.В., Дидук С.В. и др. Сиквенсные варианты онкогена LMP1 у больных опухолями полости рта, ассоциированными и не ассоциированными с вирусом Эпштейна-Барр. Молекулярная биология. 2013; 47(6): 987.
 DOI: http://doi.org/10.7868/S0026898413050042
- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 году. М.; 2019.

REFERENCES

- Koonin E.V., Dolja V.V., Krupovic M. Origins and evolution of viruses of eukaryotes: The ultimate modularity. *Virology*. 2015; 479-480: 2-25.
 DOI: http://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.039
- Ehlers B., Spiess K., Leendertz F., Peeters M., Boesch C., Gatherer D., McGeoch D.J. Lymphocryptovirus phylogeny and the origins of Epstein-Barr virus. J.Gen. Virol. 2010; 91: 630-642. Doi: 10.1099/ vir.0.017251-0.
- Zhdanov V.M., Tikchonenko T.I. Viruses as a factor of evolution: exchange of genetic information in the biosphere. *Adv. Virus Res.* 1974; 19: 361-94. DOI: http://doi.org/10.1016/s0065-3527(08)60664-8
- Forterre P. Giant viruses: conflicts in revisiting the virus concept. *Intervirology*. 2010; 53(5): 362-78.
 DOI: http://doi.org/10.1159/000312921
- Krupovic M., Dolja V.V., Koonin E.V. Origin of viruses: primordial replicators recruiting capsids from hosts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2019; 17(7): 449-58.
 DOI: http://doi.org/10.1038/s41579-019-0205-6
- Leppard K., Dimmock N., Easton A. Introduction to Modern Virology. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2007.

- Mahy B.W. Strategies of virus persistence. Br. Med. Bull. 1985; 41(1): 50-5.
 - DOI: http://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072024
- Mahy B.W. Human viral infections: an expanding frontier. *Antiviral Res.* 1997; 36(2): 75-80.
 DOI: http://doi.org/10.1016/s0166-3542(97)00042-9
- Walling D.M., Shebib N., Weaver S.C., Nichols C.M., Flaitz C.M., Webster-Cyriaque J. The molecular epidemiology and evolution of Epstein-Barr virus: sequence variation and genetic recombination in the latent membrane protein-1 gene. *J. Infect. Dis.* 1999; 179(4): 763-74.
- DOI: http://doi.org/10.1086/314672
 Itakura O., Yamada S., Narita M., Kikuta H. High prevalence of a 30-base pair deletion and single-base mutations within the carboxy terminal end of the LMP-1 oncogene of Epstein-Barr virus in the Japanese population. *Oncogene*. 1996; 13(7): 1549-53.
- Kingma D.W., Weiss W.B., Jaffe E.S., Kumar S., Frekko K., Raffeld M. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 oncogene deletions: correlations with malignancy in Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders and malignant lymphomas. *Blood*. 1996; 88(1): 242-51.
 Falk K., Gratama J.W., Rowe M., Zou J.Z., Khanim F., Young L.S.,
- Falk K., Gratama J.W., Rowe M., Zou J.Z., Khanim F., Young L.S., et al. The role of repetitive DNA sequences in the size variation of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigens, and the identification of different EBV isolates using RFLP and PCR analysis. *J. Gen. Virol.* 1995; 76(Pt. 4): 779-90.
- DOI: http://doi.org/10.1099/0022-1317-76-4-779

 13. Walling D.M., Raab-Traub N. Epstein-Barr virus intrastrain recombination in oral hairy leukoplakia. *J. Virol.* 1994; 68(12): 7909-17
- Gurtsevich V.E., Yakovleva L.S., Shcherbak L.N., Goncharova E.V., Smirnova K.V., Diduk S.V., et al. Sequence variants of LMPI oncogene in patients with oral cavity tumors associated and not associated with Epstein-Barr virus. *Molekulyarnaya biologiya*. 2013; 47(6): 987.
- DOI: http://doi.org/10.7868/S0026898413050042 (in Russian)

 15. Parra B., Slots J. Detection of human viruses in periodontal pockets using polymerase chain reaction. *Oral. Microbiol. Immunol.* 1996; 11(5): 289-93.
 - DOI: http://doi.org/10.1111/j.1399-302x.1996.tb00183.x
- Hahn P., Novikova E., Scherback L., Janik C., Pavlish O., Arkhipov V., et al. The LMP1 gene isolated from Russian nasopharyngeal carcinoma has no 30-bp deletion. *Int. J. Cancer.* 2001; 91(6): 815-21. DOI: http://doi.org/10.1002/1097-0215(200002)9999:9999<::AID-IJC1122>3.0.CO;2-W
- Edwards R.H., Seillier-Moiseiwitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein-Barr virus strains. *Virology*. 1999; 261(1): 79-95. DOI: http://doi.org/10.1006/viro.1999.9855
- Miller W.E., Edwards R.H., Walling D.M., Raab-Traub N. Sequence variation in the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. J. Gen. Virol. 1994; 75(Pt. 10): 2729-40. DOI: http://doi.org/10.1099/0022-1317-75-10-2729
- Kaprin A.D., Starinskiy V.V., Petrova G.V. The state of oncological care for the population of Russia in 2018. Moscow; 2019. (in Russian)
- Senyuta N., Yakovleva L., Goncharova E., Scherback L., Diduk S., Smirnova K., et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma and other oral cavity tumors in Russia. *J. Med. Virol.* 2014; 86(2): 290-300. DOI: http:// doi.org/10.1002/imv.23729
- doi.org/10.1002/jmv.23729
 21. Kanai K., Satoh Y., Saiki Y., Ohtani H., Sairenji T. Difference of Epstein-Barr virus isolates from Japanese patients and African Burkitt's lymphoma cell lines based on the sequence of latent membrane protein 1. *Virus Genes*. 2007; 34(1): 55-61.
 DOI: http://doi.org/10.1007/s11262-006-0010-y
- Voevodin A.F., Hirsch I. Immunoprecipitation of Epstein-Barr virus (EBV)-specific proteins by prelymphomatous and normal baboon sera containing antibodies reactive with EBV early antigen. *Acta Virol*. 1985; 29(3): 242-6.
- Ehlers B., Spiess K., Leendertz F., Peeters M., Boesch C., Gatherer D., et al. Lymphocryptovirus phylogeny and the origins of Epstein-Barr virus. *J. Gen. Virol.* 2010; 91(Pt. 3): 630-42.
 DOI: http://doi.org/10.1099/vir.0.017251-0
- Ehlers B., Ochs A., Leendertz F., Goltz M., Boesch C., Mätz-Rensing K. Novel simian homologues of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 2003; 77(19): 10695-9.
 DOI: http://doi.org/10.1128/jvi.77.19.10695-10699.2003

ORIGINAL RESEARCH

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020



Интерферон-регулирующая активность препарата ЦелАгрип и его влияние на образование активных форм кислорода и экспрессию генов врождённого иммунитета в перевиваемых культурах клеток лимфомы Бёркитта

Наровлянский А.Н.¹, Полосков В.В.¹, Иванова А.М.¹, Мезенцева М.В.¹, Суетина И.А.¹, Руссу Л.И.¹, Челарская Е.С.¹, Изместьева А.В.¹, Оспельникова Т.П.¹, Зубашев И.К.¹, Сарымсаков А.А.², Ершов Ф.И.¹

Введение. Интерфероны (IFN) и их индукторы эффективны в подавлении вирусной репродукции и коррекции механизмов врождённого иммунитета.

Цель исследования – проверить гипотезу возможного участия индуктора IFN ЦелАгрип (ЦА) в качестве активатора или супрессора противовирусного ответа в культурах клеток лимфомы Бёркитта (ЛБ), различающихся по способности продуцировать антигены вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ).

Материал и методы. Использовали линии человеческих клеток ЛБ P3HR-1 и Namalva, спонтанно продуцирующие и не продуцирующие антигены ВЭБ. Выполнен кинетический анализ динамики продукции активных форм кислорода (АФК) и определена экспрессия группы генов методом ПЦР в реальном времени в ответ на обработку ЦА.

Результаты и обсуждение. При обработке ЦА в клетках Namalva обнаружено снижение индекса активации АФК, в клетках P3HR-1 наблюдали его повышение. В клетках Namalva после обработки ЦА отсутствовала достоверная активация генов *IFN-\alpha*, - β и - λ , но возрастала кратность экспрессии гена *ISG15* более чем в 1200 раз и гена P53 (*TP53*) – в 4,5 раза. При обработке ЦА клеток P3HR-1 экспрессия генов *IFN-\alpha* возрастала более чем в 200 раз, *IFN-\lambda* – в 100 раз и гена *ISG15* – в 2,2 раза. Предполагается взаимосвязь *IFN-*индуцирующего действия ЦА с активностью *ISG15* и АФК в перевиваемых культурах клеток ЛБ, продуцирующих и не продуцирующих антигены ВЭБ.

Заключение. В клетках Namalva, не продуцирующих антигены ВЭБ, при обработке ЦА подавляется генерация АФК и активизируется экспрессия генов *ISG15* и Р53 (*TP53*); в клетках Р3HR-1, продуцирующих антигены ВЭБ, наблюдается обратная картина: активизируются образование АФК и экспрессия генов *IFN-\alpha* и - λ и супрессируется активность генов *ISG15* и Р53 (*TP53*).

Ключевые слова: индуктор интерферона; лимфома Бёркитта; вирус Эпштейна–Барр; активные формы кислорода; экспрессия генов; интерферон-стимулированный ген 15.

Для цитирования: Наровлянский А.Н., Полосков В.В., Иванова А.М., Мезенцева М.В., Суетина И.А., Руссу Л.И., Челарская Е.С., Изместьева А.В., Оспельникова Т.П., Зубашев И.К., Сарымсаков А.А., Ершов Ф.И. Интерферон-регулирующая активность препарата ЦелАгрип и его влияние на образование активных форм кислорода и экспрессию генов врождённого иммунитета в перевиваемых культурах клеток лимфомы Бёркитта. Вопросы вирусологии. 2020; 65(2): 87-94.

DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-87-94

Для корреспонденции: Наровлянский Александр Наумович, д-р биол. наук, проф., глав. науч. сотр. ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва. E-mail: narovl@yandex.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований по проекту (гранту) № 18-515-41001/19.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: формулировка идеи, цели, задач, анализ литературы и экспериментальных данных, обсуждение, написание и оформление – Наровлянский А.Н., Ершов Ф.И., Сарымсаков А.А., Мезенцева М.В.; экспериментальная работа (исследование экспрессии группы генов методом ПЦР в реальном времени), оформление – Полосков В.В., Челарская Е.С., Зубашев И.К.; экспериментальная работа (кинетический анализ динамики продукции АФК), статистическая обработка, оформление – Иванова А.М., Изместьева А.В.; экспериментальная работа (культура клеток, контроль качества) – Суетина И.А., Руссу Л.И., Оспельникова Т.П.

Поступила 16.03.2020 Принята в печать 31.03.2020

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

² Институт химии и физики полимеров Академии наук Республики Узбекистан, 100128, Ташкент, Узбекистан

Interferon-regulating activity of the CelAgrip drug and its influence on the formation of reactive oxygen species and expression of innate immunity genes in Burkitt's lymphome cell cultures

Alexander N. Narovlyansky¹, Vladislav V. Poloskov¹, Alla M. Ivanova¹, Marina V. Mezentseva¹, Irina A. Suetina¹, Leonid I. Russu¹, Ekaterina S. Chelarskaya¹, Anna V. Izmest'eva¹, Tatiyana P. Ospelnikova¹, Igor K. Zubashev¹, Abdushukur A. Sarymsakov², Feliks I. Ershov¹

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

² Institute of Polymer Chemystry and Physics, Tashkent, 100128, Uzbekistan

Introduction. Interferons (IFN) and IFN inducers are effective in suppressing viral reproduction and correcting of the innate immunity mechanisms.

The aim of the study was to test the hypothesis of the possible involvement of the IFN inducer CelAgrip (CA) as an activator or suppressor of antiviral effects in Burkitt's lymphoma (LB) cell cultures with different ability to produce Epstein–Barr virus antigens (EBV).

Material and methods. The kinetic analysis of the dynamics of reactive oxygen species (ROS) production and determination of gene group expression by real-time PCR in response to CA treatment were done in human cell lines LB P3HR-1 and Namalva, spontaneously producing and not producing EBV antigens.

Results and discussion. When treating CA in Namalva cells, a decrease in the ROS activation index was found; in P3HR-1 cells, an increase was observed. After treatment with CA, there was no reliable activation of the $IFN-\alpha$, $IFN-\beta$ and $IFN-\lambda$ genes in Namalva cells, but the expression of the ISG15 and P53(TP53) genes was increased more than 1200 times and 4.5 times, respectively. When processing the CA of P3HR-1 cells, the expression of $IFN-\alpha$ genes increased by more than 200 times, $IFN-\lambda$ – 100 times, and the ISG15 gene – 2.2 times. The relationship between IFN-inducing action of CA and the activity of ISG15 and ROS in LB cell cultures producing and not producing EBV antigens is supposed.

Conclusion. In Namalva cells that do not produce EBV antigens the treatment of CA results in suppression of ROS generation and activation of the expression of genes ISG15 and P53 (TP53); in P3HR-1 cells producing EBV antigens, the opposite picture is observed – the formation of ROS and the expression of the $IFN-\alpha$ and $IFN-\lambda$ genes are activated and the activity of the ISG15 and P53 (TP53) genes is suppressed.

Keywords: interferon inducer; Burkitt's lymphoma; Epstein–Barr virus; reactive oxygen species; gene expression; interferon-stimulated gene 15.

For citation: Narovlyansky A.N., Poloskov V.V., Ivanova A.M., Mezentseva M.V., Suetina I.A., Russu L.I., Chelarskaya E.S., Izmest'eva A.V., Ospelnikova T.P., Zubashev I.K., Sarymsakov A.A., Ershov F.I. Interferon-regulating activity of the CelAgrip drug and its influence on the formation of reactive oxygen species and expression of innate immunity genes in Burkitt's lymphome cells cultures. *Voprosy Virusologii* (*Problems of Virology*). 2020; 65(2): 87-94. (In Russian).

DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-87-94

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

Information about the author:

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

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

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

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

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

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

Chelarskaya E.S., https://orcid.org/0000-0002-5254-0493

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

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

Zubashev I.K., https://orcid.org/0000-0002-3238-7778

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

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

Acknowledgments. This work was financially supported by the Russian Foundation for Basic Research for the project (grant) No. 18-515-41001/19.

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

Contribution: formulation of ideas, goals, objectives, analysis of literature and experimental data, discussion, writing and design – Narovlyansky A.N., Ershov F.I., Mezentseva M.V., Sarymsakov A.A.;

experimental work (study of gene group expression by real-time PCR), computer data processing, design – Poloskov V.V., Chelarskaya E.S., Zubashev I.K.;

experimental work (kinetic analysis of the dynamics of ROS production), statistical processing, design – Ivanova A.M., Izmest'eva A.V.; experimental work (cell culture, quality control) – Suetina I.A., Russu L.I., Ospelnikova T.P.

Received 16 March 2020 Accepted 31 March.2020

ORIGINAL RESEARCH

Введение

Интерфероны (IFN) и их индукторы активно участвуют в подавлении вирусной репродукции и коррекции механизмов врождённого иммунитета, поэтому уже более полувека используются для терапии и профилактики вирусных инфекций [1, 2]. Вместе с тем индукторы IFN обладают антиокислительной активностью. Активные формы кислорода (АФК) существуют в виде свободнорадикальных молекул с выраженной окислительной способностью [3] и являются важным системным компонентом организма человека, обеспечивающим его нормальную жизнедеятельность. АФК часто возникают при нарушении функционирования электронно-транспортных цепей митохондрий или микросом [4-6] и участвуют как в реализации физиологических функций здорового организма, так и в патогенезе вирусных и онкологических заболеваний. При этом уровень АФК в тканях или клетках считается одним из основных оценочных факторов [7, 8].

Вирус Эпштейна-Барр (ВЭБ), или человеческий герпесвирус 4 (HHV-4), относится к подсемейству гаммагерпесвирусов (Gammaherpesvirinae) и является одним из самых распространённых в человеческой популяции, инфицируя более 95% взрослого населения. Он вызывает инфекции ротовой полости (инфекционный мононуклеоз и волосатая лейкоплакия) и ассоциируется с назофарингеальной карциномой, карциномой желудка, В-клеточной лимфомой (включая лимфому Бёркитта (ЛБ, Burkitt's lymphoma)), посттрансплантационным лимфопролиферативным синдромом, лимфомами Ходжкина и не-Ходжкина [9], а также с повышенным риском развития рассеянного склероза [10]. ВЭБ способен успешно уклоняться и обходить первую линию противовирусной защиты – врождённый иммунитет, разрушая механизмы врождённой иммунной сигнализации, активируемые Toll-, RIG-I-, NOD- и AIM2-подобными рецепторами, а также циклической GMP-AMP-синтазой. ВЭБ также противодействует выработке и передаче IFN-сигналов, включая пути TBK1-IRF3 и JAK-STAT [11]. Наконец, ВЭБ способен эффективно трансформировать in vitro В-клетки в «бессмертные» линии лимфобластных клеток, что широко используется для исследований лабораториями по всему миру [12].

Разработка новых лекарственных препаратов, способных изменять активность генов *IFN* в клетках, латентно инфицированных ВЭБ, и тем самым влиять на состояние врождённого иммунитета, представляет в настоящее время актуальную задачу. В Институте химии и физики полимеров Академии наук Республики Узбекистан (РУ) разработан новый противовирусный лекарственный препарат ЦелАгрип (CelAgrip, (ЦА)), который разрешён Минздравом РУ в качестве профилактического и лечебного средства при гриппе и острых респираторных вирусных инфекциях [13].

В ранее проведённых исследованиях [14] нами было показано, что при обработке ЦА клеток ЛБ наблюдались активация генной экспрессии *IFN-\lambda*, интерлейкинов (*IL*) -1 β , -6, -8 и супрессия активности гена *IL-10*.

Цель настоящей работы — проверить гипотезу возможного участия индуктора интерферона ЦелАгрип в качестве активатора или супрессора противовирусного ответа в культурах клеток лимфомы Бёркитта, различающихся по способности продуцировать антигены ВЭБ. Для этого исследовали способность ЦА генерировать АФК и влиять на экспрессию группы генов: P53 (TP53), NF- κB , IFN- $\alpha 2$, - $\beta 1$, - $\lambda 1$ и IFN-стимулированного гена ISG15.

Материал и методы

Клетки: 1) перевиваемая линия человеческих клеток ЛБ P3HR-1, спонтанно продуцирующая антигены ВЭБ, была выделена и распространена Y. Ніпита и соавт. [15]; 2) перевиваемая линия человеческих клеток ЛБ Namalva, не продуцирующая антигены ВЭБ, была получена G. Klein и соавт. [16]. Обе линии получены из лаборатории культур тканей подразделения Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Культивирование перевиваемых линий клеток осуществляли в питательной среде Игла ДМЕМ или RPMI-1640 (ООО «Биолот», Санкт-Петербург) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific Inc., США) в $\mathrm{CO_2}$ -инкубаторе при 37 °C и 5% $\mathrm{CO_2}$.

Препараты. ЦА является натриевой солью сополимера (1 \rightarrow 4)-6-0-карбоксиметил- β -D-глюкозы, (1 \rightarrow 4)- β -D-глюкозы, (2 \rightarrow 24)2,3,14,15,21,24,29,32-октагидрокси-23-(карбоксиметоксиметил)-7,10-диметил-4,13-ди(2-пропил)-19,22,26,30,31-пентаоксагенацикло [23,3,2,2¹⁶O^{5,28}O^{9,18}O^{12,17}] дотриактонта 1,3,5(28),6,6(27),9(18),10,12(17),13,15-декаена; препарат предоставлен Институтом химии и физики полимеров Академии наук РУ.

Олигонуклеотидные ПЦР-праймеры. Использовали готовые структуры олигонуклеотидных праймеров, ранее рассчитанные в программе Primer 3 Blast NCBI GB и апробированные к исследованным видам мР-HK: P53 (TP53) [17], $NF-\kappa B$ [18], $IFN-\alpha 2$ [19], $IFN-\beta 1$, $IFN-\lambda 1$, ISG15 [20], глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH) [21]. Синтез олигонуклеотидов осуществлён фирмой «Синтол» (Россия).

Постановка опытов на клеточных линиях Namalva и P3HR1 с препаратом ЦА. Клетки высевали в культуральные флаконы (25 см³) в концентрации 1,5 млн/мл, обрабатывали ЦА в конечной концентрации 0,05, 0,5 и 5 мг/мл и инкубировали в течение 24 ч при 37 ± 2 °C (CO_2 5,0 ± 0,5 %; влажность 70 ± 5 %. Через 24 ч клетки центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин и осадок обрабатывали лизирующим буфером.

Выделение РНК. Суммарную РНК выделяли с помощью готового набора для выделения РНК «РНК-экстран» («Синтол», Россия).

Реакция обратной транскрипции (ОТ). Реакцию ставили с помощью готового набора для проведения ОТ («Синтол», Россия) с универсальным праймером random 6 согласно прилагаемой инструкции. Полученные кДНК хранили при -70 °C.

Обратную транскрипцию и полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ) проводили на амплификаторе CFX-96 с готовой двукратной смесью SsoAdvanced SYBR Green Supermix (Bio-Rad, США) в микропробирках с оптически проницаемыми крышками на 0,2 мл (SSI, США). В ПЦР-боксе смешивали 2 мкл специфических пар праймеров (прямой и обратный) с 3 мкл кДНК (разведённой в 3 раза) и 5 мкл 2-кратной смеси SsoAdvanced SYBR Green Supermix. Каждую пробу исследовали в 2-3 повторах. Программа ПЦР: 96 °C - 2 мин (1 цикл), далее 50–55 циклов 94 °C – 10 c, 55–60° C – 20 с, 72 °C – 30 с. Программа плавления в конечной точке 65–95 °C, шаг 0,5 °C – 10 с. На экране компьютера (в реальном времени) регистрировали уровни флюоресценции, интеркалирующего в ДНК красителя SYBR Green, в виде кривых накопления ДНК-амплификатов. Количество оценивали по пороговым циклам (Сq) начала логарифмической фазы синтеза. Негативный контроль (проба, не содержащая кДНК) не давал специфических ПЦР-продуктов. Обработка данных амплификации выполнена в программе CFX Manager Software «Gene expression analysis» (Bio-Rad, США) в автоматическом режиме. Определены стандартные отклонения величин $Cq \pm SD$ логарифмической фазы и изменения уровней в опытных пробах $(\Delta Cq \pm SD)$. Ген «домашнего хозяйства» $GAPD\hat{H}$ был использован как стабильный референс-нормализатор генной экспрессии. Изменения генной активности $(2^{\Delta Cq})$ оценивали относительно контроля, принятого равным 1. Специфичность ДНК-продуктов устанавливали по Т-плавления.

