

Журнал представлен в международных базах данных и информационно-справочных системах: 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.

Полные тексты статей журнала доступны на сайтах:  
<https://www.microbiol.elpub.ru/>;  
<https://www.elibrary.ru/>;  
<https://www.cyberleninka.ru/>;  
<https://www.rucont.ru>

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

Точка зрения авторов может не совпадать с мнением редакции.

#### ИЗДАТЕЛЬ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии  
Роспотребнадзора  
197101, Москва, ул. Новогиреевская,  
д. 3А.  
Тел.: +7(925) 011-87-79.

Заведующая редакцией  
*Курушина Тамара Михайловна*  
E-mail: [vopr.virusol@mail.ru](mailto:vopr.virusol@mail.ru)

Графика и верстка:  
*Е.М. Архипова*

Ответственность за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах, несут рекламодатели. Направляя статью в редакцию, авторы принимают условия договора публичной оферты (<https://virusjour.elpub.ru/jour>).

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.

3

Том 65 · 2020

## Редакционная коллегия

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

Зам. главного редактора: **Гребенникова Т.В.** (д.б.н., проф., член-корр. РАН)

Ответственный секретарь: **Альховский С.В.** (д.б.н.)

Научный редактор: **Забережный А.Д.** (д.б.н., проф., член-корр. РАН)

### Члены редколлегии:

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., член-корр. РАН; Сергиев Посад, Россия)

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

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

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

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

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

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

**Иванов А.И.** (Хабаровск, Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Романенко В.В.** (д.м.н.; Екатеринбург, Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Яшкулов К.Б.** (к.м.н., Элиста, Россия)

## МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# VOPROSY VIROLOGII

PROBLEMS OF VIROLOGY (Russian Journal)

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

## Volume 65 • 3 • 2020

### EDITORIAL BOARD

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

Assistant editors in chief: **Grebennikova T.V.**, Doctor of Biological Sciences, Professor,  
Corresponding Member of RAS

Executive secretary: **Al'khovskiy S.V.**, Doctor of Biological Sciences

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

### MEMBERS OF EDITORIAL BOARD

**Barinskiy I.F.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Belousova R.V.** – Doctor of Veterinary Sciences, Prof.; **Galegov G.A.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.; **Gulyukin M.I.** – Doctor of Veterinary Sciences, Prof., Academician of RAS; **Gurtsevich V.E.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Ershov F.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Zhirnov O.P.** – Doctor of Biological Sciences, Prof., Corresponding Member of RAS; **Zverev V.V.** – Doctor of Biological Sciences, Prof., Academician of RAS; **Zuev V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Ivanova O.E.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Karganova G.G.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.; **Kolobukhina L.V.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Lobzin Yu.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Maleev V.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Onishchenko G.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Popova A.Yu.** – MD, PhD, DSc, Prof., Chief Sanitary Doctor of the Russian Federation; **Uryvaev L.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., Corresponding Member of RAS; **Yuminova N.V.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.

### EDITORIAL COUNCIL

**Akimkin V.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)  
**Aliper T.I.** – Sc.D., Prof. (Moscow, Russia)  
**Antonov V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Volgograd, Russia)  
**Bovin N.V.** – Sc.D., Prof. (Moscow, Russia)  
**Borisevich S.V.** – Sc.D., Prof., Corr. Member of RAS (Sergiev Posad, Russia)  
**Briko N.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)  
**Vasin A.V.** – Sc.D. (Saint-Petersburg, Russia)  
**Glotov A.G.** – Sc.D., Prof. (Krasnoobsk, Russia)  
**Glupov V.V.** – Sc.D., Prof. (Novosibirsk, Russia)  
**Zasedatelev A.S.** – Doctor of physical, Prof. (Moscow, Russia)  
**Zlobin V.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Irkutsk, Russia)  
**Ivanov L.I.** – MD (Khabarovsk, Russia)  
**Korzaya L.I.** – MD, PhD, DSc (Sochi, Russia)  
**Kuzin A.A.** – MD, PhD, DSc (St. Petersburg, Russia)  
**Kutyrev V.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Saratov, Russia)  
**Leonova G.N.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Vladivostok, Russia)  
**Loktev V.B.** – Sc.D., Prof. (Novosibirsk, Russia)  
**Lukashev A.N.** – MD, PhD, DSc, Prof., Corr. Member of RAS (Moscow, Russia)  
**Makarov V.V.** – Sc.D., Prof. (Moscow, Russia)  
**Malyshev N.A.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Moscow, Russia)