Кинетический анализ динамики продукции АФК клетками в ответ на обработку препаратами проводили хемилюминесцентным методом [22] в присутствии люминола (конечное разведение в реакции 5,6·10-4 М), модифицированным и адаптированным под исследования с конкретными тест-клетками и препаратом ЦА. Постановку реакции проводили в 96 луночных планшетах в объеме 200 мкл/лунку. В каждом постановочном варианте проводили не менее 3 повторов, из которых рассчитывали средний показатель. Учитывали результаты реакции на приборе Synergy H1 (BioTek, CША). При измерении отмечали максимальные показатели интенсивности свечения (спонтанной и в присутствии препарата ЦА) (I), а также площадь (S) под кривой динамики свечения за период наблюдения. Для определения интенсивности продукции АФК в каждом временном периоде определяли индекс активации в соответствии с формулой I опыт./I спон. или S опыт./S спон. Значение индекса активации, равное 1, представляет точку отсчёта для определения стимуляции (>1) или подавления (<1) продукции АФК клетками.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

Результаты

Продукция АФК. При обработке клеток препаратом ЦА в клетках Namalva обнаружено снижение индекса активации АФК, при этом в клетках P3HR-1, наоборот, наблюдали его увеличение (I опыт./I спон. — 0.76 ± 0.043 для Namalva и 1.30 ± 0.109 для P3HR-1, p<0.001; S опыт./S спон. — 0.86 ± 0.053 для Namalva и 1.12 ± 0.084 для P3HR-1, p<0.01) (рис. 1).

Исходя из полученных данных был сделан вывод о выраженной разнонаправленности ЦА-индуцируемой генерации АФК в клетках линий Namalva и P3HR-1.

Экспрессия генов цитокинов (ОТ-ПЦР-РВ). В клет-ках Namalva через 24 ч обработки ЦА не обнаруживается достоверной активации генов IFN- $\alpha 2$, - $\beta 1$, - $\lambda 1$. При этом возрастает кратность экспрессии ISG15 более чем в 1200 раз, гена Р53 (TP53) — в 4,5 раза, NF- κB — в 3,2 раза. В то же время при обработке ЦА клеток Р3HR-1 активность генов IFN- $\alpha 2$ возрастала более чем в 200 раз и IFN- $\lambda 1$ — в 100 раз, а экспрессия гена ISG15 возрастала только в 2,2 раза. Достоверной активация генов Р53 (TP53) и IFN- $\beta 1$ не обнаружено. На рис. 2 (а, б) представлены данные, показывающие кратность стимуляции генов, нормализованных по гену GAPDH, которые свидетельствуют об уровне генной экспрессии при действии препарата ЦА в клеточных линиях Namalva и P3HR-1.

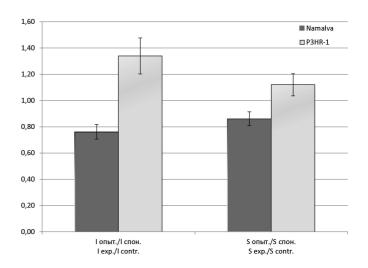


Рис. 1. Продукция активных форм кислорода клетками Namalva и P3HR-1 в ответ на обработку препаратом ЦелАгрип.

По оси ординат – индекс активации; по оси абсцисс – гистограмма интенсивности продукции АФК. При измерении учитывали максимальные показатели интенсивности свечения (I), а также площадь (S) под кривой динамики свечения за период наблюдения. Для определения интенсивности продукции АФК определяли индекс активации в соответствии с формулой I опыт./ I спон. и S опыт./ S спон.

Fig. 1. Production of reactive oxygen species (ROS) by Namalva and P3HR-1 cells in response to treatment with CelAgrip.

Along the ordinate axis – the value of the activation index; on the abscissa axis is a histogram of the ROS production intensity; during the measurement, the maximum indicators of the luminescence intensity (I), as well as the area (S) under the luminescence dynamics curve for the observation period were taken into account. In order to determine the intensity of ROS production, the activation index was determined in accordance with the formula I exp./I contr. or S exp./S contr.

ORIGINAL RESEARCH

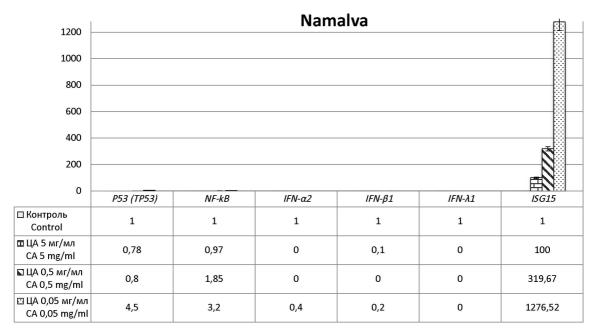
Обсуждение

В настоящем исследовании для количественного изучения генной активности были выбраны такие ключевые цитокины, как IFN- α , - β , - λ , и сигнальные молекулы NF- κ B, P53, ISG15. Их активность при индукции препаратом ЦА значительно изменялась. Мы наблюдали активацию генов *IFN-\alpha2* и *IFN-\lambda1*

а

б

в культуре клеток P3HR-1, в которых определялась продукция антигенов ВЭБ. В то же время при аналогичной обработке в культуре клеток Namalva, в которой не определялась продукция антигенов ВЭБ, не выявлено увеличения активности генов *IFN* при обработке ЦА, но обнаружен прирост генной активности P53 (*TP53*), *NF-кВ* и *ISG15*. Таким образом,



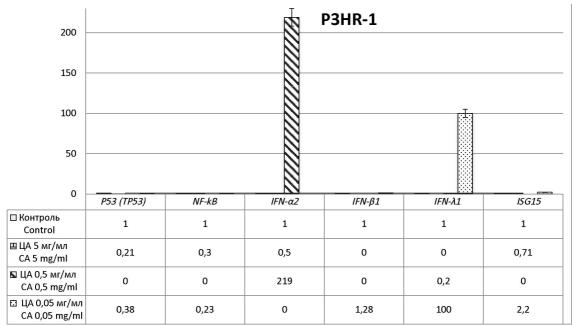


Рис. 2. Действие препарата ЦелАгрип на экспрессию генов в клеточных линиях Namalva (a) и P3HR-1 (б).

По оси ординат показана кратность стимуляции генов, нормализованных по гену GAPDH.

По оси абсцисс – гены интерферонов (*IFN*) и сигнальных молекул. Конечная концентрация препарата указана в дозах 5; 0,5 и 0,05 мг/мл. ЦА – ЦелАгрип.

Fig. 2. The effect of the CelAgrip on gene expression in the Namalva (a) and P3HR-1 (b) cell lines.

Along the ordinate axis – the multiplicity of stimulation of genes normalized by the *GAPDH* gene. The abscissa axis shows the interferon (IFN) genes and the signal molecule genes. The final concentration of the drug is indicated in doses of 5; 0.5, and 0.05 mg/ml. CA – CelAgrip.

анализируя полученные данные, можно говорить о разнонаправленной стимуляции ЦА генов врождённого иммунитета в зависимости от способности клеток продуцировать антигены ВЭБ.

Известно, что Р53 является транскрипционным фактором, его активация может вызвать остановку клеточного цикла и репликации ДНК. В конечном счёте это приводит к запуску апоптоза [23]. Относительно взаимодействия NF-кВ и Р53 известно, что транскрипционный фактор NF-кВ влияет на регуляцию апоптоза, подавляя или способствуя индукции апоптоза под действием Р53 [24]. Помимо этого NF-кВ также участвует в контроле большой группы генов, которые управляют процессами воспаления и пролиферации клеток. Например, сигнальный путь NF-кВ контролирует созревание В-лимфоцитов. Кроме того известно, что гиперактивация сигнального пути NF-кВ происходит в ряде типов злокачественных опухолей и характерна для диффузной В-крупноклеточной лимфомы [25].

При вирусной инфекции патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs) распознаются паттерн-распознающими рецепторами (PRRs) инфицированной клетки, что стимулирует врождённый противовирусный иммунный ответ. Этот ответ приводит к продукции и выделению различных цитокинов, включая IL, фактор некроза опухолей и IFN из заражённых клеток. Ответ IFN I типа является одним из жизненно важных противовирусных защитных механизмов клеток-хозяев. Активация PRRs PAMPs запускает не только JAK-STAT-опосредованный ответ IFN, но и различные ветви врождённой иммунной сигнализации, включая путь NF-кВ, активацию воспаления [26], и запрограммированную гибель клеток (апоптоз, некроптоз и пироптоз) [27]. В клетках противовирусная активность IFN осуществляется через сигнализацию JAK-STAT. IFN I и III типа через свои специфические рецепторы активируют пути ЈАК-STAT и через IFN-стимулированные элементы (ISREs) индуцируют транскрипцию IFN-стимулированных генов (ISGs), таких как MX-A, ISG15, ISG56 и OAS1 [28]. ВЭБ противодействует не только продукции IFN, но и его действию. Некоторые из путей активации генов врождённого иммунитета нарушены и в изучаемых нами лимфобластоидных клетках Namalva и P3HR-1. Поскольку IFN I типа может подавлять репликацию герпесвирусов в инфицированных клетках, нарушение проведения IFN-сигналов с помощью ВЭБ обычно рассматривается как провирусный адаптивный механизм обеспечения успешной инфекции и других преимуществ для вируса [29]. По-видимому, препарат ЦА может противодействовать опосредованному ВЭБ нарушению проведения IFN-сигналов, запуская различные пути активации генов в тех или иных клетках; например, стимулируя активность генов IFN- $\alpha 2$ и IFN- $\lambda 1$ в клетках Namalva или генов NFкВ, P53 (*TP53*), *ISG15* в клетках P3HR-1.

Ранее было показано, что одним из наиболее высокоиндуцированных генов в сигнальном каскаде IFN I типа является ISG15, который кодирует небольшой убиквитин-подобный белок, участвующий в процес-

се посттрансляционной модификации, называемом ISGylation. Благодаря этому процессу, ISG15 ковалентно связывается с широким спектром целевых белков, включая NF-кВ, JNК и IRF-3, которые ассоциированы с центральными иммунными путями проведения сигналов [30]. Известно, что ISG15 существует и в свободной форме и действует как внутри, так и вне клеток. Данные in vitro и in vivo подтверждают его различную роль в клеточных процессах: в онкогенезе, защите от вирусных инфекций, активации иммунных клеток (лимфоцитов, моноцитов и NKклеток) [31]. Возрастание активности гена ISG15 более чем в 1200 раз в клетках Namalva при индукции препаратом ЦА требует более пристального изучения этого феномена. Известно также, что митохондрии являются мишенями ISG15 и ISGylation в макрофагах, полученных из костного мозга мышей. ISG15 и ISGylation участвуют в регулировании митохондриального метаболизма. Отсутствие ISG15 приводит к изменениям в окислительном фосфорилировании и, как следствие, к более низкой скорости потребления кислорода и производства АТФ. Такое нарушение механизмов окислительного фосфорилирования уменьшает продукцию АФК [32].

Предпринятый нами анализ активности АФК в клетках Namalva и P3HR-1 при обработке препаратом ЦА выявил снижение индекса активации АФК в клетках Namalva, которое сопровождалось не снижением, а резким увеличением активности ISG15 и подавлением индукции генов *IFN*. В клетках P3HR-1, наоборот, наблюдали увеличение индекса активации АФК и относительно незначительную активацию гена ISG15 (всего лишь в 2,2 раза). При этом значительно возрастала индукция генов IFN I и III типа. J. Wang и соавт. полагают [33], что вирусоносительство связано с повышенной уязвимостью клеток к окислительному стрессу, и доказывают, что ядерный антиген ВЭБ способствует усилению клеточной антиоксидантной защиты. В нашем случае клетки P3HR-1 в отличие от клеток Namalva характеризуются продукцией антигенов ВЭБ. Нами показано, что их обработка ЦА приводит к возрастанию интенсивности продукции АФК и, следовательно, к повышению клеточной уязвимости от окислительного стресса. В связи с этим мы предполагаем возможную роль ЦА в подавлении антиоксидантного ответа инфицированных ВЭБ клеток и перспективности использования ЦА в антиВЭБ терапии.

Известно, что экспрессия ISG15 может также индуцироваться вирусной инфекцией [34] и двухцепочечной (дц) РНК [35]. Кроме того, Р53 стимулирует экспрессию ISG15 и его ферментов конъюгации [36] и необходим для оптимальной индукции ISG15 с помощью дцРНК [37]. Экспрессию ISG15 индуцирует ряд других соединений, таких как poly I:C, липополисахарид [38], фактор некроза опухолей [39], фактор роста эндотелия сосудов [40], IFN-ү [41, 42], и различные стимулы, включая повреждение ДНК, облучение [43], ишемию [44] и укорочение теломер [45]. Однако экспрессия ISG15 и его конъюгирующих ферментов

дерегулируется при многих типах рака [46–48]. Тем не менее нет единого мнения о том, оказывает этот путь проопухолевый или опухолевый супрессорный эффект [34]. Поэтому способность ЦА индуцировать *ISG15* в некоторых лимфобластоидных клетках требует дополнительного изучения и с точки зрения возможного влияния на ВЭБ-индуцированный онкогенез.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемые клеточные культуры Namalva и P3HR-1 по-разному отвечают на обработку препаратом ЦА — индуктором IFN. Если при обработке ЦА клеток Namalva, не продуцирующих антигены ВЭБ, наблюдаются подавление генерации АФК и активация экспрессии генов ISG15, P53 (TP53) и NF-кB, то после обработки ЦА клеток P3HR-1, продуцирующих антигены ВЭБ, наблюдается обратная картина — активизация образования АФК, экспрессия генов IFN- α и IFN- λ , и подавление активности генов ISG15, P53 (TP53) и NF-кB. Мы предполагаем, что существует взаимосвязь IFN-индуцирующего действия ЦА с активностью ISG15 и АФК в перевиваемых культурах клеток ЛБ, продуцирующих и не продуцирующих антигены ВЭБ.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3, 5, 6, 9-12, 15, 16, 21, 23, 25-48 см. REFERENCES)

- 1. Ершов Ф.И., Киселев О.И. *Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств)*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2005.
- Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н. Интерфероны и индукторы интерферонов. В кн.: Хаитов Р.М., Атауллаханов Р.И., Шульженко А.Е., ред. Иммунотерапия: руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2018: 123-47.
- Зайцев В.Г., Закревский В.И. Методологические аспекты исследований свободно-радикального окисления и антиоксидантной системы организма. Вестник Волгоградской медицинской академии: Сборник научных трудов. 1998; 54(4): 49-53.
- Донцов В.И., Крутько В.Н., Мрикаев Б.М., Уханов С.В. Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении. Труды Института системного анализа Российской академии наук. 2006; 19: 50-69.
- Новиков В.Е., Левченкова О.С., Пожилова Е.В. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2014; 12(4): 13-21.
- Атаханов А.А., Сарымсаков А.А., Рашидова С.Ш. Наносистемы целлюлозы и серебра: синтез, структура и свойства. Ташкент; 2016.
- Наровлянский А.Н., Мезенцева М.В., Суетина И.А., Руссу Л.И., Иванова А.М., Полосков В.В. и др. Цитокин-регулирующая активность противовирусного препарата Целагрип в перевиваемых В-клеточных линиях лимфомы Беркитта. Вопросы вирусологии. 2019; 64(4): 165-72.
 DOI: http://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-165-172
- Шувалов А.Н., Соколова Т.М., Шаповал И.М., Ершов Ф.И. Модуляция транскрипции клеточных генов препаратом иммуномакс: активация генов интерферонов и интерлейкинов. *Иммуно*логия. 2014; 35(1): 16-20.
- Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Полосков В.В., Ершов Ф.И. Стимуляция генов сигнальной трансдукции препаратами «Ридостин», «Циклоферон» и «Ингавирин». *Цитокины и воспаление*. 2015: 14(2): 26-34.
- Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Колодяжная Л.В., Оспельникова Т.П., Ершов Ф.И. Механизмы действия препарата «Кагоцел» в клетках человека. Сообщение 1. Регуляция транскрипции генов системы интерферона и апоптоза. В кн.: Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н., ред. Интерферон 2011. М.; 2012: 389-401.

- Соколова Т.М., Кособокова Е.Н., Шувалов А.Н., Шаповал И.М., Косоруков В.С., Ершов Ф.И. Активность генов системы интерферона в клетках аденокарциномы толстого кишечника htc116: регуляция рекомбинантными интерферонами альфа2 из бактериальных и растительных продуцентов. Российский биотерапевтический журнал. 2013; 12(3): 39-44.
- 22. Измайлов Д.Ю., Владимиров Г.К. Хемилюминесценция как метод изучения свободных радикалов, глава 8. В кн.: Владимиров Ю.А., ред. *Источники и мишени свободных радикалов в крови человека*. М.: МАКС Пресс; 2017: 273-97.
- Чумаков П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. Успехи биологической химии. 2007; 47(1): 3-52

REFERENCES

- Ershov F.I., Kiselev O.I. Interferons and Their Inductors (From Molecules to Drugs) [Interferony i ikh induktory (ot molekul do lekarstv)]. Moscow: GEOTAR-Media; 2005. (in Russian)
- Ershov F.I., Narovlyanskiy A.N. Interferons and inducers of interferons. In: Khaitov R.M., Ataullakhanov R.I., Shul'zhenko A.E., eds. *Immunotherapy: A Guide for Doctors [Immunoterapiya: rukovodstvo dlya vrachey]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2018: 123-47. (in Russian)
- Segal A.W. How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 2005; 23: 197-223. DOI: http://doi.org/10.1146/annurev. immunol.23.021704.115653
- 4. Zaytsev V.G., Zakrevskiy V.I. Metodological aspects of study of the free radical oxidation and the body antioxidant system. *Vestnik Volgogradskoy meditsinskoy akademii: Sbornik nauchnykh trudov.* 1998; 54(4): 49-53. (in Russian)
- Cross A.R., Jones O.T.G. Enzymic mechanism of superoxide production. *Biochem. Biophys. Acta.* 1991; 1057(3): 281-98. DOI: http://doi.org/10.1016/S0005-2728(05)80140-9
- Sandhu S.K., Kaur G. Mitochondrial electron transport chain complexes in aging rat brain and lymphocytes. *Biogerontol.* 2003; 4(1): 19-29. DOI: http://doi.org/10.1023/a:1022473219044
- 7. Dontsov V.I., Krut'ko V.N., Mrikaev B.M., Ukhanov S.V. Active forms of oxygen as a system: significance in physiology, pathology and natural aging. *Trudy Instituta sistemnogo analiza Rossiyskoy akademii nauk.* 2006; 19: 50-69. (in Russian)
- 8. Novikov V.E., Levchenkova O.S., Pozhilova E.V. Role of reactive oxygen species in cell physiology and pathology and their pharmacological regulation. *Obzory po klinicheskoy farmakologii i lekarstvennoy terapii*. 2014; 12(4): 13-21. (in Russian)
- Jha H.C., Pei Y., Robertson E.S. Epstein-Barr virus: Diseases linked to infection and transformation. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 1602. DOI: http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01602
- Ascherio A., Munger K.L. EBV and autoimmunity. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2015; 390(Pt. 1): 365-85. DOI: http://doi. org/10.1007/978-3-319-22822-8_15
- Jangra S., Yuen K.S., Botelgo M.G., Jin D.Y. Epstein-Barr virus and innate immunity: Friends or foes? *Microorganisms*. 2019; 7(6): pii E183. DOI: http://doi.org/10.3390/microorganisms7060183
- Hussain T., Mulherkar R. Lymphoblastoid cell lines: a continuous in vitro source of cells to study carcinogen sensitivity and DNA repair. *Int. J. Mol. Cell Med.* 2012; 1(2): 75-87.
- 13. Atakhanov A.A., Sarymsakov A.A., Rashidova S.Sh. *Nanosystems of Cellulose and Silver: Synthesis, Structure and Properties [Nanosistemy tsellyulozy i serebra: sintez, struktura i svoystva]*. Tashkent; 2016. (in Russian)
- Narovlyanskiy A.N., Mezentseva M.V., Suetina I.A., Russu L.I., Ivanova A.M., Poloskov V.V., et al. Cytokine-regulating activity of anti-virus preparation Celagripus in Burkitt's lymphoma stable B-cell lines. *Voprosy virusologii*. 2019; 64(4): 165-72. DOI: http://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-165-172 (in Rus-
- Hinuma Y., Konn M., Yamaguchi J., Grace J.T. Replication of herpes-type virus in a Burkitt lymphoma cell line. *J. Virol.* 1967; 1(6): 1045-51.
- Klein E., Klein G., Nadkarni J.S., Nadkarni J.J., Wigzell H., Clifford P. Surface IgM kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived cultured lines. *Cancer Res*, 1968: 28(7): 1300-10
- and in derived cultured lines. *Cancer Res.* 1968; 28(7): 1300-10.