**Manapova E.R.** – MD, PhD, DSc (Kazan, Russia)  
**Mikhaylov M.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Corr. Member of RAS (Moscow, Russia)  
**Netesov S.V.** – Sc.D., Prof., Corr. Member of RAS (Novosibirsk, Russia)  
**Nikiforov V.V.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Moscow, Russia)  
**Panin A.N.** – Sc.D., Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)  
**Pokrovskiy A.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Corr. Member of RAS (Novosibirsk, Russia)  
**Pokrovskiy V.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)  
**Reznik V.I.** – MD, PhD (Khabarovsk, Russia)  
**Romanenko V.V.** – MD, PhD, DSc (Ekaterinburg, Russia)  
**Savel'ev S.I.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Lipetsk, Russia)  
**Smetanina S.V.** – PhD (Moscow, Russia)  
**Stepanova T.F.** – MD, PhD, DSc, Prof. (Tyumen, Russia)  
**Tutel'yan A.V.** – MD, PhD, DSc, Prof., Corr. Member of RAS (Moscow, Russia)  
**Chvala I.A.** – PhD (Vladimir, Russia)  
**Chumakov P.M.** – Sc.D., Prof., Corr. Member of RAS (Moscow, Russia)  
**Chuchalin A.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)  
**Shestopalov A.M.** – Sc.D., Prof. (Novosibirsk, Russia)  
**Shchelkanov M.Yu.** – Sc.D, Prof. (Vladivostok, Russia)  
**Yashkulov K.B.** – MD, PhD (Elista, Russia)

### INTERNATIONAL EDITORIAL COUNCIL

**Becker J.** (PhD, MD, Prof.; Jerusalem, Israel)  
**Compans R.W.** (PhD, Prof.; Atlanta, USA)  
**Fouchier R.A.M.** (PhD, Prof.; Rotterdam, Netherlands)  
**Goujgoulova G.** (PhD; Sofia, Bulgaria)  
**Hoenen T.** (PhD; Greifswald - Insel Riems, Germany)  
**Kawaoka Y.** (PhD, Prof.; Tokyo, Japan)  
**Klenk H.D.** (PhD, Prof.; Marburg, Germany)  
**Kuhn J.H.** (MD, PhD, 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

**Сергеев О.В., Бошняк Р.Е., Баринский И.Ф.**

Высокопродуктивное секвенирование в диагностике и профилактике инфекции простого герпеса (*Herpesviridae, Alphaherpesvirinae, Simplexvirus, Human alphaherpesvirus 1*) ..... 126

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Алаторцева Г.И., Доценко В.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Кабаргина В.Ю., Амиантова И.И., Жукина М.В., Жаворонок С.В., Нурматов З.Ш., Нурматов А.З., Зверев В.В.**

Тест-система для выявления IgG-антител к вирусу гепатита E (*Hepeviridae, Orthohepevirus, Orthohepevirus A*) методом линейного иммуноанализа ..... 132

**Никишов О.Н., Кузин А.А., Зобов А.Е., Лаврентьева И.Н., Антипова А.Ю., Останкова Ю.В., Хамитова И.В., Никишов С.Н.**

Результаты исследования распространённости и активности циркуляции парвовируса B19 (*Parvoviridae, Parvovirinae, Erythroparvovirus, Primate erythroparvovirus 1*) среди социально значимых категорий населения ..... 143