 17. Shuvalov A.N., Sokolova T.M., Shapoval I.M., Ershov F.I. Modulation of cellular gene transcription by drug "immunomax":

- activation of interferon and interleukine genes. *Immunologiya*. 2014; 35(1): 16-20. (in Russian)
- Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Poloskov V.V., Ershov F.I. Stimulation of signaling transduction gene expression with drugs Ridostin, Cycloferon and Ingavirin. *Tsitokiny i vospalenie*. 2015; 14(2): 26-34. (in Russian)
- Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Kolodyazhnaya L.V., Ospel'nikova T.P., Ershov F.I. The mechanisms of action of the drug "Kagocel" in human cells. Communication 1. Regulation of transcription of genes of the interferon system and apoptosis. In: Ershov F.I., Narovlyanskiy A.N., eds. *Interferon 2011 [Interferon 2011]*. Moscow; 2012: 389-401. (in Russian)
- Sokolova T.M., Kosobokova E.N., Shuvalov A.N., Shapoval I.M., Kosorukov V.S., Ershov F.I. Interferon system gene activity in colon adenocarcinoma cells HCT-116: Regulation by interferonalpha-2B from bacteria or plants. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal. 2013; 12(3): 39-44. (in Russian)
- zhurnal. 2013; 12(3): 39-44. (in Russian)
 Li L.D., Sun H.F., Liu X.X., Gao S.P., Jiang H.L., Hu X., et al. Down-regulation of NDUFB9 promotes breast cancer cell proliferation, metastasis by mediating mitochondrial metabolism. *PLoS One*. 2015; 10(12): e0144441.
 DOI: http://doi.org/10.1371/journal.pone.0144441
- 22. Izmaylov D.Yu., Vladimirov G.K. Chapter 8. Chemiluminescence as a method of studying free radicals. In: Vladimirov Yu.A., ed. Sources and Targets of Free Radicals in Human Blood [Istochniki i misheni svobodnykh radikalov v krovi cheloveka]. Moscow: MAKS Press; 2017: 273-97. (in Russian)
- Toufektchan E., Toledo F. The Guardian of the genome revisited: P53 downregulates genes required for telomere maintenance, DNA repair, and centromere structure. *Cancers (Basel)*. 2018; 10(5): pii E135. DOI: http://doi.org/10.3390/cancers10050135
- Chumakov P.M. The p53 protein and its universal functions in a multicellular organism. *Uspekhi biologicheskoy khimii*. 2007; 47(1): 3-52. (in Russian)
- Davis R.E., Brown K.D., Siebenlist U., Staudt L.M. Constitutive nuclear factor kappaB activity is required for survival of activated B cell-like diffuse large B cell lymphoma cells. *J. Exp. Med.* 2001; 194(12): 1861-74. DOI: http://doi.org/10.1084/jem.194.12.1861
- Stephenson H.N., Herzig A., Zychlinsky A. Beyond the grave: When is cell death critical for immunity to infection? *Curr. Opin. Immunol.* 2016; 38: 59-66.
 DOI: http://doi.org/10.1016/j.coi.2015.11.004
- DOI: http://doi.org/10.1016/j.coi.2015.11.004

 27. Jorgensen I., Rayamajhi M., Miao E.A. Programmed cell death as a defence against infection. *Nat. Rev. Immunol.* 2017; 17(3): 151-64. DOI: http://doi.org/10.1038/nri.2016.147
- Der S.D., Zhou A., Williams B.R., Silverman R.H. Identification of genes differentially regulated by interferon α, β, or γ using oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95(26): 15623-8.
 - DOI: http://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15623
- Chang J., Renne R., Dittmer D., Ganem D. Inflammatory cytokines and the reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic replication. *Virology*. 2000; 266(1): 17-25. DOI: http://doi.org/10.1006/viro.1999.0077
- Zhang D., Zhang D.E. Interferon-stimulated gene 15 and the protein ISGylation system. J. Interferon Cytokine Res. 2011; 31(1): 119-30. DOI: http://doi.org/10.1089/jir.2010.0110
- Dos Santos P.F., Mansur D.S. Beyond ISGlylation: Functions of free intracellular and extracellular ISG15. J. Interferon Cytokine Res. 2017; 37(6): 246-53.
 DOI: http://doi.org/10.1089/jir.2016.0103
- Albert M., Bécares M., Falqui M., Fernández-Lozano C., Guerra S. ISG15, a small molecule with huge implications: regulation of mitochondrial homeostasis. *Viruses*. 2018; 10(11): pii E629. DOI: http://doi.org/10.3390/v10110629
- Wang J., Nagy N., Masucci M.G. The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 upregulates the cellular antioxidant defense to enable

- B-cell growth transformation and immortalization. *Oncogene*. 2020; 39(3): 603-6.
- DOI: http://doi.org/10.1038/s41388-019-1003-3
- Villarroya-Beltri C., Guerra S., Sánchez-Madri F. ISGylation a key to lock the cell gates for preventing the spread of threats. *J. Cell Sci.* 2017; 130(18): 2961-9.
 DOI: http://doi.org/10.1242/jcs.205468
- Sen G.C., Sarkar S.N. The interferon-stimulated genes: targets of direct signaling by interferons, double-stranded RNA, and viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2007; 316: 233-50.
 DOI: http://doi.org/10.1007/978-3-540-71329-6 12
- Park J.H., Yang S.W., Park J.M., Ka S.H., Kim J.H., Kong Y.Y., et al. Positive feedback regulation of p53 transactivity by DNA damage-induced ISG15 modification. *Nat. Commun.* 2016; 7: 12513. DOI: http://doi.org/10.1038/ncomms12513
- Hummer B.T., Li X.L., Hassel B.A. Role for p53 in gene induction by double-stranded RNA. *J. Virol.* 2001; 75(16): 7774-7. DOI: http://doi.org/10.1128/JVI.75.16.7774-7777.2001
- Liu C., Chang R., Yao X., Qiao W.T., Geng Y.Q. ISG15 expression in response to double-stranded RNA or LPS in cultured fetal bovine lung (FBL) cells. *Vet. Res. Commun.* 2009; 33(7): 723-33. DOI: http://doi.org/10.1007/s11259-009-9221-8
- Chairatvit K., Wongnoppavich A., Choonate S. Up-regulation of interferon-stimulated gene15 and its conjugates by tumor necrosis factor-alpha via type I interferon-dependent and -independent pathways. *Mol. Cell. Biochem.* 2012; 368(1-2): 195-201. DOI: http://doi.org/10.1007/s11010-012-1360-5
- Liu F., Gao X., Wang J., Gao C., Li X., Li X., et al. Transcriptome sequencing to identify transcription factor regulatory network and alternative splicing in endothelial cells under VEGF stimulation. *J. Mol. Neurosci.* 2016; 58(2): 170-7. DOI: http://doi.org/10.1007/s12031-015-0653-z
- Doyle S.E., Vaidya S.A., O'Connell R., Dadgostar H., Dempsey P.W., Wu T.T., et al. IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral
- gene program. *Immunity*. 2002; 17(3): 251-63.
 DOI: http://doi.org/10.1016/S1074-7613(02)00390-4
 42. Taylor J.L., D'Cunha J., Tom P., O'Brien W.J., Borden E.C.
- Production of ISG-15, an interferon-inducible protein, in human corneal cells. *J. Interferon Cytokine Res.* 1996; 16(11): 937-40. DOI: http://doi.org/10.1089/jir.1996.16.937
- Park J.H., Yang S.W., Park J.M., Ka S.H., Kim J.H., Kong Y.Y., et al. Positive feedback regulation of p53 transactivity by DNA damage-induced ISG15 modification. *Nat. Commun.* 2016; 7: 12513. DOI: http://doi.org/10.1038/ncomms12513
- Nakka V.P., Lang B.T., Lenschow D.J., Zhang D.E., Dempsey R.J., Vemuganti R. Increased cerebral protein ISGylation after focal ischemia is neuroprotective. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2011; 31(12): 2375-84.
 DOI: http://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.103
- Lou Z., Wei J., Riethman H., Baur J.A., Voglauer R., Shay J.W., et al. Telomere length regulates ISG15 expression in human cells. *Aging (Albany NY)*. 2009; 1(7): 608-21.
 DOI: http://doi.org/10.18632/aging.100066
- Kiessling A., Hogrefe C., Erb S., Bobach C., Fuessel S., Wessjohann L., et al. Expression, regulation and function of the ISGylation system in prostate cancer. *Oncogene*. 2009; 28(28): 2606-20. DOI: http://doi.org/10.1038/onc.2009.115
- Li C., Wang J., Zhang H., Zhu M., Chen F., Hu Y., et al. Interferon-stimulated gene 15 (ISG15) is a trigger for tumorigenesis and metastasis of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2014; 5(18): 8429-41.
 DOI: http://doi.org/10.18632/oncotarget.2316
- Wood L.M., Pan Z.K., Seavey M.M., Muthukumaran G., Paterson Y. The ubiquitin-like protein, ISG15, is a novel tumor-associated antigen for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother*. 2012; 61(5): 689-700.
 - DOI: http://doi.org/10.1007/s00262-011-1129-9

ORIGINAL RESEARCH

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020



Выявление пестивирусов крупного рогатого скота при помощи мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

Нефедченко А.В., Котенева С.В., Глотова Т.И., Глотов А.Г.

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

Введение. Пестивирусы – причина репродуктивных проблем, болезней желудочно-кишечного и респираторного тракта животных. Для крупного рогатого скота значение имеют три вида: *Pestivirus* A, B и H. В настоящее время необходимы быстрые и надёжные методы дискриминации данных патогенов.

Цели и задачи исследования: разработка мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) для одновременного выявления и дифференциации трёх вирусов в режиме реального времени (РТ-ПЦР).

Материал и методы. Мишенью для амплификации служили нуклеотидные последовательности консервативных участков генов 5´-UTR пестивирусов A, B и H.

Результаты. Реакция показала высокую специфичность, чувствительность, воспроизводимость и выявляла РНК вирусов в концентрации не менее 0,6–1,2 Ід ТЦД_{50/см}3. Перекрёстных реакций с другими пестивирусами не наблюдали. РТ-ПЦР подтвердила результаты, полученные ранее в ОТ-ПЦР в режиме гель-электрофореза. При параллельном исследовании 1823 проб биоматериала результаты двух реакций полностью совпали. *Реstivirus* spp. выявлены в 76 пробах: *Pestivirus* A присутствовал в 73 пробах, В – в трёх, а Н не обнаружен.

Обсуждение. Разработана двухшаговая РТ-ПЦР для одновременного выявления и типирования трёх пестивирусов. Для первой реакции использовали модифицированные панпраймеры S. Vilcek и соавт., а для типирования – праймеры и зонды собственного дизайна, что обеспечило высокую эффективность реакции. Заключение. На молочных комплексах по содержанию скота создаются условия для циркуляции патогенных вирусов. В такой ситуации необходимы методы экспресс-диагностики, позволяющие в короткие сроки выявить несколько вирусов. Триплексный анализ в режиме реального времени может быть рекомендован в качестве экспресс-метода при массовых эпизоотологических исследованиях, а также для скрининга эмбриональной сыворотки, используемой для культивирования вирусов в медицине и ветеринарии.

Ключевые слова: крупный рогатый скот; пестивирусы; виды; мультиплексная полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

Для цитирования: Нефедченко А.В., Котенева С.В., Глотова Т.И., Глотов А.Г. Выявление пестивирусов крупного рогатого скота при помощи мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(2): 95-102.

DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-95-102

Для корреспонденции: Глотов Александр Гаврилович, д-р вет. наук, проф., зав. лабораторией биотехнологии диагностического центра СФНЦА РАН, 630501, Новосибирская обл., Новосибирский район, пос. Краснообск. E-mail: glotov_vet@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: концепция и дизайн исследования — Нефедченко А.В., Глотов А.Г.; сбор и обработка материала — Нефедченко А.В., Глотова Т.И., Котенева С.В.; статистическая обработка данных — Нефедченко А.В.; редактирование — Глотова Т.И.; утверждение окончательного варианта статьи — Глотов А.Г.; ответственность за целостность всех частей статьи — Глотов А.Г.

Поступила 26.02.2020 Принята в печать 31.03.2020

Detection of bovine pestiviruses by a multiplex real-time polymerase chain reaction

Aleksey V. Nefedchenko, Svetlana V. Koteneva, Tatyana I. Glotova, Alexander G. Glotov

Siberian Federal Scientific Centre of Agro-Biotechnologies of the Russian Academy of Science, Institute of Experimentally Veterinary Medicine of Siberia and Far East, Krasnoobsk, 630501, Russia

Introduction. Pestiviruses are the cause of reproductive problems, diseases of the gastrointestinal and respiratory tracts of animals. Three species are important for cattle: *Pestivirus* A, B, and H. Fast and reliable methods of differentiation of these pathogens are currently needed.

Aims and objectives of the study: the development of multiplex real time PCR for the simultaneous detection and differentiation of three viruses.

Material and methods. The nucleotide sequences of the conserved regions of the 5'-UTR genes of pestiviruses A, B, and H served as a target.

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Results. The reaction showed high specificity, sensitivity, reproducibility and was able to detect virus RNA at a concentration of not less than 0.6-1.2 Ig TCID_{50/cm³}. Cross-reactions with other pestiviruses were not observed. Real time PCR confirmed the results obtained previously in RT-PCR with gel electrophoresis detection. In a parallel study of 1823 biological samples, the results of the two reactions were completely consistent. *Pestivirus* spp. was detected in 76 samples, *Pestivirus* A was present in 73 samples, *Pestivirus* B – in 3 samples, and *Pestivirus* H was not detected. **Discussion.** A two-step real time PCR was developed for the simultaneous detection and differentiation of three pestiviruses. Modified pan primers of S. Vilcek et al. were used for the first reaction, and primers and probes of our own design were used for virus typing, which resulted in high reaction efficiency.

Conclusion. On the big dairy farms for livestock maintenance, there are favorable conditions for the circulation of pathogenic viruses. In this situation, rapid diagnostic methods are needed to quickly identify of several viruses. Real-time triplex analysis can be recommended as the rapid method for mass epidemiological studies, as well as for screening fetal calf serum used for virus cultivation in medicine and veterinary practice.

Keywords: cattle; pestiviruses; species; real-time multiplex PCR.

For citation: Nefedchenko A.V., Koteneva S.V., Glotova T.I., Glotov A.G. Detection of bovine pestiviruses by a multiplex real-time polymerase chain reaction. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology)*. 2020; 65(2): 95-102. (In Russian).

DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-95-102

For correspondence: Alexander G. Glotov, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Head of Laboratory Siberian Federal Scientific Centre of Agro-BioTechnologies of the Russian Academy of Science, Krasnoobsk, 630501, Russia. E-mail: glotov_vet@mail.ru

Information about the authors:

Nefedchenko A.V., http://orcid.org/0000-0002-4181-4268 Koteneva S.V., http://orcid.org/0000-0003-2649-7505 Glotova T.I., http://orcid.org/0000-0003-3538-8749 Glotov A.G., http://orcid.org/0000-0002-2006-0196

Acknowledgments. The study had no sponsorship. **Conflict of interests.** The authors declare no conflict of interests.

Contribution: research concept and design – Nefedchenko A.V., Glotov A.G.; material collection and processing – Nefedchenko A.V., Glotova T.I., Koteneva S.V.; statistical data processing – Nefedchenko A.V.; editing – Glotova T.I.; approval of the final version of the article – Glotov A.G.; responsibility for the integrity of all parts of the article – Glotov A.G.

Received 26 February 2020 Accepted 31 March 2020

Введение

Пестивирусы широко распространены в природе и являются причиной значительного спектра инфекционной патологии, включающей репродуктивные проблемы, болезни желудочно-кишечного и респираторного тракта животных [1–5].

Согласно современной классификации род *Pestivirus* принадлежит к семейству *Flaviviridae* и включает 11 представителей. Для крупного рогатого скота (КРС) основное значение имеют три вида: *Pestivirus* A, B и H, ранее называвшиеся BVDV-1, -2 и -3 [6].

Все вирусы вызывают сходную патологию у восприимчивых животных и становятся причиной экономически значимых болезней КРС во всём мире, особенно при интенсивном типе ведения животноводства [7–14]. Кроме того, представители данного рода являются контаминантами биологических препаратов (эмбриональной сыворотки, перевиваемых линий культур клеток, вакцин для медицины и ветеринарии, интерферонов, трипсина, биотехнологических препаратов, эмбрионов, стволовых клеток, спермы быков-производителей и др.) [15, 16].

Все пестивирусы имеют сходное строение, их геном представлен однонитевой положительно заряженной РНК размером 12,3 тыс. нуклеотидов. Она имеет одну открытую рамку считывания длиной около 4000 кодонов, кодирующую 12 структурных и неструктурных

белков (Npro-C-Erns-E1-E2-p7-NS2/NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B), фланкированную с 5′- и 3′-концов нетранслируемыми областями 5′-UTR и 3′-UTR [17].

Из всех регионов генома вирусов для дифференциации (сравнительных изучений) и филогенетического анализа широко используют 5'-UTR, N^{pro} и Е2 [17]. В связи с этим в качестве основного метода дифференциации пестивирусов применяют секвенирование отдельных фрагментов с последующим филогенетическим анализом [18, 19]. Однако этот метод дорогостоящий и занимает много времени.

Вирус подвержен мутациям, вызванным ошибками РНК-зависимой РНК-полимеразы, и рекомбинациям, приводящим к образованию его различающихся, но близкородственных мутантов (субтипов). В связи с этим патогенность возбудителя варьирует и имеет «штаммовую» зависимость. К настоящему времени известны 21 субтип *Pestivirus* A, 5 субтипов *Pestivirus* В и четыре *Pestivirus* H [20].

Учитывая широкое распространение в последние годы во всём мире нового эмерджентного вида: *Pestivirus* H (BVDV-3), возникает необходимость быстрого выявления и дифференциации всех представителей рода в одной реакции, что имеет значение для дифференциальной диагностики и разработки противоэпизоотических мероприятий в практических условиях [2, 12, 18].

Для выявления пестивирусов, как правило, используют молекулярные методы, в частности, различные модификации полимеразной цепной реакции (ПЦР), в большинстве случаев направленные на обнаружение отдельных вирусов [21, 22]. Широкое распространение во всём мире получили панпраймеры, предложенные S. Vilcek и соавт. для выявления *Pestivirus* spp. с последующим филогенетическим анализом ампликонов [21].

Для прямого выявления и дифференциации отдельных представителей рода *Pestivirus* за рубежом используют мультиплексную ПЦР, в том числе в режиме реального времени (РТ-ПЦР) [23–26]. Однако эти методы позволяют обнаружить и дифференцировать только два вида (*Pestivirus* A, B).

N. Decaro и соавт. (2012) разработали способ типирования пестивирусов A, B и H с помощью «вложенной» двухшаговой ПЦР в формате электрофореза [27]. В дальнейшем авторы разработали высокопроизводительный, чувствительный и специфичный метод мультиплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени, основанный на технологии TaqMan [28]. Предел выявления РНК составил 10⁰–10¹ копий. Перекрёстных реакций не наблюдали.

Известно о выявлении трёх пестивирусов в сыворотке крови откормочного скота при помощи панпестипраймеров в ОТ-ПЦР в режиме гель-электрофореза [29]. Сообщений о подобных разработках в России мы не нашли. Ранее нами разработаны ОТ-ПЦР в электрофоретическом формате для выявления каждого из трёх вирусов в пробах биологического материала и эмбриональной сыворотки КРС и проведён их филогенетический анализ [30–32].

Цель данной работы — разработка мультиплексной ПЦР для одновременного выявления трёх вирусов КРС рода *Pestivirus* в режиме реального времени в образцах эмбриональной сыворотки КРС и пробах биологического материала, полученного от больных и инфицированных животных.

Материал и методы

Для расчёта олигонуклеотидных праймеров проводили выравнивание известных нуклеотидных последовательностей BVDV-1, -2 и -3, опубликованных в GenBank, с помощью программы ClustalW [33]. Химический синтез праймеров осуществляли амидофосфитным методом на автоматическом синтезаторе ASM-102U. Концентрацию их в маточном растворе определяли спектрометрическим методом.

На начальном этапе проводили анализ нуклеотидных последовательностей 5'-UTR области геномов всех видов рода *Pestivirus* из базы данных NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) и определяли наиболее консервативные участки, специфичные для всех видов, а также для каждого вида в отдельности, и подбирали специфичные олигонуклеотидные праймеры и зонды. Свойства олигонуклеотидных праймеров анализировали с использованием программы Vector NTI 9.0.0 (InforMax).

Выделение РНК вирусов проводили стандартным способом с использованием коммерческого набора «РИБО-сорб» производства ФБУН ЦНИИЭ Роспо-

требнадзора. Реакцию ОТ для получения кДНК проводили с использованием коммерческого набора «Реверта-L» того же производителя. Для этого в пробирку, содержащую 9,5 мкл реакционной смеси: буфер для ОТ (50 mM Tris-HCl [pH 8,3], 3 мМ MgCl $_2$, 75 mM KC1, 10 мМ DTT), 0,1 мМ dNTP, 0,1 мкг праймера для ОТ) и 0,5 мкл ревертазы из набора «Реверта-L», добавляли 10 мкл РНК-пробы, осторожно перемешивали и помещали в термостат 37 °С на 30 мин. Затем добавляли 20 мкл ДНК-буфера, тщательно перемешивали и использовали для постановки ПЦР.

Постановка полимеразной цепной реакции для выявления и дифференциации пестивирусов крупного рогатого скота. Состав реакционной смеси: ПЦР-буфер (60 mM Tris-HCl [pH 8,5], 1,5 мМ MgCl₂, 25 mM KC1,10 мМ 2-меркаптэтанола, 0,1% Тритон X-100), 0,2 мМ dNTP, по 0,2 мкг каждого праймера, по 0,1 мкг зонда, 1,25 Е Таq-ДНК-полимеразы, 5 мкл кДНК. Температурный режим проведения ПЦР: 95 °C 5 мин − 1 цикл; 95 °C 10 с, 55 °C 15 с, 72 °C 30 с − 45 циклов. Измеряли флуоресценцию при 55 °C на канале FAM. Положительными считали образцы со значением порогового цикла (Ct) ≤ 40.

Реакцию проводили в два раунда. В первом раунде с общими праймерами и зондом (PVsp F, PVsp R, PVsp Z) выявляли все три вируса, во втором раунде проводили три независимые реакции с соответствующими праймерами и зондами для генотипирования каждого из трёх видов пестивирусов.

Определение чувствительности и специфичности ПЦР. Положительные контрольные образцы (ПКО) получали методом молекулярной трансформации компетентных бактериальных клеток *Escherichia coli* плазмидой pDrive, содержащей специфические ДНК-вставки, и использовали их для контроля амплификации отдельно для каждого анализа.

Концентрацию плазмидной ДНК определяли с использованием набора реагентов Quant-iT dsDNA, HS (Invitrogen, США) и флуориметра QUBIT (Invitrogen, США).

Для определения чувствительности реакции готовили 10-кратные разведения (от 10^{-1} до 10^{-7}) контрольных штаммов *Pestivirus* A (Oregon C24V, 6,33 lg ТЦД_{50/см}3), *Pestivirus* B (Blagodatsky, 6,5 lg ТЦД_{50/см}3) и ПКО (*Pestivirus* A, В и H), каждое разведение исследовали в ПЦР. За аналитическую чувствительность принимали последнее разведение контрольных штаммов и ПКО, с которым результат ПЦР-анализа интерпретировался как положительный.

Специфичность тест-системы определяли с использованием референтных штаммов: Oregon C24V (Pestivirus A), Blagodatsky (Pestivirus B), ЛК (Pestivirus C), PCB N 3 (Bovine orthopneumovirus), Openбург (Bovine alphaherpesvirus 1), SD-1 (Bovine rhinovirus 1), BV-10 (Bovine mastadenovirus A), а также проб биоматериала, в которых нами ранее были выявлены и подтверждены секвенированием вирусы Pestivirus A, В и Н [30–32].

Исследование проб биологического материала. Исследованы образцы коммерческой эмбриональной сыворотки КРС разных производителей, используемые для

культивирования культур клеток и производства биопрепаратов в ветеринарии и медицине, а также пробы сыворотки крови, ткани лимфатических узлов, селезёнки, лёгких от животных с подозрением на инфицирование пестивирусами. Пробы сыворотки крови отбирали в объёме не менее 1 мл, из органов и тканей вырезали кусочки размером 1×1×1 см³. Образцы эмбриональной сыворотки и сыворотки крови больных и инфицированных животных использовали для выделения РНК без предварительной подготовки. Пробы органов и тканей перед исследованием гомогенизировали для получения 10% суспензии на физиологическом растворе, центрифугировали при 10·10³ об/мин в течение 5 мин. Для выделения РНК использовали 100 мкл осветлённой надосадочной жидкости.

Всего исследовали 9 образцов эмбриональной сыворотки, 49 проб сыворотки крови и внутренних органов КРС разного возраста, давших положительный результат в предварительных исследованиях методом ОТ-ПЦР в формате гель-электрофореза [30—32].

С целью изучения сравнительной эффективности двух реакций дополнительно исследовали 1823 пробы биоматериала от животных.

Результаты

На первом этапе работ анализировали нуклеотидные последовательности 5'-UTR области геномов всех видов рода *Pestivirus* из базы данных GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), определяли наиболее консервативные участки, специфичные для всех видов, а также для каждого вида отдельно, и подбирали специфичные олигонуклеотидные праймеры и зонды. Результаты приведены в табл. 1. Моделирование реак-

Таблица 1. Последовательности праймеров и зондов, выбранные для выявления и генотипирования пестивирусов

Table 1. Sequences of primers and probes selected for detection and genotyping of Pestiviruses

Мишень Target	Праймер Primer	Последовательность $(5' \rightarrow 3')$ Sequences $(5' \rightarrow 3')$	T отжига, °C Annealing T, °C	Размер амплико- на, п.н. The size amplicon, b.p.
		Выявление Identification		
Pestivirus	PVspp F	5-ccatrcccttagtaggackagc-3	51,8	
spp.	PVspp R	5- tcaactccatgtgccatgtac 3	51,6	286-289
	PVspp Z	5-(FAM)ctcgagatgccaygtggacgagg(BHQ1)-3	62,5	
		Генотипирование Genotyping		
Pestivirus A	PVA F	5-ggtagcaacagtggtgagtt-3	50,4	
	PVA R	5-cgtccacgtggcatctc-3	49,6	105
	PVA Z	5-(FAM)tagtcgtcagtggttcgacgcct(BHQ1)-3	59,7	
Pestivirus B	PVB F	5-ctagcgatgcccttagtag-3	49,4	
	PVB R	5-cgtcgaagcattgacgact-3	50,6	106-108
	PVB Z	5-(FAM)tagcggtagcagtgagttcattggatggcc(B HQ1)-3	63,6	100 100
Pestivirus H	PVsp F	5-ccatrcccttagtaggackagc-3	52,3	
	PVH R	5-tccttgatgcgtcgaacca-3	54,7	110
	PVH Z	5-(FAM)tagtggtagcagtgagctccttggat(B HQ1)-3	60,6	110

ции в программе Vector NTI с последовательностями геномов *Pestivirus* С (вирус классической чумы свиней) и *Pestivirus* D (вирус пограничной болезни овец) показало отсутствие реакции с данными вирусами.

Результаты определения аналитической чувствительности с использованием ПКО трёх вирусов представлены в табл. 2.

Полученные данные показали, что минимальное количество выявляемого ПКО составило $7,2\cdot 10$ ГЭ на реакцию. Аналитическая чувствительность ОТ-ПЦР в режиме реального времени была различной и составила $1,6\cdot 10^2$ для Pestivirus spp., $7,2\cdot 10$ для Pestivirus А, $9,0\cdot 10$ для Pestivirus В и $1,5\cdot 10^3$ для Pestivirus Н. Расчётная эффективность амплификации для различных ПКО была $\approx 89\%$ при достоверности аппроксимации (R^2) от 0,9865 до 0,9931. Стандартные отклонения значений пороговых циклов варьировали от 0,12 до 0,60. Средние коэффициенты вариаций значений пороговых циклов при повторных исследованиях не превышали 1,91%, что свидетельствует о высокой повторяемости результатов определения аналитической чувствительности РТ-ПЦР.

Диагностическая чувствительность была определена исследованием 10-кратных разведений референтных штаммов *Pestivirus* А и В с известным титром. Все исследования проводили в трёх повторах. Из-за отсутствия штаммов *Pestivirus* Н не удалось провести подобные исследования с ним. Данные по определению чувствительности приведены в табл. 3.

Результаты показали, что минимальный титр штамма Oregon C24V (*Pestivirus* A), выявляемый в реакции, равен 1,2 lg $\text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$, а штамма Blagodatsky – 0,6 lg $\text{ТЦД}_{\text{со/см}^3}$.

В опыте по определению специфичности реакции со штаммами ЛК (Pestivirus C), PCB № 3 (Bovine orthopneumovirus), Оренбург (Bovine alphaherpesvirus I), SD-1 (Bovine rhinovirus I), BV-10 (Bovine mastadenovirus A) получены отрицательные результаты во всех реакциях. Специфичность реакции в отношении вируса пограничной болезни овец не проверяли в связи с отсутствием референтного штамма.

На первом этапе исследовали 49 проб биоматериала, в которых ранее с помощью ПЦР в формате гель-электрофореза и секвенирования были выявлены 9 субтипов *Pestivirus* А и В, а также 9 образцов эмбриональных сывороток, в 7 из них присутствовал *Pestivirus* Н итальянской группы, а в двух — *Pestivirus* В. Все пробы дали положительный результат при исследовании в мультиплексной РТ-ПЦР (табл. 4).

Таблица 2. Аналитическая чувствительность при исследовании положительных контрольных образцов **Table 2.** Analytical sensitivity in the testing of positive control samples

Положительный контрольный образец Positive control sample	Аналитическая чувствительность (геномный эквивалент в реакции) Analytical sensitivity (genomic equivalent per reaction)	Значение Сt в последнем разведении, детектируемом положительно (среднее Ct ± SD) Ct value in the lastdilution tested positive (mean Ct ± SD)	Средний коэффициент вариации для всех разведений Average coefficient of variation for all dilutions	Достоверность апроксимации (R²) Approximation reliability (R²)
Pestivirus spp.	$1,6 \cdot 10^2$	$37,83 \pm 0,12$	1,48	0,9931
Pestivirus A	7,2·10	$38,29 \pm 0,55$	1,91	0,9873
Pestivirus B	9,0·10	$35,38 \pm 0,32$	1,63	0,9865
Pestivirus H	$1,5 \cdot 10^3$	$35,55 \pm 0,46$	1,31	0,9876

Таблица 3. Диагностическая чувствительность полимеразной цепной реакции в режиме реального времени со штаммами вирусов *Pestivirus* A и B **Table 3.** Diagnostic sensitivity of real time PCR for detection of *Pestivirus A* and *B* strains

IIIтамм Oregon C24V, lg ТЦД _{50/см} ³ Strain Oregon C24V, lg TCD _{50/cm} ³	$egin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		IIITamm Blagodatsky, lg TLUI _{50/cm³} Strain Blagodatsky, lg TCD _{50/cm³}	центрациях виру The value of the thr	цикла при различных кон- са (среднее $Ct \pm SD$) eshold cycle at different the virus (mean $Ct \pm SD$)
				Pestivirus spp.	Pestivirus B
6,2	$20,92 \pm 0,30$	$19,47 \pm 0,46$	5,6	$22,20 \pm 0,20$	$18,12 \pm 0,46$
5,2	$23,82 \pm 0,20$	$22,26 \pm 0,58$	4,6	$26,07 \pm 0,13$	$22,36 \pm 0,86$
4,2	$27,70 \pm 0,12$	$26,45 \pm 0,46$	3,6	$29,12 \pm 0,62$	$24,39 \pm 0,44$
3,2	$30,99 \pm 0,86$	$29,44 \pm 0,37$	2,6	$32,11 \pm 0,85$	$28,94 \pm 0,69$
2,2	$33,84 \pm 0,66$	$32,71 \pm 0,32$	1,6	$35,53 \pm 0,32$	$33,79 \pm 0,55$
1,2	$37,84 \pm 0,66$	$35,76 \pm 0,31$	0,6	$39,53 \pm 0,32$	$38,76 \pm 0,87$
0,2	Отрицательно Negative	Отрицательно Negative	0,06	Отрицательно Negative	Отрицательно Negative

Таблица 4. Оценка специфичности полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с пробами биоматериала от животных **Table 4.** The assessment of specificity of real time PCR based on testing of biological samples from animals

Проба Sample	Количество проб Number of	Результаты реакции Reaction results					
	samples	Pestivirus spp.	Pestivirus A	Pestivirus B	Pestivirus H	нетипируемые Untypable	
Эмбриональная сыворотка, положительная на <i>Pestivirus</i> H <i>Pestivirus</i> H Positive Embrional Serum	7	7	0	0	7	0	
Эмбриональная сыворотка, положительная на <i>Pestivirus</i> В <i>Pestivirus B</i> Positive Embrional Serum	2	2	0	2	0	0	
Сыворотка крови КРС* Serum of cattle	15	15	15	0	0	0	
Пробы органов КРС Samples from cattle	34	34	30	4	0	0	
Bcero Total	58	58	45	6	7	0	

Примечание. * КРС – крупный рогатый скот.

Результаты сравнительного исследования 1823 проб биоматериала от животных двумя методами — разработанной нами РТ-ПЦР и ПЦР в варианте электрофореза представлены в табл. 5.

По данным табл. 5, последовательности *Pestivirus* spp. выявлены в 76 пробах биоматериала, при этом результаты двух ПЦР полностью совпали. *Pestivirus* A присутствовал в 73 пробах, *Pestivirus* В – только в трёх, а *Pestivirus* Н и нетипируемые образцы не выявлены.

Для подтверждения специфичности полученных результатов определяли нуклеотидную последовательность ампликонов с использованием набора

Від ру 3.1 (Applied Biosystems, США) с последующей очисткой на сефадексе G-50 Superfine. Секвенирование ПЦР-фрагментов проводили по обеим цепям ДНК. Расшифровку первичных данных секвенирования (хроматограмм) проводили с помощью программы Sequencher 4.0.5 (Gene Codes Corporation, США). Анализировали нуклеотидные последовательности синтезируемых фрагментов методами выравнивания с опубликованными последовательностями штаммов пестивирусов с помощью программы ClustalW, согласно J. Thompson и соавт. [33].

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате исследований в пробах органов больных животных и сыворотках крови КРС выявили и генотипировали только *Pestivirus* A и B.

Таким образом, разработанная РТ-ПЦР высокочувствительна, специфична и эффективна при выявлении и дифференциации трёх пестивирусов в образцах эмбриональной сыворотки, в сыворотке крови и пробах органов КРС.

Обсуждение

Для быстрого выявления *Pestivirus* A, В и Н в клинических образцах было разработано несколько высокочувствительных методик на основе ПЦР, но только некоторые из них могли одновременно дифференцировать *Pestivirus* A и В [23–28]. Открытие нового *Pestivirus* H, вызывающего сходные клинические признаки у животных с *Pestivirus* A и В, вызвало ряд опасений относительно способности существующих методик эффективно обнаруживать его. ОТ-ПЦР с панпестипраймерами 324/326, разработанная S. Vilcek и соавт. [21], обычно используемая для молекулярного скрининга вирусов этого рода, в некоторых случаях была низкоэффективной в отношении *Pestivirus* H из-за несоответствия на 3'-конце праймера 324, что препятствовало его правильному отжигу [28].

М. Вахі и соавт. (2006) разработали одноступенчатую ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием технологии SmartCycler и ТаqМап-зондов. Общие и видоспецифические праймеры были выбраны из последовательностей генома 5'-UTR. Анализ в реальном времени выявлял 10–100 ТЦД, вируса со значениями коэффициента корреляции (r^2) 0,998 и 0,999 для *Pestivirus* A и В соответственно. Анализ ранее типированных 54 штаммов BVDV и полевых изолятов показал высокую эффективность метода, а специфичность

зондов TaqMan дополнительно продемонстрирована отсутствием перекрёстных реакций с вирусом классической чумы свиней и вирусом пограничной болезни овец. Были показаны высокая воспроизводимость методики, а также совпадение с результатами выделения вирусов [25]. Авторы предположили, что одностадийный анализ ОТ-ПЦР в реальном времени — быстрый, чувствительный и специфический тест для выявления и типирования пестивирусов.

В 2008 г. была разработана методика выявления пестивирусов на основе анализа ТаqMan, специфичного *Pestivirus* H, но не позволяющего провести одновременную дифференциацию *Pestivirus* A и B, показавшую частичную перекрёстную реакцию со штаммами *Pestivirus* B с высоким титром. Кроме того, 3 из 15 положительных на *Pestivirus* B образцов проявили перёкрестные реакции с *Pestivirus* H [19].

N. Decaro и соавт. (2012) разработали ПЦР-анализ для одновременного выявления трёх пестивирусов. Этот метод был специфичным и надёжным, но трудоемким, поскольку требовал двух отдельных этапов: ОТ-ПЦР с последующей вложенной амплификацией. Кроме того, он представлял определённый риск перекрёстного загрязнения положительных и отрицательных образцов [27].

Чтобы преодолеть ограничения существующих методов V. Магі и соавт. (2016) разработали РТ-ПЦР на основе технологии ТаqМап в режиме реального времени для дифференциации трёх пестивирусов в одной реакции. Реакция была чувствительной и показала воспроизводимые результаты, а предел выявления РНК вирусов составил 10⁰–10¹ копий РНК. Перекрёстных реакций между вирусами не наблюдали. При исследовании полевых образцов от животных с инфекцией *Pestivirus* A, B и H реакция показала приблизительно

Таблица 5. Диагностическая эффективность двух вариантов полимеразной цепной реакции при исследовании проб биологического материала от животных

Table 5. Diagnostic efficiency of two variants of PCR in the testing of biological samples from animals

Проба Sample	Количе- ство проб	Результаты реакции Reaction results					
	Number	электрофорез-			РТ-ПЦР		
	samples	ный вариант electrophoresis option	Pestivi- rus spp.	Pestivirus A	Pestivirus B	Pestivirus H	нетипируемые untypable
Сыворотка крови новорождённых телят Blood serum of newborn calves	870	4	4	4	0	0	0
Пробы органов телят с респираторной патологией Samples of calf organs with respiratory pathology	389	47	47	47	0	0	0
Абортированные плоды и мертворождённые телята Aborted fetuses and stillborn calves	23	7	7	6	1	0	0
Коровы с гинекологической патологией Cows with gynecological pathology	74	18	18	16	2	0	0
Сперма быков-производителей Semen from bulls	467	0	0	0	0	0	0
Bcero Total	1823	76	76	73	3	0	0

одинаковую чувствительность и достоверно различала все вирусы. При анализе 159 положительных проб биоматериала от КРС и тестированного ранее в ПЦР *Pestivirus* А и В были обнаружены в 103 и 15 пробах соответственно. 41 проба материала, полученного от животных из двух разных стад на юге Италии, была положительной на BVDV-3. Чувствительность выявления РНК составила: $4,02\cdot10^1-7,26\cdot10^7$ (*Pestivirus* A), $5,78\cdot10^1-8,45\cdot10^6$ (*Pestivirus* B) и $3,72\cdot10^1-2,75\cdot10^7$ (*Pestivirus* H) [28]. По сравнению с ПЦР анализ ОТ-ПЦР в реальном времени был одинаково или чуть более чувствительным и занимал меньше времени.

Мы разработали двухшаговую ОТ-ПЦР для одновременного выявления и типирования трёх пестивирусов в режиме реального времени. Мы модифицировали панпестипраймеры 324/326 S. Vilcek и соавт. [21] для более эффективного выявления всех вирусов, а для типирования видов применили праймеры и зонды собственного дизайна, что обеспечило высокую чувствительность и специфичность реакции. Нами не отмечено перекрёстных реакций между пестивирусами и положительного сигнала с вирусами других нозологических групп. Минимальное количество ПКО составило 7,2·10 ГЭ на реакцию. Аналитическая чувствительность ОТ-ПЦР в режиме реального времени была различной и составила 1,6·10² для Pestivirus spp., 7,2·10 для Pestivirus A, 9,0·10 для Pestivirus В и $1,5\cdot10^3$ для *Pestivirus* H. Расчётная эффективность амплификации для разных ПКО была $\bar{\approx}89\%$ при достоверности аппроксимации (R^2) от 0,9865 до 0,9931. Стандартные отклонения значений пороговых циклов варьировали от 0,12 до 0,60. Средние коэффициенты вариаций значений пороговых циклов при повторных исследованиях не превышали 1,91%, что свидетельствует о высокой повторяемости результатов определения аналитической чувствительности РТ-ПЦР. Наши результаты не уступают зарубежным аналогам.

Ранее нами была установлена циркуляция на территории Сибири семи субтипов BVDV-1 (1a, 1b, 1c, 1d, 1f, 1i, 1p) и двух субтипов BVDV-2 (2b и 2c). Преобладающим субтипом у животных был BVDV1-b, а в перевиваемых линиях культур клеток чаще выявляли BVDV-1a. Присутствие BVDV-3 итальянской группы установили в семи лотах эмбриональной сыворотки, полученной от двух производителей [30–32]. В настоящей работе все пробы биоматериала, давшие положительный результат в гель-электрофорезной реакции, были подтверждены мультиплексной РТ-ПЦР.

Сравнительные испытания двух вариантов реакций показали полное совпадение их результатов. Последовательности *Pestivirus spp.* выявили в 76 пробах биоматериала. Из них *Pestivirus* А присутствовал в 73 пробах, *Pestivirus* В – в 3 пробах, а *Pestivirus* Н и нетипируемые образцы не были выявлены.

Теоретически, ограничением данного исследования является то, что анализируемые штаммы пестивирусов были географически однородными, поскольку выделены только в регионе Сибири. Поэтому теоретически менее распространённые подтипы или дивергентные вирусы, циркулирующие в других регио-

нах страны, могут показать другие результаты. В таких случаях возможно дополнительное проведение филогенетического анализа. Однако результаты выявления BVDV-3 в пробах эмбриональной сыворотки обнадёживают и служат доказательством специфичности разработанного нами метода. Потенциальным ограничением метода может быть вирус пограничной болезни овец, выявленный у КРС [34], однако пробы биоматериала были получены от животных, содержащихся на мегафермах, где их контакт с овцами полностью исключен, и эпизоотическая ситуация не требовала включения данного вируса в протокол реакции. Моделирование реакции в программе Vector NTI с последовательностями геномов вирусов классической чумы свиней и пограничной болезни овец, опубликованных в GenBank, дало отрицательные результаты.

Заключение

На фоне экономических реформ, сопровождающихся интенсификацией молочного и мясного животноводства и ростом количества мегаферм, особую актуальность приобретают вирусные инфекции, характеризующиеся многообразием клинических форм и синдромов. Большое значение они имеют для хозяйств, куда постоянно или периодически вводят новых животных из разных источников и происходит их перемещение внутри хозяйств, что создаёт условия для циркуляции патогенных вирусов среди восприимчивых категорий. В такой ситуации необходимы методы экспресс-диагностики, позволяющие в короткие сроки выявить несколько вирусов, в частности мультиплексные ПЦР в режиме реального времени. Актуально также определение контаминации широкого спектра биологических препаратов пестивирусами.

Мечение видоспецифических зондов флуорофорами позволяет достоверно определить характеристики пестивирусных штаммов, содержащихся в клинических образцах. Кроме того, 96-луночный формат планшетов для ПЦР в реальном времени обеспечивает высокую пропускную способность с возможностью одновременного тестирования нескольких образцов. Разработанный анализ представляет собой закрытую систему, в которой пробирка никогда не открывается после амплификации, и это снижает вероятность перекрёстного загрязнения новых образцов предварительно амплифицированными продуктами.

Мультиплексный анализ TaqMan в режиме реального времени может быть рекомендован для экспресс-диагностики болезней КРС, вызванных пестивирусами, для массовых эпизоотологических исследований с целью выявления персистентно инфицированных животных при реализации программ контроля, а также для скрининга пулов эмбриональной сыворотки, используемой для культивирования вирусов в медицине и ветеринарии.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 4-7; 13, 14; 16-29; 33, 34 см. R E F E R E N C E S)

 Глотов А.Г., Глотова Т.И., Шуляк А.Ф. Пестивирусы жвачных животных. Вопросы вирусологии. 2016; 61(2): 59-2. DOI: http://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-2-59-62

- Гулюкин М.И., Юров К.П., Глотов А.Г., Донченко Н.А. Стратегия борьбы с вирусной диареей – болезнью слизистых крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах российской федерации.
- Вопросы вируслогии. 2013; 58(6): 13-8. Верховская А.Е., Сергеев В.А., Алипер Т.И., Иванов Е.В. Особенности диагностики и профилактики вирусной диареи крупного рогатого скота. Ветеринария. 2009; (8): 3-7.
- Глотов А.Г., Глотова Т.И., Петрова О.Г., Нефедченко А.В., Татарчук Плотов А.Г., плотова т.И., петрова О.Г., пефедченко А.Б., гатартук А.Т., Котенева С.В. и др. Распространение вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота. *Ветеринария*. 2002; (3): 17-1. Шилова Е.Н., Ряпосова М.В., Шкуратова И.А., Вялых Е.В. Вирусная диарея – болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота
- в Уральском регионе. *Ветеринария*. 2014; (5): 19-21.
- Черных О.Ю., Шевченко А.А., Джаилиди Г.А., Мищенко В.А., Мищенко А.В., Шевкопляс В.Н. Проблемы вирусной диареи крупного
- рогатого скота. *Труды Кубанского государственного аграрного университета*. 2016; (58): 194-8. Глотов А.Г., Глотова Т.И. Атипичные пестивирусы крупного рогатого скота. *Сельскохозяйственная биология*. 2015; 50(4): 399-408.
- DOI: http://doi.org/ 10.15389/agrobiology.2015.4.399гus
 Урываев Л.В., Ионова К.С., Дедова А.В., Дедова Л.В., Селиванова
 Т.К., Парасюк Н.А. и др. Анализ контаминации клеточных культур
 пестивирусом BVDV и микоплазмами. Вопросы вирусологии. 2012;
- Глотов А.Г., Котенева С.В., Глотова Т.И., Южаков А.Г., Максютов Р.А., Забережный А.Д. Филогенетический анализ пестивирусов крупного рогатого скота, выявленных в Сибири. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(4): 185-91. DOI: http://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-185-191
- Котенева С.В., Максютов Р.А., Глотова Т.И., Глотов А.Г. Идентификация атипичного пестивируса крупного рогатого скота в биологических образцах. *Сельскохозяйственная биология*. 2017; 52(6): 1259-64. DOI: http://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.6.1259rus Котенева С.В., Нефедченко А.В., Глотова Т.И., Глотов А.Г. Генети-
- ческий полиморфизм возбудителя вирусной диареи (болезни слизистых оболочек) крупного рогатого скота на молочных комплексах Сибири. Сельскохозяйственная биология. 2018; 53(6): 1238-46. DOI: http://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.6.1238rus

REFERENCES

- Evans C.A., Pinior B., Larska M., Graham D., Schweizer M., Guidarini C., et al. Global knowledge gaps in the prevention and control of bovine viral diarrhoea (BVD) virus. *Transbound. Emerg. Dis.* 2019; 66(2): 640-52. 1. DOI: https://doi.org/10.1111/tbed.13068
- Glotov A.G., Glotova T.I., Shulyak A.F. Pestiviruses in ruminants. *Vo-prosy virusologii*. 2016; 61(2): 59-2. DOI: http://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-2-59-62 (in Russian)
 Gulyukin M.I., Yurov K.P., Glotov A.G., Donchenko N.A. Bovine viral diarrhea control in Russian Federation. *Voprosy virusologii*. 2013;
- 3. 58(6): 13-8. (in Russian)
- A. F. Bovine viral diarrhea virus: global status. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26(1): 105-21.

 DOI: http://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.10.007

 Bauermann F.V., Ridpath J.F., Weiblen R., Flores E.F. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2013; 25(1): 6-15.
- DOI: http://doi.org/10.1177/1040638712473103
- Simmonds P., Becher P., Bukh J., Gould E.A., Meyers G., Monath T., et al. ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* 2017; 98(1): 2-3. DOI: http://doi.org/10.1099/jgv.0.000672
 Pinior B., Firth C.L., Richter V., Lebl K., Trauffler M., Dzieciol M., et al. A systematic review of financial and economic assessments of bo-
- ai. A systemate teview of limited and conforme assessments of bo-vine viral diarrhea virus (BVDV) prevention and mitigation activities worldwide. *Prev. Vet. Med.* 2017; 137(Pt. A): 77-92. DOI: http://doi. org/10.1016/j.prevetmed.2016.12.014 Verkhovskaya A.E., Sergeev V.A., Aliper T.I., Ivanov E.V. Features of diagnosis and prevention of cattle viral diarrhea. *Veterinariya*. 2009; (8):
- 8.
- Glotov A.G., Glotova T.I., Petrova O.G., Nefedchenko A.V., Tatarchuk A.T., Koteneva S.V., et al. The spread of viral respiratory diseases of cattle. *Veterinariya*. 2002; (3): 17-1. (in Russian)
 Shilova E.N., Ryaposova M.V., Shkuratova I.A., Vyalykh E.V. Bovine viral diarrhoea in the Ural region. *Veterinariya*. 2014; (5): 19-21. (in Russian)
- Chernykh O.Yu., Shevchenko A.A., Dzhailidi G.A., Mishchenko V.A., Mishchenko A.V., Shevchenko V.N. Problems of viral diarrhea in cattle. *Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2016; (58): 194-8. (in Russian)
- Glotov A.G., Glotova T.I. Atypical cattle pestiviruses. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2015; 50(4): 399-408.

 DOI: http://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.4.399rus (in Russian)
- Evermann J.F., Ridpath J.F. Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhea virus in the northwestern United States. *Vet. Microbiol.* 2002; 89(2-3): 129-39. DOI: http://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00178-5

- Bauermann F.V., Ridpath J.F., Weiblen R., Flores E.F. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. J. Vet. Diagn. Invest. 2013; 25(1): 6-15 DOI: http://doi.org/10.1177/1040638712473103
- Uryvaev L.V., Ionova K.S., Dedova A.V., Dedova L.V., Selivanova T.K., Parasyuk N.A., et al. Analysis of the cell tissue culture contamination with the bovine viral diarrhea virus and mycoplasmas. Voprosy viruso-
- Giangaspero M. Pestivirus species potential adventitious contaminants of biological products. *Trop. Med. Surg.* 2013; 1(6). DOI: http://doi.org/10.4172/2329-9088.1000153

 Simmonds P., Becher P., Collett M.S., Gould E.A., Heinz F.X., Mey-
- ers G. Family Flaviviridae. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Science; 2011: 1003-20.
- 2011: 1003-20.

 Bauermann F.V., Flores E.F., Ridpath J.F. Antigenic relationships between Bovine viral diarrhea virus 1 and 2 and HoBi virus: possible impacts on diagnosis and control. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2012; 24(2): 253-61.

 DOI: http://doi.org/10.1177/1040638711435144

 Liu L., Xia H., Wahlberg N., Belák S., Baule C. Phylogeny, classification and evolutionary insights into pestiviruses. *Virology.* 2009; 385(2): 351-7.

 DOI: http://doi.org/10.1016/j.virol.2008.12.004

 Yesilbag K., Alpay G., Becher P. Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhea virus. *Viruses.* 2017; 9(6): E128.

 DOI: http://doi.org/10.3390/v9060128

- DOI: http://doi.org/10.3390/v9060128 Vilcek S., Herring A.J., Herring J.A., Nettleton P.F., Lowings J.P., Paton D.J. Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis. *Arch. Virol.* 1994; 136(3-4): 309-23. DOI: http://doi.org/10.1007/bf01321060
- Nagai M., Hayashi M., Sugita S., Sakoda Y., Mori M., Murakami T., et al. Phylogenetic analysis of bovine viral diarrhea viruses using five different genetic regions. *Virus. Res.* 2004; 99(2): 103-13.
- DOI: http://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.10.006
 Gilbert S.A., Burton K.M., Prins S.E., Deregt D. Typing of bovine viral diarrhea viruses directly from blood of persistently infected cattle by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37(6): 2020-3.
 Letellier C., Kerkhofs P. Real-time PCR for simultaneous detection
- and genotyping of bovine viral diarrhea virus. J. Virol. Methods. 2003;
- DOI: http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2003.08.004 Baxi M., McRae D., Baxi S., Greiser-Wilke I., Vilcek S., Amoako K., et al. A one-step multiplex real-time RT-PCR for detection and typing of bovine viral diarrhea viruses. *Vet. Microbiol.* 2006; 116(1-3): 37-44.
- DOI: http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.03.026
 La Rocca S.A., Sandvik T. A short target real-time RT-PCR assay for detection of pestiviruses infecting cattle. *J. Virol. Methods.* 2009; 161(1): 122-7
- DOI: http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.06.005 Decaro N., Sciarretta R., Lucente M.S., Mari V., Amorisco F., Colaianni M.L., et al. A nested PCR approach for unambiguous typing of Pestiviruses
- infecting cattle. *Mol. Cell. Probes.* 2012; 26(1): 42-6.

 DOI: http://doi.org/10.1016/j.mcp.2011.11.003

 Mari V., Losurdo M., Lucente M.S., Lorusso E., Elia G., Martella V., et al. Multiplex real-time RT-PCR assay for bovine viral diarrhea virus type 1, type 2 and HoBi-like pestivirus. *J. Virol. Methods.* 2016; 229: 1-7.
- DOI: http://doi.org/10.1016/j.jvirromet.2015.12.003 Monteiro F.L., Cargnelutti J.F., Martins B., Noll J.G., Weiblen R., Flores E.F. Detection of bovine pestiviruses in sera of beef calves by a RT-PCR based on a newly designed set of pan-bovine pestivirus primers. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2019; 31(2): 255-8. DOI: http://doi.org/10.1177/1040638719826299
- Glotov A.G., Koteneva S.V., Glotova T.I., Yuzhakov A.G., Maksyutov R.A., Zaberezhnyy A.D. Phylogenetic analysis of bovine pestiviruses detected in Siberia. *Voprosy virusologii*. 2018; 63(4): 185-91. DOI: http://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-185-191 (in Russian) Koteneva S.V., Maksyutov R.A., Glotova T.I., Glotov A.G. Identifica-
- Koteneva S. V., Maksyutov R.A., Glotova I.I., Glotov A.G. Identification of the bovine atypical pestivirus in biological samples. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2017; 52(6): 1259-64. DOI: http://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.6.1259rus (in Russian) Koteneva S. V., Nefedchenko A. V., Glotova T.I., Glotov A.G. Genetic polymorphism of the bovine viral diarrhea viruses in big dairy farms in Siberia. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2018; 53(6): 1238-46.
- DOI: http://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.6.1238rus (in Russian) Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22(22): 4673-80. DOI: http://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673
- Strong R., La Rocca S.A., Ibata G., Sandvik T. Antigenic and genetic characterisation of border disease viruses isolated from UK cattle. *Vet. Microbiol.* 2010; 141(3-4): 208-15. DOI: http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.010

ORIGINAL RESEARCH

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ. 2020



In silico идентификация В- и Т-клеточных эпитопов белка CD2v вируса африканской чумы свиней (African swine fever virus, Asfivirus, Asfarviridae)

Мима К.А., Каторкина Е.И., Каторкин С.А., Цыбанов С.Ж., Малоголовкин А.С.

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», 601125, Владимирская область, Петушинский р-н, пос. Вольгинский, Россия

Ведение. Вирус африканской чумы свиней (АЧС) – крупный ДНК-вирус, единственный представитель семейства *Asfarviridae*. Распространение вируса АЧС на территории РФ, стран Восточной Европы и Китая свидетельствует о неэффективности существующих способов борьбы с заболеванием и стимулирует исследования, направленные на создание вакцин. Одним из значимых антигенов, необходимых для формирования иммунной защиты против АЧС, является серотипспецифический вирусный белок CD2v.

Цель работы – идентификация В- и Т-клеточных эпитопов в белке CD2v вируса AЧC с использованием методов *in silico* прогнозирования.

Материал и методы. Первичную последовательность белка CD2v вируса AЧC штамма Georgia 2007/1 анализировали с помощью программ BCPred, DiscoTop, NetCTLpan, VaxiJen, PVS и Epitope Conservancy Analysis.

Результаты. На основании проведённого комплексного многопараметрического анализа определены четыре В-клеточных иммуногенных эпитопа в секреторной области белка. Анализ секреторной области белка CD2v вируса AЧC в программе NetCTLpan позволил выявить пять Т-клеточных эпитопов с 32-й по 197-ю позицию аминокислот, имеющих перекрёстное связывание с 1-й по 13-ю аллель главного комплекса гистосовместимости I класса свиньи.

Обсуждение. В данном исследовании представлены результаты использования методов прогнозирования *in silico* для выявления В- и Т-клеточных эпитопов белка CD2v вируса AЧС. Результаты анализа свидетельствуют о кластерном распределении эпитопов в белке CD2v. Наибольший интерес для дальнейшего использования в качестве компонента рекомбинантной полиэпитопной вакцины против АЧС представляет растворимая область белка CD2v с 17-й по 204-ю аминокислоту, содержащая В- и Т-клеточные эпитопы. Заключение. Идентифицированы В- и Т-клеточные эпитопы в секреторной области белка CD2v (с 17-й по 204-ю позицию аминокислот) вируса АЧС с помощью *in silico* программ. Анализ консервативности В- и Т-клеточных эпитопов позволил сформировать карту распределения иммунных эпитопов в последовательности белка CD2v.

Ключевые слова: африканская чума свиней; белок CD2v; in silico; прогнозирование линейных В-эпитопов; прогнозирование линейных Т-эпитопов; главный комплекс гистосовместимости I класса; анализ иммуногенности пептида; анализ вариабельности белка; анализ консервативности иммуноэпитопов.

Для цитирования: Мима К.А., Каторкина Е.И., Каторкин С.А., Цыбанов С.Ж., Малоголовкин А.С. *In silico* идентификация В- и Т-клеточных эпитопов белка CD2v вируса африканской чумы свиней *(African swine fever virus, Asfivirus, Asfarviridae). Вопросы вирусологии.* 2020; 65(2): 103-112. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-103-112

Для корреспонденции: Мима Ксения Александровна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории геномики вирусов ФГБНУ ФИЦВиМ, 601125, Владимирская обл., Петушинский р-н, пос. Вольгинский. E-mail: mima89@va.ru

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-316-00092.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов. Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Поступила 09.01.2020 Принята в печать 29.01.2020

In silico prediction of B- and T-cell epitopes in the CD2v protein of african swine

Kseniya A. Mima, Elena I. Katorkina, Sergey A. Katorkin, Sodnom Zh. Tsybanov, Aleksandr S. Malogolovkin

fever virus (African swine fever virus, Asfivirus, Asfarviridae)

Federal Research Center for Virology and Microbiology, Vladimir region, Volginskiy, 601125, Russia

Introduction. African swine fever virus (ASF) is a large DNA virus that is the only member of the Asfarviridae family. The spread of the ASF virus in the territory of the Russian Federation, Eastern Europe and China indicates the ineffectiveness of existing methods of combating the disease and reinforces the urgent need to create effective

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

vaccines. One of the most significant antigens required for the formation of immune protection against ASF is a serotype-specific CD2v protein.

The purpose of the study. This study presents the results of immuno-informatics on the identification of B- and T-cell epitopes for the CD2v protein of the ASF virus using *in silico* prediction methods.

Material and methods. The primary sequence of the CD2v protein of the ASFV virus strain Georgia 2007/1 (ID-FR682468) was analyzed *in silico* by programs BCPred, NetCTLpan, VaxiJen, PVS and Epitope Conservancy Analysis.

Results. Using the BCPred and VaxiJen programs, 4 major B-cell immunogenic epitopes were identified. Analysis of the secretory region of ASF virus CD2v protein in NetCTLpan revealed 5 T-cell epitopes from the 32nd to the 197th position of amino acids that cross-link from the 1st to the 13th allele of the MHC-l of pig

Discussion. This study presents the results *in silico* prediction to identify B- and T-cell epitopes of ASF virus CD2v protein. The soluble region of the CD2v protein can be included in the recombinant polyepitope vaccine against African swine fever.

Conclusion. B- and T-cell epitopes in the secretory region of the CD2v protein (from 17 to 204 aa) of ASF virus were identified by *in silico* prediction. An analysis of the conservatism of the identified B- and T-cell epitopes allowed us to develop a map of the distribution of immune epitopes in the CD2v protein sequence.

Keywords: African swine fever; CD2v protein; in silico; prediction of linear B-epitopes; prediction of linear T-epitopes; major histocompatibility complex class I; analysis of immunogenicity peptides; analysis of protein variability; analysis of the conservativeness of immunoepitopes.

For citation: Mima K.A, Katorkina E.I, Katorkin S.A, Tsybanov S.Zh., Malogolovkin A.S. *In silico* prediction of B- and T-cell epitopes in the CD2v protein of african swine fever virus (*African swine fever virus*, *Asfivirus*, *Asfaviridae*). *Voprosy Virusologii* (*Problems of Virology*). 2020; 65(2): 103-112. (In Russ.). DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-103-112

For correspondence: Ksenia A. Mima, PhD, Leading Researcher of Laboratory of Virus Genomics, Federal Research Center for Virology and Microbiology, Volginsky, Vladimir region, 601125, Russia. E-mail: mima89@ya.ru **Information about the authors:**

Mima K.A, https://orcid.org/0000-0001-7184-6968 Katorkina E.I., https://orcid.org/0000-0003-3329-0182 Katorkin S.A., https://orcid.org/0000-0002-4844-9371 Tsybanov S.Zh., https://orcid.org/0000-0001-8994-0514 Malogolovkin A.S., https://orcid.org/0000-0003-1352-1780

Acknowledgments. The reported study was funded by RFBR according to the research project № 18-316-00092. **Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Contribution. The authors contributed equally to this article.

Received 09 January 2020 Accepted 29 January 2020

Введение

Африканская чума свиней (АЧС) — инфекционная болезнь диких и домашних свиней, характеризующаяся высокой летальностью (до 100%), сверхострым, подострым, острым и хроническим течением. На территории РФ она регистрируется с 2007 г., и на протяжении последних лет страны Восточной Европы и Китай являются территорией стационарного неблагополучия по данному заболеванию [1].

Вирус АЧС – представитель семейства Asfarviridae, рода Asfivirus. Геном вируса состоит из линейной двухцепочечной ДНК (дцДНК) размером 170–190 тыс. пар нуклеотидов, в зависимости от штамма/ изолята. При анализе нуклеотидной последовательности генома референтного штамма Ba71V вируса АЧС выявлено 150 открытых рамок считывания, а в инфицированных вирусом АЧС клетках идентифицировано 95 полипептидов с молекулярной массой от 10 до 220 кДа [2].

На протяжении многих лет исследовательские группы всего мира усиленно работают над созданием вакцины против АЧС на основе как аттенуированных штаммов, так и рекомбинантных вирусов с использованием ДНК- и РНК-технологий [3]. При разработке эффективных средств специфической профилактики против АЧС одним из актуальных направлений является использование рекомбинантных белков (эпитопов) иммунологически значимых белков вируса АЧС [4].

Вирусные белки, присутствующие на оболочке вирионов и поверхности инфицированных клеток, представляют основную мишень для клеточно-опосредованного иммунитета и могут быть мишенями для нейтрализующих антител, что, несомненно, требует детального изучения [5].

Ранее были идентифицированы белки, предположительно отвечающие за способность к интернализации вируса: p72/B646Lp, p54/E183Lp и p30/CP204Lp. Антитела к белкам p72/B646Lp и p54/E183Lp могут ингибировать связывание вируса с клетками, а антитела к p30/CP204Lp — интернализацию вируса [6]. Были идентифицированы и другие белки вируса АЧС, которые также отвечают за проникновение и распространение вируса. К ним относятся CD2v/EP402R, p12/O61Rp, D117L [6–8]. Применение данных белков в качестве протективных антигенов обеспечивало только частичную защиту, однако не защищало жи-

вотных от вирусов АЧС гетерологичного происхождения.

Известно, что отдельные эпитопы в составе вирусных антигенов способны индуцировать В- и Т-клеточный иммунный ответ и могут быть оптимальными кандидатами для создания эффективных вакцин [9].

Современные алгоритмы иммуноинформатики активно используются для поиска отдельных эпитопов вирусных антигенов для последующего включения их в состав кандидатных вакцин [10]. Эпитопы представляют собой короткие аминокислотные (аа) пептиды из 7–9 аа главного комплекса гистосовместимости I класса (major histocompatibility complex, MHC I) и 12–15 аа главного комплекса гистосовместимости II класса (МНС II). Эпитопы Т-клеток, которые могут связываться с МНС I, стимулируют цитотоксические Т-лимфоциты.

Известно, что иммунная защита при АЧС реализуется за счёт цитотоксических Т-лимфоцитов-киллеров [11] и эффекторов антителозависимой клеточной цитотоксичности и действует против вирусных белков, представленных на поверхности заражённых моноцитов [7, 12].

При поиске протективных антигенов вируса АЧС сотрудниками ФГБНУ ФИЦВиМ, [1, 12, 13] был идентифицирован и изучен CD2v белок вируса АЧС, являющийся важным компонентом при гомологичной инфекции. В качестве мишени для лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы CD48 и CD58, и презентации антигенпрезентирующим клеткам предложено использовать секреторную часть белка вируса АЧС – CD2v [14]. Однако нет данных, подтверждающих, что только секреторная часть белка CD2v имеет Вительной вание иммунного ответа.

Цель данной работы – выявление В- и Т-клеточных эпитопов в белке CD2v вируса AЧС с использованием методов *in silico* прогнозирования.

Материал и методы

Анализ аминокислотной последовательности. Первичная последовательность белка CD2v вируса AЧС штамма Georgia 2007/1 (ID FR682468) была получена из базы данных GenBank Национального центра биотехнологической информации (NCBI). Дополнительно для анализа вариабельности и консервативности использовали аминокислотные последовательности белка CD2v 103 полевых изолятов и штаммов вируса АЧС, представленные в базе данных Uniprot (https://www.uniprot.org/).

Прогнозирование В-клеточных эпитопов. Первичную последовательность белка CD2v вируса AЧС анализировали на наличие В-клеточных эпитопов с помощью программы BCPred и дополнительно BCPred + AAP (http://ailab.ist.psu.edu/bcpred/predict. html) при установленных стандартных параметрах. Для прогнозирования структурных В-клеточных эпитопов 3D-структуры белка CD2v вируса AЧС использовали сервер DiscoTope 2.0 (http://tools.iedb.org/discotope).

Прогнозирование Т-клеточных эпитопов. Т-клеточные линейные эпитопы анализировали в программе TepiTool (http://tools.iedb.org/tepitool/) и NetCTLpan 1.1 (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTLpan/) при установленных стандартных параметрах.

Построение 3D-структуры белка CD2v вируса AЧС. Для построения предполагаемой 3D-структуры белка CD2v вируса AЧС использовали сервер I-TASSER (http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/) при стандартных параметрах.

Анализ иммуногенности прогнозируемых В-эпитопов проводили с помощью программы VaxiJen (http:// www.ddg-pharmfac.net/vaxiJen/VaxiJen/VaxiJen.html) при установленных стандартных параметрах.

Анализ вариабельности белка CD2v вируса AЧС проводили в программе PVS (Protein Variability Server) (www.imed.med.ucm.es/PVS/) по методу Симпсона. Порог вариабельности выбран 0,46, согласно рекомендациям к программе.

Анализ консервативности эпитопов проводили в базе данных Epitope Conservancy Analysis с помощью алгоритма Epitope Conservancy Analysis (http://tools.iedb.org/conservancy/) при установленных стандартных параметрах.

Результаты

На первом этапе работы была смоделирована стратегия поиска и анализа В- и Т-клеточных эпитопов в белке CD2v вируса АЧС. Для идентификации иммунных эпитопов была использована аминокислотная последовательность белка CD2v вируса AЧС штамма Georgia 2007/1. Выбор в пользу данного штамма объясняется тем, что, несмотря на длительный период циркуляции вируса на территории России (12 лет), современные штаммы и изоляты вируса АЧС сохраняют свою генетическую однородность и вирулентные свойства. Анализируя аналогичные работы [15-18], нами были выбраны часто применяемые инструменты биоинформатики для поиска и интерпретации Ви Т-клеточных эпитопов, которые были использованы для анализа антигена вируса АЧС. В результате была сформирована блок-схема дизайна исследования (рис. 1), которая позволила нам реализовать задачи и этапы исследования.

Прогнозирование В-клеточных эпитопов

Известно, что антигенные эпитопы, способные индуцировать иммунитет обоих типов (В- и Т-клеточный), — хорошие кандидаты для разработки синтетических пептидных вакцин, иммунодиагностических тестов и выработки антител [9, 10]. Начальным этапом конструирования вакцин является предсказание В-клеточных эпитопов. Аминокислотная последовательность белка CD2v была подвергнута *in silico* прогнозированию на наличие В-клеточных эпитопов с помощью программы BCPred, с использованием метода прогнозирования линейных эпитопов в указанных В-клетках.

Методы BCPred и AAP (аминокислотная пара) довольно часто используют для прогнозирования В-кле-

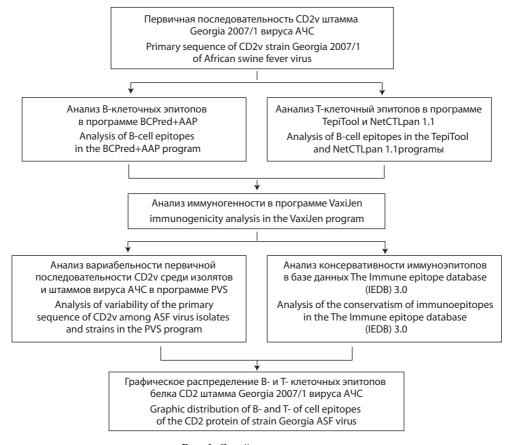


Рис. 1. Дизайн исследования.AЧС – африканская чума свиней.Fig. 1. Study design.ASF is African swine fever.

точных эпитопов фиксированной длины [19]. В нашем случае с помощью комбинации BCPred + AAP анализировали всю последовательность белка CD2v вируса AЧС (402 аа) на наличие линейных эпитопов длиной 20 аа, без перекрытия и с учётом специфичности не менее 75%.

Нами показано наличие девяти прогнозируемых В-клеточных эпитопов (табл. 1), имеющих высокие показатели прогнозирования — от 0,99 до 1,00 балла. Кроме того, было продемонстрировано, что большинство В-эпитопов находится во внецитоплазматическом домене (пять из девяти), они располагаются в позициях стартовых аминокислот 63, 104, 133, 154, 176.

Далее все девять эпитопов были проверены на иммуногенность с помощью программы Vaxijen [20]. При анализе учитывали только пептиды с показателями выше порогового значения (0,5). Так, четыре из девяти анализируемых эпитопов имеют наибольший количественный показатель прогнозирующей способности (AUC_{ROC}), который варьируется от 0,5 для случайного прогноза до 1,0 для идеального прогноза. Можно отметить, что обнаруженные пептиды располагаются как в цитоплазматической, так и во внецитоплазматической части исследуемого белка. Наиболее иммуногенным представлен пептид в позиции 176-й

аминокислоты, имеющий $AUC_{ROC} = 0,9935$. При рассмотрении локализации данного эпитопа также выделяется его внецитоплазматическое расположение в последовательности белка CD2v вируса AЧC. Таким образом, нами выделены четыре из девяти В-клеточных эпитопов белка CD2v вируса AЧC.

Прогнозирование Т-клеточных эпитопов

Рассматривая возможность дальнейшего создания пептидной вакцины, представляется логичным использование только внецитоплазматической части первичной последовательности белка CD2v вируса АЧС. Анализ секреторной части CD2v с 17-й по 204ю аминокислоту проводили в программе NetCTLpan версия 1.1 только для МНС I [21], согласно параметрам программы, установленным по умолчанию: длина пептида – 9 аа; анализ проводили для свиных аллелей (SLA); порог идентификации пептида – 1,0; порог протеосомального расщепления (Cle) – 0,225; эффективность транспорта TAP (Transporter associated with antigen processing) – 0,025.

Вся последовательность CD2v была разделена на 196 пептидов длиной 9 аа каждый. В результате анализа пептиды-лиганды МНС I были выявлены в 33 аллелях: SLA-1*0201, SLA-1*0202, SLA-1*0401,

Таблица 1. *In silico* прогнозирование и анализ иммуногенности B-клеточных эпитопов белка CD2v вируса африканской чумы свиней **Table 1.** *In silico* prediction and analysis of the immunogenicity of B-cell epitopes of the African swine fever virus CD2v protein

Позиция аминокислот Amino acid position	Эпитоп Epitope	Показатель BCPred + AAP Score BCPred + AAP	Показатель AUC _{ROC} Vaxijen Score AUC _{ROC} Vaxijen	Иммуногенность Vaxijen Immunogenicity Vaxijen
232-254	RKRKKHVEEIESPPPSESNE	1	0,5939	++
371–390	SPPKPLPSIPLLPNIPPLST	1	0,3747	_
154–177	DTNGDILNYYWNGNNNFTAT	1	0,2424	-
290-312	PSTQPLNPFPLPKPCPPPKP	1	0,4064	+
104-126	DKKINYTVKLLKSVDSPTIT	1	0,5040	++
266–286	SPREPLLPKPYSRYQYNTPI	1	0,2061	-
176-196	INNTISSLNETENINCTNPI	1	0,9935	+++
133-154	CKNNNGTNVNIYLIINNTIV	1	0,0938	-
63-83	GNYCSCCGHNISLYNTTNNC	0,99	0,1204	_

Примечание. BCPred + AAP – показатель прогнозирования линейного эпитопа, где максимальное значение 1 балл; AUC_{ROC} Vaxijen – количественный показатель прогнозирующей способности, варьируется от 0,5 для случайного прогноза до 1,0 для идеального прогноза, пороговое значение 0,5; серым цветом выделены эпитопы в цитоплазматическом домене; белым цветом представлены эпитопы во внецитоплазматическом домене; жирным шрифтом выделены эпитопы, имеющие прогнозируемую иммуногенность.

Note. BCPred + AAP - indicator of prediction of the linear epitope, where the maximum value is 1 point; AUC_{ROC} Vaxijen - a quantitative indicator of predictive ability, which ranging from 0.5 for a random prediction, to 1.0 for an ideal prediction. A threshold value 0.5; epitopes in the cytoplasmic domain are highlighted in gray; epitopes in the extracytoplasmic domain are highlighted in white; epitopes with predicted immunogenicity are shown in bold font.

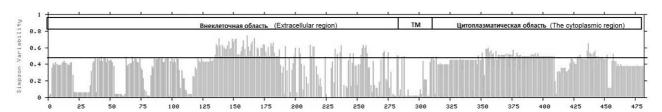


Рис. 2. Результаты анализа вариабельности белка CD2v вируса африканской чумы свиней.

Fig. 2. Results of variability analysis of protein CD2v of African swine fever virus.

SLA-1*0501, SLA-1*0601, SLA-1*0701, SLA-1*0702, SLA-1*0801, SLA-1*1101, SLA-1*1301, SLA-2*0101, SLA-2*0301, SLA-2*0302, SLA-2*0401, SLA-2*0402, SLA-2*0501, SLA-2*0502, SLA-2*0701, SLA-2*1002, SLA-2*1201, SLA-3*0101, SLA-3*0301, SLA-3*0302, SLA-3*0303, SLA-3*0304, SLA-3*0401, SLA-3*0601, SLA-3*0701, SLA-6*0101, SLA-6*0102, SLA-6*0103, SLA-6*0104 и SLA-6*0105. В общей сложности всего было определено 53 пептида, способные связываться с МНС I (табл. 2).

Затем были выделены пептиды, имеющие перекрёстное связывание с несколькими аллелями МНС I (табл. 3). Так, пептид YYWNGNNNF способен связывать 13 аллелей с МНС I, SVDSPTITY – 10 аллелей, YGGLFWNTY – 8 аллелей, ITYNCTNSL – 5 аллелей, STLFYIIIF – 4 аллели, GGLFWNTYY – 4 аллели, NTEIFNRTY – 3 аллели, DTNGDILNY – 3 аллели, остальные 6 пептидов способны связываться только с одной аллелью.

Далее мы искали аминокислотные последовательности белка CD2v в базе данных Uniprot (www.uniprot. org). В результате идентифицированы 103 источника первичной последовательности белка CD2v вируса AЧС. Множественное выравнивание полноразмерных последовательностей целевого белка CD2v различных штаммов и изолятов вируса АЧС

позволило определить от 51,5 до 100% гомологии. Затем сравнительный анализ 103 последовательностей белка CD2v в формате FASTA был использован для анализа вариабельности. Вариабельность белка CD2v вируса AЧС анализировали в программе PVS (Protein Variability Server) (www.imed.med.ucm.es/ PVS/). Для анализа вариабельных областей был использован метод Симпсона, основанный на расчёте индекса разнообразия аминокислотных последовательностей в пропорциях [22]. Индекс описывает вероятность того, что две последовательности с заменами, выбранные случайным образом, будут схожи с остальными аминокислотными последовательностями. Значения этого индекса находятся в диапазоне от 0 до 1 и тем больше, чем разнообразнее образцы. В нашем случае эталонной считалась консенсусная последовательность белка CD2v вируса AЧС. Порог изменчивости был установлен на уровне 0,46, как рекомендовано инструкцией.

Анализ вариабельности белка CD2v вируса AЧС (рис. 2) показал, что наиболее вариабельной областью является внеклеточная часть белка. Подробно рассматривая секреторную область, можно выделить участок со 130-й по 260-ю аминокислоту, имеющий наибольший профиль изменчивости. Однако в секреторной области встречаются и отдельные локусы, ко-

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Таблица 2. *In silico* прогнозирование Т-клеточных эпитопов белка CD2v вируса африканской чумы свиней **Table 2.** *In silico* prediction of T-cell epitopes of the African swine fever virus CD2v protein

Аллель Allele	Пептид Peptide	Показатель МНС I Score MHC I	Показатель ТАР Score TAP	Показатель Cle Score Cle	Показатель Comb Score Comb	Оценка достоверности Reliability index
SLA-1*0201	SVDSPTITY	0,40300	3,04100	0,97851	0,69919	0,80
SLA-1*0202	SVDSPTITY	0,40300	3,04100	0,97851	0,69919	0,80
SLA-1*0401	NTEIFNRTY	0,17800	2,93700	0,96077	0,46760	0,80
SLA-1*0401	SVDSPTITY	0,21800	3,04100	0,97851	0,51419	0.40
SLA-1*0401	ITYNCTNSL	0,21700	1,15300	0,96219	0,46232	0.80
SLA-1*0501	YGGLFWNTY	0,15300	2,48500	0,93511	0,42552	0,80
SLA-1*0501	YYWNGNNNF	0,21300	3,09200	0,96218	0,50679	0,15
SLA-1*0601	SVDSPTITY	0,24100	3,04100	0,97851	0,53719	0,80
SLA-1*0701	SVDSPTITY	0,18100	3,04100	0.97851	0,47719	0,80
SLA-1*0701	DTNGDILNY	0,24500	2,63400	0.81970	0,49528	0,80
SLA-1*0702	SVDSPTITY	0,18100	3,04100	0,97851	0,47719	0,80
SLA-1*0702	DTNGDILNY	0,24500		0,81970	0,47719	0,80
			2,63400			
SLA-1*0801	SVDSPTITY	0,22300	3,04100	0,97851	0,51919	0,80
SLA-1*1101	YGGLFWNTY	0,10000	2,48500	0,93511	0,37252	0,80
SLA-1*1101	YYDNNRSNF	0,08400	2,61300	0,94314	0,36153	0,80
SLA-1*1101	YYWNGNNNF	0,10300	3,09200	0,96218	0,39679	0,30
SLA-1*1301	YYWNGNNNF	0,19700	3,09200	0,96218	0,49079	0.,80
SLA-2*0101	STLFYIIIF	0,19700	2,63200	0,66679	0,41283	0,80
SLA-2*0301	ITYNCTNSL	0,26900	1,15300	0,96219	0,51432	0,40
SLA-2*0302	SVDSPTITY	0,22700	3,04100	0,97851	0,52319	0,80
SLA-2*0401	YGGLFWNTY	0,16600	2,48500	0,93511	0,43852	0,80
SLA-2*0401	NTEIFNRTY	0,16400	2,93700	0,96077	0,45360	0,80
SLA-2*0401	DTNGDILNY	0,18500	2,63400	0,81970	0,43528	0,80
SLA-2*0402	NIFTINDTY	0,08600	3,34300	0,87245	0,36588	0,80
SLA-2*0402	YGGLFWNTY	0,09700	2,48500	0,93511	0,36952	0,80
SLA-2*0402	TYCGIAGNY	0,11600	3,07200	0,96286	0,40944	0,20
SLA-2*0402	YYWNGNNNF	0,10200	3,09200	0,96218	0,39579	0,30
SLA-2*0501	ITYNCTNSL	0,14200	1,15300	0,96219	0,38732	0,80
SLA-2*0502	ITYNCTNSL	0,30800	1,15300	0,96219	0,55332	0,30
SLA-2*0701	VFLNNIFTI	0,14600	0,79200	0,87718	0,36317	0,40
SLA-2*0701	SVDSPTITY	0,05000	3,04100	0,97851	0,34619	0,80
SLA-2*0701	YYWNGNNNF	0,06500	3,09200	0,96218	0,35879	0,80
SLA-2*1002	SVDSPTITY	0,29000	3,04100	0,97851	0,58619	0,80
SLA-2*1201	ITYNCTNSL	0,12700	1,15300	0,96219	0,37232	0,80
SLA-3*0101	KYQNYLSTL	0,29000	1,34200	0,78452	0,50007	0,80
SLA-3*0301	YGGLFWNTY	0,23700	2,48500	0,93511	0,50952	0,80
SLA-3*0301	GGLFWNTYY	0,21400	2,44500	0,93864	0,48632	0,80
SLA-3*0301	YYWNGNNNF	0,19500	3,09200	0,96218	0,48879	0,80
SLA-3*0302	NIFTINDTY	0,15300	3,34300	0,87245	0,43288	0,80
SLA-3*0302	YGGLFWNTY	0,21700	2,48500	0,93511	0,48952	0,30
SLA-3*0302	NTEIFNRTY	0,15500	2,93700	0,96077	0,44460	0,80
SLA-3*0302	YYWNGNNNF	0,16200	3,09200	0,96218	0,45579	0,80
SLA-3*0302	YQNYLSTLF	0,38700	2,59700	0,09834	0,47405	0,40
SLA-3*0303	YGGLFWNTY	0,23700	2,48500	0,93511	0,50952	0,80
SLA-3*0303	GGLFWNTYY	0,21400	2,44500	0,93864	0,48632	0,80
SLA-3*0303	YYWNGNNNF	0,19500	3,09200	0,96218	0,48879	0,80
SLA-3*0304 SLA-3*0304	YGGLFWNTY GGLFWNTYY	0,25800 0,24300	2,48500	0,93511 0,93864	0,53052 0,51532	0,40 0,80
SLA-3*0304 SLA-3*0401	STLFYIIIF	0,24300	2,44500 2,63200	0,66679	0,66783	0,80
SLA-3*0401 SLA-3*0601	GGLFWNTYY	0,33100	2,44500	0,93864	0,60332	0,20
SLA-3*0601 SLA-3*0601	STLFYIIIF	0,38000	2,63200	0,66679	0.59583	0,80
SLA-3*0001 SLA-3*0701	STLF YIIIF STLFYIIIF	0,38000	2,63200	0,66679	0,61183	0,80
SLA-5*0701 SLA-6*0101	YYWNGNNNF	0,39000	3,09200	0,96218	0,53479	0,30
SLA-6*0101 SLA-6*0102 SLA-6*0103 SLA-6*0104 SLA-6*0105	1 1 WINGININING	0,27100	3,07200	0,20210	V,JJ717	0,50

Таблица 3. Т-клеточные эпитопы белка CD2v вируса африканской чумы свиней, имеющие перекрёстное связывание с аллелями MHC I **Table 3.** T-cell epitopes of African swine fever virus CD2v protein cross-linked with MHC I alleles

№	Пептид Peptide	Аллель Allele	Показатель иммуногенности Score Immunogenicity	Иммуногенный потенциал Immunogenic potential
1	YYWNGNNNF	SLA-1*0501, SLA-1*1101, SLA-1*1301, SLA-2*0402, SLA-2*0701, SLA-3*0301, SLA-3*0302, SLA-3*0303, SLA-6*0101, SLA-6*0102, SLA-6*0103, SLA-6*0104, SLA-6*0105	0,0134	-
2	SVDSPTITY	SLA-1*0201, SLA-1*0202, SLA-1*0401, SLA-1*0601, SLA-1*0701, SLA-1*0702, SLA-1*0801, SLA-2*0302, SLA-2*0701, SLA-2*1002	-0,2392	-
3	YGGLFWNTY	SLA-1*0501, SLA-1*1101, SLA-2*0401, SLA-2*0402, SLA-3*0301, SLA-3*0302, SLA-3*0303, SLA-3*0304	0,1467	_
4	ITYNCTNSL	SLA-1*0401, SLA-2*0301, SLA-2*0501, SLA-2*0502, SLA-2*1201	0,5662	+
5	STLFYIIIF	SLA-2*0101, SLA-3*0401, SLA-3*0601, SLA-3*0701	-0,0831	
6	GGLFWNTYY	SLA-3*0301, SLA-3*0303, SLA-3*0304, SLA-3*0601	0,1157	=
7	NTEIFNRTY	SLA-1*0401, SLA-2*0401, SLA-3*0302	0,0108	=
8	DTNGDILNY	SLA-1*0701, SLA-1*0702, SLA-2*0401	-0,1999	=
9	YYDNNRSNF	SLA-1*1101	0,5656	+
10	NIFTINDTY	SLA-2*0402	0,5329	+
11	TYCGIAGNY	SLA-2*0402	1,3006	+++
12	VFLNNIFTI	SLA-2*0701	-0,2956	_
13	KYQNYLSTL	SLA-3*010	0,5117	+
14	YQNYLSTLF	SLA-3*0302	-0,0829	



Рис. 3. Графическое распределение B- и T-клеточных эпитопов белка CD2v штамма Georgia 2007/1 вируса африканской чумы свиней. **Fig. 3.** Image of positions of B- and T-cell epitopes in CD2v protein of strain Georgia 2007/1 African swine fever virus.

торые имеют низкий показатель изменчивости и являются консервативными среди выборки штаммов и изолятов вируса АЧС. Наиболее консервативный профиль гетерогенности имеет С-концевая часть белка, которая характерна для цитоплазматической локализации.

Результаты определения вариабельности белка CD2v вируса AЧС легли в основу следующего исследования по анализу консервативности иммунных эпитопов. Консервативность эпитопов анализировали в базе данных иммуноэпитопов The immune epitope database (IEDB) 3.0 с помощью алгоритма Epitope Conservancy Analysis [23] и оценки линейных эпитопов с порогом идентичности последовательности не менее 100%. Консервацию эпитопа выражали в процентах (табл. 4) с полностью гомологичными ему последовательностями относитель-

но всей исследуемой выборки штаммов и изолятов вируса АЧС.

Как видно из результатов анализа консервативности, представленных в табл. 4, для четырёх В-клеточных эпитопов характерен диапазон консервативности от 50 до 100%. Наиболее консервативным является эпитоп PSTQPLNPFPLPKPCPPPKP, локализующийся в позиции от 290-й аминокислоты и имеющий 100% по-казатель гомологии. Наиболее вариабельным эпитопом оказался пептид DKKINYTVKLLKSVDSPTIT, локализующийся в позиции от 104-й аминокислоты и имещий 50% показатель гомологии.

Так, в конце исследования нами была сформирована карта распределения идентифицированных иммунных эпитопов на первичной последовательности белка CD2 вируса AЧС (рис. 3), принадлежащих к современным полевым изолятам вируса АЧС, штамма Georgia 2007/1.

Таблица 4. Консервативность Т- и В-клеточных эпитопов белка CD2v в штаммах и изолятах вируса африканской чумы свиней **Table 4.** Conservation of T-and B-cell epitopes of CD2v protein in strains and isolates of African swine fever virus

№	Позиция аминокислот Amino acid position	Последовательность Sequence	Иммуногенность Immunogenicity	Консервативность эпитопов,% Conservation of epitopes,%				
	В-клеточные эпитопы							
		B-cell epitopes						
1	232–254	RKRKKHVEEIESPPPSESNE	++	80				
2	290–312	PSTQPLNPFPLPKPCPPPKP	+	100				
3	104–126	DKKINYTVKLLKSVDSPTIT	++	50				
4	176–196	INNTISSLNETENINCTNPI	+++	65				
		Т-клеточные эпито	опы					
		T-cell epitopes						
1	122–131	ITYNCTNSL	+	88,89				
2	48–57	YYDNNRSNF	+	44,44				
3	32-41	NIFTINDTY	+	44				
4	57–66	TYCGIAGNY	+++	55,56				
5	197–206	KYQNYLSTL	+	33,33				

Таблица 5. *In silico* прогнозирование структурных В-клеточных эпитопов белка CD2v вируса африканской чумы свиней **Table 5.** *In silico* prediction of structural B-cell epitopes of the African swine fever virus CD2v protein

Позиция аминокислоты, Amino acid position	Аминокислотный остаток Amino acid	Количество контактирующих остатков аминокислот Amount of contact amino acid	Скоринг приближённости Score proximity	Скоринг DiscoTop Score DiscoTop
21	VAL	9	-2,943	-3,639
32	LYS	0	-1,863	-1,648
40	ASN	1	-3,15	-2,903
80	PRO	10	-2,242	-3,134
81	ASN	12	-1,309	-2,538
83	THR	0	-0,447	-0,395
84	ASP	8	-0,935	-1,747
128	LYS	0	-4,154	-3,676

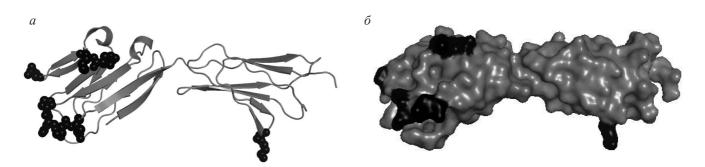


Рис. 4. 3D-модель структуры растворимой области белка CD2v вируса африканской чумы свиней штамма Georgia 2007/1, прогнозируемая сервером I-Tasser (*a*), и прогнозируемые структурные В-клеточные эпитопы белка CD2v вируса африканской чумы свиней в 3D-формате (δ).

Области В-клеточных эпитопов показаны чёрным цветом.

Fig. 4. 3D model of the structure of soluble region of CD2v protein of strain Georgia 2007/1 African swine fever virus, predicted by server I-Tasser (a), and predicted structural B-cell epitopes of African swine fever virus CD2v protein in 3D format (b).

Areas of B-cell epitopes are shown in black.

Areas of B-een ephopes are shown in oracl

Прогнозирование структурных В-клеточных эпитопов

Для поиска структурных В-клеточных эпитопов была смоделирована предполагаемая 3D-модель растворимой области белка CD2v вируса AЧС штамма Georgia 2007/1. Используя программу I-Tasser, удалось получить несколько прогнозируемых 3D-структур

исследуемого белка, из которых модель 1ССZ pdb (рис. 4, а) обладала наибольшей структурной гомологией с белком CD2v. Модель трёхмерной структуры белка CD2v вируса АЧС – 1ССZ была использована в качестве матрицы для поиска конформационных В-клеточных эпитопов. С помощью сервера DiscoTope 2.0 и 3D-модели 1ССZ pdb были идентифи-

цированы 8 участков прогнозируемых В-клеточных эпитопов (см. рис. 4, б; табл. 5).

Обсуждение

Ранее авторами [12, 13] было установлено, что белок CD2v вируса AЧС способен модулировать иммунный ответ и является неотъемлемым компонентом защиты. В связи с этим обнаружить наличие Ти В-клеточных эпитопов в белке CD2v вируса АЧС с использованием методов *in silico* прогнозирования стало актуальной задачей.

Прогнозирование в программе BCPred с дополнительным анализом AAP является основным методом, который позволяет предсказать наличие В-клеточных эпитопов в исследуемом белке. Нами выявлено 9 предполагаемых В-клеточных эпитопов. Дополнительный анализ иммуногенности в программе Vaxijen для выявленных пептидов позволил сузить круг пептидов до четырёх основных, несущих свойства антигенности. Иммуногенные В-клеточные эпитопы локализуются как во внецитоплазматической, так и во внутриплазматической части белка CD2v. Таким образом, были определены эпитопы (RKRKKHVEEIESPPPSESNE, PSTQPLNPFPL PKPCPPPKP, DKKINYTVKLLKSVDSPTIT, INNTISSL NETENINCTNPI), которые входят в состав антигена CD2v и могут активировать В-клеточный иммунитет.

Далее был проведён анализ для идентификации Т-клеточных эпитопов, способных связываться с молекулой МНС І. К сожалению, отсутствие референсной трёхмерной структуры белка CD2v, а также in silico серверов с базами данных аллелей свиньи не позволяет оценить наличие структурных конформационных Т-клеточных эпитопов. Так, нами выявлено 53 линейных эпитопа только во внецитоплазматической области белка CD2v вируса AЧС. Пептиды, которые связываются с различными аллелями МНС І и одновременно имеют сайт расщепления протеосом на C-конце (Cle), высокоэффективны в прогнозировании Т-клеточных эпитопов. Применение анализа иммуногенности в программе Vaxijen позволило выявить Т-пептиды с большим иммуногенным потенциалом. В результате были выделены следующие пептиды, которые, по нашему мнению, заслуживают особого внимания для активации Т-клеточного ответа: ITYNCTNSL, YYDNNRSNF, NIFTINDTY, TYCGIAGNY, KYQNYLSTL.

Анализируя достоверность результатов идентификации Т-клеточных эпитопов, G. Вигтакіпа и соавт. [13] идентифицировали четыре кластера Т-клеточных эпитопа белка CD2v, показавших интерфероновый ответ на стимуляцию синтетическим пептидами клеток PBMC (peripheral blood mononuclear cell). Два Т-эпитопа были локализованы во внецитоплазматической области белка CD2v и затрагивали иммуноглобулин-подобный домен. Таким образом, подтверждено, что белок CD2v штамма Congo K-49 вируса АЧС имеет Т-клеточные эпитопы, способные активировать клетки CD4+ и CD8+. Кроме того, некоторые из этих пептидов совпали с *in silico* прогнозированием в программе CTLPred, что ещё раз доказывает обоснованность использования вычис-

лительных моделей и алгоритмов для поиска полиэпитопных антигенов.

Выявление конформационных В-эпитопов растворимой области белка CD2v позволило идентифицировать восемь структурных эпитопов. Это позволяет ещё раз убедиться в способности антигена CD2v вируса AЧC активировать В-клеточный иммунитет.

Учитывая возможность создания препарата для профилактики АЧС с помощью технологии рекомбинантных белков, нужно рассматривать структурные и физико-химические особенности данного белка, в частности, использования только растворимой области. Как упоминалось ранее, эпитопы, способные индуцировать иммунитет обоих типов (В- и Т-клетки), являются хорошими кандидатами для создания вакцины.

Заключение

Результаты анализа *in silico* прогнозирования В-и Т-клеточных эпитопов позволяют сделать вывод о том, что аминокислотная последовательность с 17-й по 204-ю аминокислоту белка CD2v вируса AЧС может быть включена в конструкцию полиэпитопной В-и Т-клеточной вакцины против АЧС.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 3, 5-22 см. REFERENCES)

- Середа А.Д. Белки вируса африканской чумы свиней. Научный журнал КубГАУ. 2012; 3(77): 1-12. Available at: http://ej.kubagro. ru/2012/03/pdf/35.pdf
- Власова Н.Н. Перспективы использования методов молекулярной иммунологии и генной инженерии в системе мер по борьбе с африканской чумой свиней (обзор). Сельскохозяйственная биология. 2012; 47(4): 22-30.
- Мима К.А., Бурмакина Г.С., Титов И.А., Малоголовкин А.С. Иммунологически значимые гликопротеины p54 и CD2v вируса африканской чумы свиней: биоинформатический анализ генетических вариаций и гетерогенности. Сельскохозяйственная биология. 2015; 50(6): 785-93.

DOI: http://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.6.785rus

REFERENCES

- Sereda A.D. Proteins of African swine fever virus. *Nauchnyy zhur-nal KubGAU*. 2012; 3(77): 1-12. Available at: http://ej.kubagro.ru/2012/03/pdf/35.pdf (in Russian)
- Gogin A., Gerasimov V., Malogolovkin A., Kolbasov D. African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007-2012. *Virus Res.* 2013; 173(1): 198-203. DOI: http://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.007
- Barderas M.G., Rodriguez F., Gomez-Puertas P., Aviles M., Beitia F., Alonso C., et al. Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins. *Arch. Virol.* 2001; 146(9): 1681-91.
 DOI: http://doi.org/10.1007/s007050170056
- Vlasova N.N. Prospects of molecular immunology and genetic engineering in control of African swine fever (review). Sel'skokhozyayst-
- vennaya biologiya. 2012; 47(4): 22-30. (in Russian)
 5. Han T., Marasco W.A. Structural basis of influenza virus neutraliza-
- Han I., Marasco W.A. Structural basis of influenza virus neutralization. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2011; 1217: 178-90. DOI: http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05829.x
- Zsak L., Onisk D.V., Afonso C.L., Rock D.L. Virulent African swine fever virus isolates are neutralized by swine immune serum and by monoclonal antibodies recognizing a 72-Kda viral protein. *Virology.* 1993; 196(2): 596-602.
- DOI: http://doi.org/10.1006/viro.1993.1515
 Escribano J.M., Galindo I., Alonso C. Antibody-mediated neutralization of African swine fever virus: Myths and facts. *Virus Res.* 2013; 173(1): 101-9.
 - DOI: http://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.012

- Neilan J.G., Zsak L., Lu Z., Burrage T.G., Kutish G.F., Rock D.L. Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology.* 2004; 319(2): 337-442. DOI: http://doi.org/10.1016/j.virol.2003.11.011
- 9. Thomson S.A., Elliott S.L., Sherritt M.A., Sproat K.W., Coupar B.E., Scalzo A.A., et al. Recombinant polyepitope vaccines for the delivery of multiple CD8 cytotoxic T cell epitopes. *J. Immunol.* 1996; 157(2): 822-6.
- Khalili S., Jahangiri A., Borna H., Ahmadi Zanoos K., Amani J. Computational vaccinology and epitope vaccine design by immunoinformatics. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2014; 61(3): 285-307.
- DOI: http://doi.org/10.1556/AMicr.61.2014.3.4
 11. Takamatsu H.H., Denyer M.S., Lacasta A., Stirling C.M., Argilaguet J.M., Netherton C.L., et al. Cellular immunity in ASFV responses. *Virus Res.* 2013; 173(1): 110-21.
 DOI: http://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.11.009
- Burmakina G., Malogolovkin A., Tulman E.R., Zsak L., Delhon G., Diel D.G., et al. African swine fever virus serotype-specific proteins are significant protective antigens for African swine fever. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(7): 1670-5.
 DOI: http://doi.org/10.1099/jgv.0.000490
- Burmakina G., Malogolovkin A., Tulman E.R., Xu W., Delhon G., Kolbasov D., et al. Identification of T-cell epitopes in African swine fever virus CD2v and C-type lectin proteins. *J. Gen. Virol.* 2019; 100(2): 259-65.
 DOI: http://doi.org/10.1099/jgv.0.001195
- Crosby K., Yatko C., Dersimonian H., Pan L., Edge A.S. A novel monoclonal antibody inhibits the immune response of human cells against porcine cells: identification of a porcine antigen homologous to CD58. *Transplantation*. 2004; 77(8): 1288-94.
 DOI: http://doi.org/10.1097/01.tp.0000120377.57543.d8
- Li X., Yang X., Jiang Y., Liu J. A novel HBV DNA vaccine based on T cell epitopes and its potential therapeutic effect in HBV transgenic mice. *Int. Immunol.* 2005; 17(10): 1293-302.
 DOI: http://doi.org/10.1093/intimm/dxh305

- Oyarzun P., Kobe B. Computer-aided design of T-cell epitope-based vaccines: Addressing population coverage. *Int. J. Immunogenet*. 2015; 42(5): 313-21.
 DOI: http://doi.org/10.1111/jji.12214
- Khan M.A., Hossain M.U., Rakib-Uz-Zaman S.M., Morshed M.N. Epitope-based peptide vaccine design and target site depiction against Ebola viruses: An immunoinformatics study. *Scand. J. Immunol.* 2015; 82(1): 25-34. DOI: http://doi.org/10.1111/sji.12302
- Soria-Guerra R.E., Nieto-Gomez R., Govea-Alonso D.O., Rosales-Mendoza S. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. *J. Biomed. Inform.* 2015; 53: 405-14.
 DOI: http://doi.org/10.1016/j.jbi.2014.11.003
- Chen J., Liu H., Yang J., Chou K.C. Prediction of liniar B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. *Amino Acids*. 2007; 33(3): 423-8.
 DOI: http://doi.org/10.1007/s00726-006-0485-9
- Doytchinova I.A., Flower D.R. VaxiJen: a server for prediction of protective antigens, tumour antigens and subunit vaccines. *BMC Bioinformatics*. 2007; 8: 4.
 DOI: http://doi.org/10.1186/1471-2105-8-4
- Stranzl T., Larsen M.V., Lundegaard C., Nielsen M. NetCTLpan: pan-specific MHC class I epitope predictions. *Immunogenetics*. 2010; 62(6): 357-68.
 DOI: http://doi.org/10.1007/s00251-010-0441-4
- Bui H.H., Sidney J., Li W., Fusseder N., Sette A. Development of an epitope conservancy analysis tool to facilitate the design of epitope-based diagnostics and vaccines. *BMC Bioinformatics*. 2007; 8: 361. DOI: http://doi.org/10.1186/1471-2105-8-361
- Mima K.A., Burmakina G.S., Titov I.A., Malogolovkin A.S. African swine fever virus glycoproteins p54 and CD2v in the context of immune response modulation: bioinformatic analysis of genetic variability and heterogeneity. Sel'skokhozyaystvennaya biologiya. 2015; 50(6): 785-93.
 DOI: http://doi.org/http://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.6.785eng (in Russian)

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

© ФЁДОРОВ А.Ю., ЖИРНОВ О.П., 2020



Метод оценки нейраминидазной активности препаратов RDE с помощью вируса гриппа

Фёдоров А.Ю.^{1, 2}, Жирнов О.П.^{1, 3}

¹ Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия; ² ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Москва, Россия;

³ ООО «Русско-немецкая академия медицинских и биотехнологических наук», Инновационный Центр Сколково, 121205, Москва, Россия

Введение. Для определения уровня противовирусных антител в сыворотках крови людей и животных используют классическую реакцию торможения гемагглютинации (РТГА). При постановке РТГА требуется обработка исследуемых сывороток рецептор-разрушающим ферментом (RDE) для удаления сывороточных гликанов, нарушающих точность реакции РТГА. При использовании препаратов RDE для оптимизации их количества в РТГА необходимо знать их реальную нейраминидазную активность. В настоящей статье разработан простой и экономичный метод тестирования нейраминидазной активности рецептор-разрушающих препаратов с использованием стандартного лабораторного реагентного оснащения и оборудования.

Цель – разработать усовершенствованный простой и удобный метод для оценки активности нейраминидазы с помощью вируса гриппа.

Материал и методы. В основе метода лежит способность нейраминидазы гидролизовать остатки сиаловой кислоты на клеточной поверхности эритроцитов, что лишает эритроциты способности к агглютинации вирусом гриппа, так как именно к этим остаткам прикрепляется вирус, вызывая их агглютинацию.

Результаты и обсуждение. Разработан простой и удобный метод для оценки активности нейраминидазы способом двукратных разведений с эритроцитами человека или животных и последующей инкубацией с вирусом гриппа A для тестирования гемагглютинации.

Заключение. Метод позволяет точно оценить рецептор-разрушающую (нейраминидазную) активность препаратов RDE и сравнить их между собой, что необходимо для оптимизации постановки PTГА при мониторинге сывороток крови животных и людей, больных или переболевших острой респираторной вирусной инфекцией, в том числе гриппом. Разработанный метод может быть включён в регламент методических указаний для постановки PTГА при мониторинге гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций в различных лабораториях.

Ключевые слова: вирус гриппа; РТГА; рецептор-разрушающий фермент, RDE; нейраминидаза; метод.

Для цитирования: Фёдоров А.Ю., Жирнов О.П. Метод оценки нейраминидазной активности препаратов RDE с помощью вируса гриппа. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(2): 113-118. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-113-118.

Для корреспонденции: Жирнов Олег Петрович, д-р биол. наук, проф., член-корр. РАН, руководитель лаборатории вирусного патогенеза Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва. E-mail: zhirnov@inbox.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов: формулирование цели, выполнение экспериментов, написание статьи – Жирнов О.П.; проведение экспериментов, подготовка рисунков – Фёдоров А.Ю.

Поступила 12.03.2020 Принята в печать 31.03.2020

Method for evaluating the neuraminidase activity of receptor-destroying enzyme (RDE) compounds using the influenza virus

Artem Yu. Fedorov 1,2, Oleg P. Zhirnov 1,3

- ¹D.I. Ivanovsky Institute of Virology, National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia;
- ² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991, Russia;
- ³ Russian-German Academy of Medical and Biotechnological Sciences, Skolkovo Innovation Center, Moscow, 121205, Russia

Introduction. The classic hemagglutination inhibition reaction (RTGA) is used to determine the level of antiviral antibodies in human and animal serum specimens. During the performance of RTGA the tested sera must be treated with a receptor-destroying enzyme (RDE) to remove serum glycans that degrade the accuracy of the RTGA results. To optimize the amounts of RDE compounds used, it is necessary to know their real neuraminidase activity. This article describes a simple and economical method for testing the neuraminidase activity of receptor-destroying compounds using standard reagents and laboratory equipment.

Aims of investigation. Design of an improved simple and convenient method for evaluating the neuraminidase activity using the flu virus.

Material and methods. Here, we propose a convenient method for evaluating the activity of neuraminidase by double-fold dilution procedure with human or animal erythrocytes followed by hemagglutination assay with influenza A virus.

Results and discussion. The method is based on the ability of neuraminidase to hydrolyze sialic acid residues on the cell surface of erythrocytes, that deprives red blood cells to be agglutinated with the flu virus, since these sialic glycans provide virus attachment and hemagglutination.

Conclusion. The designed method allows the accurate measurement of the receptor-destroying (neuraminidase) activity of RDE compounds and the comparison of the compounds with each other. This test is necessary to optimize the RTGA protocol when monitoring blood sera of animals and humans after influenza infection and/or Acute Respiratory diseases (ARD). The designed method can be included in the guidelines of regulations for the RTGA protocol, which is used in different laboratories to monitor the epidemic process of influenza and ARD infections.

Keywords: influenza virus; HAI; receptor destroying enzyme, RDE; neuraminidase; method.

For citation: Fedorov A.Yu., Zhirnov O.P. Method for evaluating the neuraminidase activity of receptor-destroying enzyme (RDE) compounds using the influenza virus. *Voprosy Virusologii* (*Problems of Virology*). 2020; 65(2): 113-118. (In Russian).

DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-113-118

For correspondence: Oleg P. Zhirnov, Doctor of Biological Sciences, Professor, Corresponding Member of the RAS, Head of the Laboratory of Viral Pathogenesis of National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia. E-mail: zhirnov@inbox.ru

Information about the authors:

Fedorov A.Yu., https://orcid.org/0000-0001-7503-6444 Zhirnov O.P., https://orcid.org/0000-0002-3192-8405

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Contribution: developed the idea, performed experiments and wrote the text of the article – Zhirnov O.P., performed experiments and took part in figure preparation – Fedorov F.Yu.

Received 12 March 2020 Accepted 31 March 2020

Введение

При осуществлении мониторинга гриппозной инфекции в природе наряду с выделением вирусных штаммов изучают уровень и профиль противовирусных антител в популяциях различных видов животных и у людей, используя классический метод торможения гемагглютинации (РТГА), который был разработан в прошлом столетии [1, 2]. Этот метод широко используется и в настоящее время для определения титров антител в сыворотках крови у различ-

ных хозяев, включая человека, как за рубежом [3], так и в России (Методические указания МУ 3.1.3490-17 «Изучение популяционного иммунитета к гриппу у населения Российской Федерации», утверждены Главным государственным санитарным врачом РФ 27 октября 2017 г.¹; далее – Методические указания МУ 3.1.3490-17),

Для разрушения неспецифических сиалосодержащих гликанов обычно применяют препараты ней-

¹Бюллетень нормативных и методических документов Госсанэпиднадзора. 2018. Вып. 1.

раминидазы, выделенной из нехолерного вибриона, так называемого рецептор-разрушающего фермента (RDE – Receptor Destroying Enzyme), который отщепляет остатки сиаловой кислоты и устраняет интерферирующий эффект неспецифических ингибиторных гликанов [4]. RDE гидролизует сывороточные сиалосодержащие соединения, которые интерферируют с исследуемыми антителами за взаимодействие с тестовым вирусом при постановке РТГА, и тем самым устраняет эффект фальш-торможения, не связанного с действием антител.

Для постановки РТГА требуется тестирование нейраминидазной активности исследуемых препаратов RDE для оптимизации её количества в РТГА. С этой целью обычно применяется колориметрический метод, требующий дорогостоящих специфических субстратов и приборного оснащения. В настоящей работе нами предложен простой и удобный метод оценки активности нейраминидазы, не требующий специальных реактивов и приборов. Метод назван нейраминидазным торможением реакции агглютинации эритроцитов человека вирусом гриппа, поскольку основан на способности вирусной нейраминидазы отщеплять остатки сиаловой кислоты с поверхности эритроцитов и предотвращать их агглютинацию вирусом гриппа.

Материал и методы

Вирусы гриппа. Использовали вирусы гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) и A/WSN/34 (H1N1), которые выращивали на 9-дневных куриных эмбрионах [5].

Препараты рецептор-разрушающего фермента (RDE). Изучали два препарата RDE, полученного из нехолерного вибриона (Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной, Россия; RDEниэм) и культуры холерного вибриона Огава типа 558 (Denka Seiken, Япония; RDEseik).

Рабочий раствор эритроцитов. Использовали свежие образцы крови курицы, морской свинки, кролика, мыши, а также I и III группы крови человека. Эритроциты трижды промывали фосфатным буфером (10 mM Na, HPO $_4$ /NaH, PO $_4$ pH 7,2; 2,7 mM KCl; 137 mM NaCl) (ФБ) при 1000 об/мин в течение 5 мин при 4 °C. Рабочий раствор эритроцитов готовили на ФБ с концентрацией 1% по объёму эритроцитов.

Определение концентрации белка. Для определения концентрации белка в препаратах RDE использовали колориметрический метод Бредфорда [6]. Реакцию ставили в объеме 200 мкл, используя в качестве количественного стандарта сравнения бычий сывороточный альбумин (ICN Pharmaceuticals, США). Реакцию ставили в формате 96-луночных планшетов, в объёме 200 мкл, реакцию регистрировали на спектрофотометре Пикон, модель 136086 (ЗАО «Пикон»; Россия) при длине волны 595 нм [7].

Определение рецептор-разрушающей активности препаратов RDE. Уровень рецептор-разрушающей активности препаратов RDE оценивали с помощью реакции торможения агглютинации эритроцитов посредством нейраминидазного разрушения их рецепторов. Для этого готовили двукратные разведе-

ния исследуемых препаратов RDE (нейраминидазы) в объёме 25 мкл и к полученным разведениям добавляли 25 мкл 1% суспензии эритроцитов определённого вида животных или человека. Приготовленные эритроцитарно-нейраминидазные смеси инкубировали при 37 °C в течение 120 мин. После этого в исследуемые разведения добавляли равный объём вируса гриппа A/Aichi 2/68 (H3N2) либо A/WSN/34 (H1N1) в количестве 8 ГАЕ, смеси перемешивали и планшеты инкубировали при 4 °C в течение 1–2 ч для развития реакции агглютинации эритроцитов вирусом. Исследовали эритроциты I и III групп крови человека, мыши, курицы, кролика, морской свинки. Активность RDE оценивали по её разведению в последней лунке, в которой не наблюдалось гемагглютинации. Положительным считалось последнее разведение, в котором отсутствовала гемагглютинация. Величину рецептор-разрушающей активности препаратов нейраминидазы определяли в рецептор-разрушающих единицах (РРЕ), количество которых равнялось обратному титру последнего разведения, в котором не наблюдалось агглютинации эритроцитов в условиях реакции.

Расчёт нейраминидазной активности. Рецептор-разрушающую активность препаратов RDE учитывали по разведению в последней лунке, в которой не наблюдалось гемагглютинации. Величину рецептор-разрушающей активности препарата нейраминидазы определяли в единицах PPE. Для более точного анализа и учёта реакции использовали параллельные ряды двукратных разведений исследуемого RDE, когда титрование начинали с различного начального разведения: 1:2, 1:3, 1:5.

Определение нейраминидазной активности по гидролизу нейраминидазного субстрата. Для прямого сравнения нейраминидазной активности используемых препаратов RDE оценивали способность расщеплять флуорогенный субстрат нейраминовой кислоты MuNANA (Sigma, США). В качестве стандарта использовали очищенную нейраминидазу холерного вибриона фирмы Behring (Германия), имеющую активность 0,04Е на 1 мкг белка. За единицу активности (Е) принимали отщепление 1 ммоль нейраминовой кислоты от субстрата за 1 мин в условиях используемой реакции. Готовили двукратные разведения препаратов RDE в объёме 120 мкл ФБ, содержащего 0,1 мМ СаС1, добавляли 50 мкл 0,04 мМ раствора MuNANA (2-(4-methylumbelliferyl)-а-D-Nacetylneuraminic acid (Sigma; Cat No. M8639) и инкубировали 60 мин при 37 °C. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл раствора, содержащего 75% этанола и 25 мМ NaOH. Количество отщеплённой нейраминовой кислоты определяли по интенсивности потока флуоресценции 460 нм при возбуждении 360 нм на флуориметре для микропланшетов SynergyTM HT (Bio-Tek Instruments, CIIIA) [8].

Результаты

Во многих вирусологических исследованиях используют препараты RDE, обладающие нейраминидазной активностью, разрушающей клеточные

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

Характеристики рецептор-разрушающей и нейраминидазной активности препаратов RDE Characteristics of receptor-destroying and neuraminidase activity of RDE compounds

Препарат RDE	Титр рецептор-разру-	Концентрация белка в препа-	Специфическая рецептор-раз-	Нейраминидазная активность
Compound	шающей активности ¹	рате, мг/мл2	рушающая активность, PPE/мг ³	препарата, Е/мг ⁴
RDE	Titer of receptor-de-	Protein concentration in the	Specific receptor-destroying	Neuraminidase activity of the
	stroying activity ¹	sample (mg/ml) ²	activity (RDU/mg) ³	sample (U/mg of protein)4
RDЕниэм	1:128	0.037 ± 0.015	3460	31.5
RDEniem				
RDEseik	1:16	0.015 ± 0.003	1067	8,4
RDEseik		.,,		-,

Примечание. ¹Активность RDE титровали методом двукратных разведений с эритроцитами I группы крови человека, как описано в материалах и методах; ² концентрацию белка в препаратах RDE определяли методом Бредфорда, используя в качестве стандарта БСА [7]. Стандартная ошибка величины средней рассчитана в программе Excel по алгоритму Fx=стандотклон.G; ³ специфическую рецептор-разрушающую активность рассчитывали в условных единицах (РРЕ) на 1 мг белка в исследуемом препарате RDE, как описано в материалах и методах; ⁴ нейраминидазную активность препаратов определяли прямым флуориметрическим методом с субстратом нейраминовой кислоты MuNANA, как описано в материалах и методах (см. рис. 2). В качестве препарата сравнения использовали очищенную нейраминидазу холерного вибриона фирмы Веhring (Германия), имеющую активность 40E на 1 мг белка.

*Note.*¹ Titration of RDE activity was performed by double dilution procedure with human red blood cells of group 1, as described in the materials and methods; ² the protein concentration in RDE compounds was determined by the Bradford method, using the BSA standard [7]. The standard deviation error was calculated in the Excel program using the Fx=standdeviation algorithm.G; ³ specific receptor-destroying activity was calculated in arbitrary units (receptor destroying units; RDU) per mg of protein in the analyzed RDE compounds, as described in the materials and methods; ⁴ the neuraminidase activity of the analyzed compounds was determined by direct fluorimetric method with a fluorogenic substrate of neuraminic acid MuNANA, as described in the materials and methods (see Fig.2). As a comparison drug, we used purified neuraminidase compound of a cholera Vibrio from Behring (Germany), which has the activity of 40 U per mg of protein.

гликопротеидные рецепторы. Наиболее часто применяют нейраминидазу при определении титров противогриппозных антител в сыворотках человека и животных методом РТГА [1–3]. В этом методе RDE используется для удаления неспецифических гликанов сыворотки, содержащих остатки сиаловой кислоты, которые мешают определению точных титров вирус-специфических антител, так как нарушают взаимодействие референс-вируса и эритроцитов, на котором основан тест РТГА.

В работе проводили сравнительное исследование двух нейраминидазных препаратов (RDE) производства РФ и Японии. Для оценки уровня рецептор-разрушающей активности готовили двукратные разведения исследуемых препаратов нейраминидазы в объёме 25 мкл и к полученным разведениям добавляли 25 мкл 1% суспензии эритроцитов определённого вида животных, а также человека. Приготовленные эритроцитарно-нейраминидазные смеси инкубировали при 37 °C в течение 120 мин для удаления сиаловых рецепторов на поверхности эритроцитов. После этого в исследуемые разведения добавляли равный объём вируса гриппа A/Aichi 2/68 (H3N2) либо A/ WSN/34 (H1N1) в количестве 8 ГАЕ, смеси перемешивали и планшеты инкубировали при 4 °C в течение 1 ч для развития реакции агглютинации эритроцитов вирусом.

Результаты тестирования рецептор-разрушающей активности препаратов RDE с эритроцитами I и III группы крови человека показаны на рис. 1. Приводятся ряды двукратных разведений RDE, с которыми последовательно инкубировали эритроциты и вирус гриппа А. Как видно, эритроциты после обработки RDE теряли способность агглютинироваться вирусом гриппа А. Уровень активности RDE оценивали по последнему разведению, при котором ещё не происходило агглютинации эритроцитов. Как показано на рис. 1, последними без агглютинации были лун-

ки 6 и 3 для российского и японского препаратов RDE, что соответствовало разведениям 1:128 и 1:32 соответственно. Величину рецептор-разрушающей активности препаратов нейраминидазы определяли в PPE по последнему разведению, в котором не наблюдалось агглютинации эритроцитов в условиях реакции (см. таблицу).

Для более точного сравнения активности препаратов RDE определяли специфическую нейраминидазную активность методом прямой колориметрической реакции в расчёте на количество белка в препарате. С этой целью использовали метод Бредфорда и флуоресцентный метод прямого определения нейраминидазной активности. Результаты типичного эксперимента по определению удельной нейраминидазной активности приведены в таблице и на рис. 2. Удельная RDE активность составляла 3,5 и 1,1 PPE на 1 мкг белка у российского и японского препаратов соответственно, что хорошо коррелировало с величинами нейраминидазной активности, полученными прямым измерением по расщеплению нейраминидазного субстрата (см. рис. 2). Эти наблюдения подтверждают достоверность предложенного метода оценки RDE с помощью вируса гриппа и позволяют сделать вывод о высокой активности RDE российского препарата, что позволяет брать меньшее белковое количество RDEниэм по сравнению с препаратом RDEseik для обработки сывороток крови при постановке РТГА.

Обсуждение

В настоящей работе предложен простой метод оценки нейраминидазной активности препаратов RDE с использованием эритроцитов человека и лабораторного вируса гриппа А. В основе метода лежит способность нейраминидазы гидролизовать остатки сиаловой кислоты на клеточной поверхности эритроцитов разных видов животных и человека. Такое удаление сиаловой кислоты лишает эритроциты способности

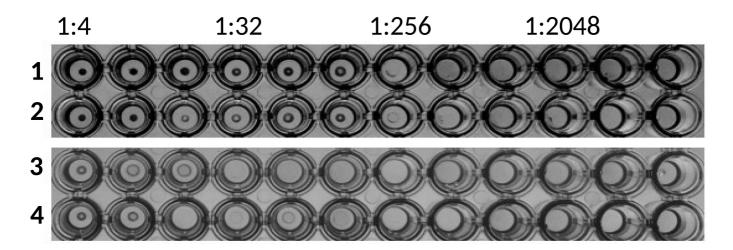


Рис. 1. Определение активности препаратов RDE методом нейраминидазного торможения реакции гемагглютинации вирусом гриппа. Двукратные разведения препаратов RDE инкубировали с 1% суспензией эритроцитов человека I (ряды 1, 3) и III (2, 4) группы крови. Полученные смеси инкубировали 90 мин при 37 °C и в смеси вносили 8 ГАЕ вируса A/Aichi/2/68 (H3N2) либо A/WSN/34 (H1N1) и инкубировали 2 ч при 4 °C. Планшеты фотографировали при дневном свете.

Fig. 1. Determination of the activity of RDE compounds by neuraminidase activity inhibition in the reaction of hemagglutination by the influenza virus.

Two-fold dilutions of RDE compounds were prepared, which were incubated with a 1% suspension of human red blood cells of group 1 (rows 1, 3) and group 3 (2, 4). Then, the resulting mixtures were incubated for 90 minutes at 37 °C and 8 HAE of A/Aichi/2/68 (H3N2) or A/WSN/34 (H1N1) viruses were added to the mixture and incubated for 2 hours at 4 °C. The plates were photographed under day light.

к агглютинации вирусом гриппа человека, так как именно к этим остаткам прикрепляется вирус, вызывая их агглютинации в мультиклеточные комплексы (так называемая гемагглютинация). Метод позволяет оценить рецептор-разрушающую (нейраминидазную) активность препаратов RDE и сравнить их между собой, что бывает необходимо для оптимизации постановки РТГА при мониторинге сывороток крови животных и людей, больных или переболевших гриппозной инфекцией. По сравнению с биохимическим колориметрическим тестированием со специфическим субстратом предлагаемый метод обладает рядом достоинств. К таковым относятся простота методики, отсутствие в протоколе исследования дорогостоящих реагентов и приборов, необходимость простого лабораторного инструментария и возможность выполнения в любой биохимической лаборатории.

Утверждён технический регламент постановки РТГА для определения титров антивирусных антител в сыворотках крови людей при различных заболеваниях гриппом и сходными инфекциями (Методические указания МУ 3.1.3490-17). В сельском хозяйстве реакция РТГА широко применяется для изучения инфицированных сельскохозяйственных животных и птиц актуальными вирусами гриппа H5N1, H7N5, H9N2, H5N8 и др. В указанном регламенте прописан этап обработки исследуемых сывороток препаратом RDE для удаления неспецифических сиалосодержащих ингибиторов (приложение № 2 к Методическим указаниям МУ 3.1.3490-17). Однако в нём отсутствует методика тестирования и стандартизации этого фермента на этапе обработки сывороток RDE при постановке РТГА. Учитывая важность обработки исследуемых сывороток данным ферментом, регламент может быть дополнен настоящим тестом на активность фермента RDE, что будет способствовать более точному определению титров антивирусных антител в исследуемых сыворотках крови человека и животных и повышению оптимизации стандарта применения РТГА в различных лабораториях. Для обработки сыворотки крови животных или человека при постановке РТГА в качестве базового режима можно рекомендовать применение не менее 10 РРЕ на 1 мл обрабатываемого разведения сыворотки при инкубации в течение 60–120 мин при 37 °C.

Заслуживает внимания выбор эритроцитов для использования в предлагаемом методе. При изучении препаратов RDE наиболее стабильные и воспроизводимые результаты получены с эритроцитами человека. Эритроциты кролика оказались непригодными, так как не агглютинировались использованными вирусами гриппа А. Результаты, полученные с эритроцитами морской свинки, курицы и мыши оказались менее воспроизводимыми. Эритроциты данных видов проявляли повышенную резистентность к действию RDE и требовали более продолжительной инкубации для полного гидролиза сиаловых рецепторов, что усложняло методику и снижало точность определения. Обнаруженный феномен вариабельности в чувствительности к RDE у эритроцитов различных животных, вероятно, обусловлен различиями как в соотношении N- или О-гликановых рецепторов, обладающих связью типа α2-3 и/или α2-6 галактозы (или ацетилгалактозамина) с остатками N-ацетил-нейраминовой кислоты, так и в стерической доступности самих рецепторов для RDE на поверхности эритроцитов раз-

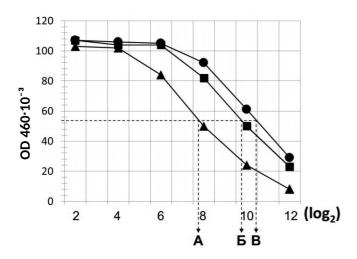


Рис. 2. Определение нейраминидазной активности препаратов RDE прямым колориметрическим методом с флуоресцентным субстратом.

Готовили четырёхкратные разведения препаратов RDE с начальной концентрацией белка 500 нг/мл для каждого исследуемого препарата: seik (▲), ниэм (■) и Behring (●). В каждое разведение вносили флуорогенный субстрат MuNANA, инкубировали 60 мин и определяли интенсивность флуоресценции при 460 нм (ось ординат), как описано в методах. По оси абсцисс откладывали двоичный логарифм величины обратного разведения препаратов RDE. Специфическую активность препаратов рассчитывали посредством сравнения количества белка в пробе на уровне 50% интенсивности ОD460 (горизонтальная линия), принимая в качестве стандарта сравнения RDEbehring, имеющей известную нейраминидазную активность 40E на 1 мг белка (проба А). Препараты RDEниэм (Б) и RDEseik (В) имели нейраминидазную активность 31,5 и 8,5 Е/мг соответственно.

Fig. 2. Determination of neuraminidase activity of RDE compounds by direct calorimetric method with a fluorescent substrate.

Four-fold dilutions of RDE compounds were prepared, with an initial protein concentration of 500 ng/ml for each tested drug: seiken (▲), niem (■), and behring (●). A fluorogenic MuNANA substrate was added to each dilution, incubated for 60 minutes, and the fluorescence intensity was determined at 460 nm (ordinate axis), as described in the methods. The binary logarithm of the reverse dilution of RDE compounds was outlined at the abscissa axis. The specific activity of the drugs was calculated by comparing the amount of protein in the sample at the level of 50% of the OD460 intensity (horizontal line), using the RDE/behring as a comparison standard, which has a known neuraminidase activity of 40U per mg of protein (sample A). The RDE compounds giem (B) and seiken (C) had 31.5 and 8.5 U/mg, respectively.

личного происхождения [9, 10]. С учётом полученных результатов можно рекомендовать эритроциты человека как наиболее подходящие для предлагаемого теста нейраминидазного торможения гемагглютинации.

Заключение

Предложен простой метод оценки нейраминидазной активности препаратов RDE с использованием эритроцитов человека и лабораторного вируса гриппа А. В основе метода лежит способность нейраминидазы отщеплять остатки сиаловой кислоты на клеточной поверхности эритроцитов разных видов животных и человека, что лишает эритроциты способности

к агглютинации вирусом гриппа человека. Метод позволяет оценить рецептор-разрушающую (нейраминидазную) активность препаратов RDE и сравнить их между собой, что бывает необходимо для оптимизации постановки РТГА при мониторинге сывороток крови животных и людей, больных или переболевших гриппозной инфекцией. Метод прост в исполнении, не требует дорогих реагентов и оборудования и доступен для любой вирусологической лаборатории.

Благодарность. Авторы выражают благодарность проф. Е.И. Бурцевой и проф. Е.И. Исаевой из Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва) и канд. биол. наук С.Н. Норкиной из Научно-производственного объединения «НАРВАК» (Москва) за полезное обсуждение работы, а также А.И. Чернышову из ФГА-ОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России за техническую помощь.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-4, 6-10 см. REFERENCES)

Жирнов О.П. Биохимические вариации цитолитического действия ортомиксо- и парамиксовирусов в культуре клеток из легочной опухоли человека. Биохимия. 2017; 82(9): 1345-53.

REFERENCES

- Hirst G.K. The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. *J. Exp. Med.* 1942; 75(1): 49-64.
 - DOI: http://doi.org/10.1084/jem.75.1.49
- Salk J.E. Simplified procedure for titrating hemagglutinating capacity of influenza virus and the corresponding antibody. J. Immunol. 1944; 49(2): 87-98.
- Liebowitz D., Gottlieb K., Kolhatkar N.S., Garg S.J., Asher J.M., Nazareno J., et al. Efficacy, immunogenicity, and safety of an oral influenza vaccine: a placebo-controlled and active-controlled phase 2 human challenge study. *Lancet Infect. Dis.* 2020; 20(4): 435-44. DOI: http://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30584-5
- Burnett F.M., Stone J.D. The receptor destroying enzyme of Vibrio Cholerae. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 1947; 25: 227-33.
- Zhirnov O.P. Biochemical variations in cytolytic activity of ortho- and paramyxoviruses in human lung tumor cell culture. *Biochemistry (Mosc)*. 2017; 82(9): 1048-54. DOI: http://doi.org/10.1134/S0006297917090085
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72(1-2): 248-54.
 DOI: http://doi.org/10.1006/abio.1976.9999
- Ernst O., Zor T. Linearization of the Bradford protein assay. *J. Vis. Exp.* 2010; (38): pii 1918.
 DOI: http://doi.org/10.3791/1918
- Leang S.K., Hurt A.C. Fluorescence-based neuraminidase inhibition assay to assess the susceptibility of influenza viruses to the neuraminidase inhibitor class of antivirals. *J. Vis. Exp.* 2017; (122): e55570.

DOI: http://doi.org/10.3791/55570

- Viswanathan K., Chandrasekaran A., Srinivasan A., Raman R., Sasisekharan V., Sasisekharan R. Glycans as receptors for influenza pathogenesis. *Glycoconj J.* 2010; 27(6): 561-70. DOI: http://doi.org/10.1007/s10719-010-9303-4
- Mayr J., Lau K., Lai J.C.C., Gagarinov I.A., Shi Y., McAtamney S., et al. Unravelling the role of o-glycans in influenza a virus infection. Sci. Rep. 2018; 8(1): 16382.
 DOI: http://doi.org/10.1038/s41598-018-34175-3

РЕЦЕНЗИИ

© ГРЕБЕННИКОВА Т.В., 2020

Ф.И. Ершов. **История вирусологии от Д.И. Ивановского до наших дней.** — М.: ГЭОТАР-Медиа; 2020.

Книга академика РАН Ф.И. Ершова посвящена истории открытия вирусов великим отечественным учёным Д.И. Ивановским, а также становлению и развитию вирусологии от первых шагов до настоящего времени. Это первая книга по истории вирусологии, которая, по странному стечению обстоятельств, появилась на свет как раз в период очередной пандемии.

За 128 лет вирусы изучены достаточно глубоко, а вирусология превратилась в междисциплинарную область знаний, широко применяющую методы химии, микробиологии, цитологии, биофизики, генетики, молекулярной биологии и других дисциплин. Однако, несмотря на выдающиеся достижения этой науки, вирусные инфекции остаются причиной тяжёлых заболеваний во всём мире. С этой точки зрения очень интересны изложенная Ф.И. Ершовым историческая последовательность открытия вирусов растений, животных, человека, описание эволюции вирусологических методов исследования, данные о строении и закономерностях репродукции вирусов и др.

Вирусы и их значение для человечества представлены в книге с разных сторон. Все данные можно разделить на две части: первая («вирусы – враги») посвящена роли вирусов в патологии всего живого (человека, животных, растений и бактерий) и разработке

способов борьбы с вирусными инфекциями; вторая часть («вирусы – друзья») рассказывает, как используют вирусы для познания сущности жизни, в ней также представлены исследования выдающейся роли вирусов в эволюции органического мира. Именно вирусы послужили пробным камнем для расшифровки таких понятий, как живое и неживое, часть и целое, форма и функция. В этом заключена великая позитивная роль вирусов.

Особо следует отметить, что, будучи первой книгой по истории вирусологии, книга Ф.И. Ершова отвечает всем основным канонам научно-популярной литературы – по форме и стилю изложения научных фактов.

Книга рассчитана на широкий круг читателей, интересующихся вирусами, а также может быть использована как учебное пособие студентами медицинских и педагогических вузов, учителями биологии и врачами различных медицинских специальностей. Из книги читатели получат ценную информацию не только об истории вирусологии, но и о современном состоянии этой науки.

Заведующая отделом ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» доктор биол. наук, профессор, член-корреспондент РАН **Т.В. Гребенникова**

НЕКРОЛОГ

Памяти Петра Григорьевича Дерябина

(09.06.1947-25.04.2020)



25 апреля 2020 г. на 73-м году после тяжёлой продолжительной болезни ушёл из жизни заслуженный деятель науки РФ, профессор, доктор медицинских наук Пётр Григорьевич Дерябин.

П.Г. Дерябин – широко известный вирусолог, внёсший весомый вклад в развитие отечественной вирусологии, родился в Ставропольском крае, с. Птичье, в 1971 г. окончил санитарно-гигиенический факультет Минского медицинского института и был направлен в целевую аспирантуру в Институт вирусологии им Д.И. Ивановского АМН СССР. С тех пор вся его научная деятельность была связана с Институтом вирусологии им. Д.И. Ивановского, начиная с должности младшего научного сотрудника и заканчивая заместителем директора. За этот период он защитил кандидатскую и докторскую диссертации, получил звание профессора и заслуженного деятеля науки РФ. Приоритетные результаты вирусологических исследований П.Г. Дерябина отражены в многочисленных научных отечественных и зарубежных публикациях и патентах, посвящённых решению актуальных проблем, связанных с изучением арбовирусных инфекций, вирусных гепатитов, гриппа, разработкой противовирусных препаратов и вакцин.

П.Г. Дерябин был автором более 200 научных обзоров и публикаций, известным специалистом в области репродукции и генетики флави- и ортомиксовирусов, а также механизмов вирусной персистенции, создателем новых диагностических и противовирусных препаратов, защищённых 15 патентами на изобретения.

За научные достижения Пётр Григорьевич удостоен Государственной премии в области науки и техники, был дважды лауреатом премии им. Д.И. Ивановского Президиума РАМН, награждён дипломом Роспатента «100 лучших изобретений России за 2011 г.» за лучший патент РФ в области вирусологии, а также почётной грамотой Президиума РАМН.

Будучи заместителем директора Института вирусологии им. Д.И. Ивановского, П.Г. Дерябин возглавлял лабораторию Государственной коллекции вирусов, которая благодаря его усилиям стала образцовой и функционирует на уровне международных стандартов.

П.Г. Дерябин сочетал в себе научные и организаторские способности координировать ряд научных направлений. Уникальным свойством Петра Григорьевича была способность сочетать научные разработки и научное руководство с личным проведением исследований.

В течение многих лет Π . Γ . Дерябин был заместителем главного редактора журнала «Вопросы вирусологии».

Уход из жизни этого великого учёного – большая, невосполнимая утрата для всех, кто с ним работал и сотрудничал. Имя П.Г. Дерябина навсегда останется в истории НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского и отечественной вирусологической науки. А светлая память о нём сохранится в сердцах его друзей, коллег и учеников.

Редколлегия журнала «Вопросы вирусологии»