**Фалынскова И.Н., Егоров А.Ю., Поддубиков А.В., Варманова Н.О., Карташова Н.П., Глубокова Е.А., Мхитаров В.А., Джалилова Д.Ш., Макарова О.В., Ленева И.А.**

Эффект вакцинации вирусоподобными частицами, экспрессирующими гемагглютинин, на развитие постгриппозной бактериальной пневмонии у мышей: патоморфологические, вирусологические, микробиологические и клинические данные. .... 150

**Марченко В.А., Барашкова С.В., Зелинская И.А., Торопова Я.Г., Сорокин Е.В., Жилинская И.Н.**

Моделирование гриппозной инфекции у половозрелых крыс стока Wistar ..... 159

## ДИСКУССИЯ

**Гайсёнок О.В.**

Применение ингибиторов вирусных РНК-полимераз в сочетании с ингибитором фузии в лечении пациентов с COVID-19: гипотеза ..... 167

## НЕКРОЛОГ

Памяти Виталия Александровича Сергеева (01.05.1927–14.06.2020). .... 176

## CONTENTS

## REVIEWS

**Sergeyev O.V., Bosh'ian R.E., Barinsky I.F.**

High-throughput sequencing in diagnostics and prevention of herpes simplex virus infection  
(*Herpesviridae, Alphaherpesvirinae, Simplexvirus, Human alphaherpesvirus 1*) ..... 126

## ORIGINAL RESEARCH

**Alatortseva G.I., Dotsenko V.V., Nesterenko L.N., Luhverchik L.N., Kabargina V.Yu., Amiantova I.I., Zhukina M.V., Zhavoronok S.V., Nurmatov Z.S., Nurmatov A.Z., Zverev V.V.**

Line immunoassay for detection of IgG antibodies for hepatitis virus E (*Hepeviridae, Orthohepevirus, Orthohepevirus A*) ..... 132

**Nikishov O.N., Kuzin A.A., Zobov A.E., Lavrentieva I.N., Antipova A.Yu., Ostankova Yu.V., Khamitova I.V., Nikishov S.N.**

Results of a study of parvovirus B19 (*Parvoviridae, Parvovirinae, Erythroparvovirus, Primate erythroparvovirus 1*) prevalence and circulation activity in socially significant categories of the population ..... 143

**Falynskova I.N., Egorov A.Yu., Poddubikov A.V., Vartanova N. O., Kartashova N.P., Glubokova E.A., Mkhitarov V.A., Dzhililova D.S., Makarova O.V., Leneva I.A.**

Vaccination with virus-like particles containing hemagglutinin protects the lungs of mice with postinfluenza bacterial pneumonia: virological, microbiological and clinical data ..... 150

**Marchenko V.A., Barashkova S.V., Zelinskaya I.A., Toropova Ya. G., Sorokin E.V., Zhilinskaya I.N.**

Modeling influenza virus infection in mature Wistar rats ..... 159

## DISCUSSION

**Gaisenok O.V.**

The use of viral RNA polymerase inhibitors in combination with a fusion inhibitor in the treatment of patients with COVID-19: hypothesis ..... 167

## OBITUARY

In memory of Vitaliy A. Sergeev (01.05.1927–14.06.2020) ..... 176

## ОБЗОРЫ



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

**Высокопродуктивное секвенирование в диагностике и профилактике инфекции простого герпеса (*Herpesviridae*, *Alphaherpesvirinae*, *Simplexvirus*, *Human alphaherpesvirus 1*)**Сергеев О.В.<sup>1</sup>, Бошнян Р.Е.<sup>1</sup>, Баринский И.Ф.<sup>2</sup><sup>1</sup> ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия;<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия

Вирусы простого герпеса (ВПГ) 1-го (ВПГ-1) и 2-го (ВПГ-2) типа относятся к числу наиболее распространённых в человеческой популяции. Клинические проявления простого герпеса широко варьируют, что обуславливает необходимость разработки надёжных молекулярных методов для своевременной диагностики герпесвирусной инфекции, а также для обнаружения мутаций в генах, отвечающих за лекарственную устойчивость. Применение ПЦР часто неспособно идентифицировать изоляты ВПГ с заменами нуклеотидов в участке связывания праймеров. Полногеномное секвенирование по Сэнгеру выявляет мутации в основном на консенсусном уровне, они накапливаются уже на продвинутой стадии вирусной инфекции. Высокопродуктивное секвенирование (секвенирование следующего поколения) имеет явные преимущества как в ранней диагностике герпесвирусной инфекции, так и в идентификации вариантов ВПГ.

**Ключевые слова:** вирус простого герпеса; молекулярная диагностика; геном; варибельность; высокопродуктивное секвенирование; HTS; секвенирование следующего поколения; полногеномное секвенирование; ПЦР; метагеномный анализ.

**Для цитирования:** Сергеев О.В., Бошнян Р.Е., Баринский И.Ф. Высокопродуктивное секвенирование в диагностике и профилактике инфекции простого герпеса (*Herpesviridae*, *Alphaherpesvirinae*, *Simplexvirus*, *Human alphaherpesvirus 1*). *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(3): 126-131. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-126-131>

**Для корреспонденции:** Сергеев Олег Витальевич, д-р биол. наук, проф. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва. E-mail: [osergeyev123@gmail.com](mailto:osergeyev123@gmail.com)

**Участие авторов:** все авторы в равной мере участвовали в выработке концепции обзорной статьи и её написании. **Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

Поступила 02.03.2020

Принята в печать 18.03.2020

**High-throughput sequencing in diagnostics and prevention of herpes simplex virus infection (*Herpesviridae*, *Alphaherpesvirinae*, *Simplexvirus*, *Human alphaherpesvirus 1*)**Oleg V. Sergeev<sup>1</sup>, Roman E. Bosh'ian<sup>1</sup>, Igor F. Barinsky<sup>2</sup><sup>1</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119991, Russia;<sup>2</sup> National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia

Herpes simplex viruses types 1 (HSV-1) and 2 (HSV-2) are among the most common viruses in the human population. The clinical manifestations of HSV infection vary widely, which necessitates reliable molecular methods for the timely diagnosis of herpes virus infection, as well as for detection of mutations in the genes responsible for drug resistance. PCR is often unable to detect HSV isolates with nucleotide substitutions at the primer binding site. Sanger sequencing of the whole genome reveals mutations mainly at the consensus level, which accumulate at advanced stages of viral infection. High-throughput sequencing (HTS, next generation sequencing) offers an obvious advantage both in early diagnosis of herpes virus infection and identification of HSV variants.

**Keywords:** herpes simplex virus; molecular diagnostics; genome; variability; high-throughput sequencing; HTS; next generation sequencing; whole genome sequencing; PCR; metagenomics.

**For citation:** Sergeyev O.V., Bosh'ian R.E., Barinsky I.F. High-throughput sequencing in diagnostics and prevention of herpes simplex virus infection (*Herpesviridae, Alphaherpesvirinae, Simplexvirus, Human alphaherpesvirus 1*). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology)*. 2020; 65(3): 126-131. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-126-131>

**For correspondence:** Oleg V. Sergeyev, Doct. Sci. (Biol.), Professor at the Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119991, Russia. E-mail: [osergeyev123@gmail.com](mailto:osergeyev123@gmail.com)

**Information about the authors:**

Sergeyev O.V., <https://orcid.org/0000-0003-3407-2224>

Bosh'ian R.E., <https://orcid.org/0000-0003-4789-4964>

Barinsky I.F., <https://orcid.org/0000-0002-9909-3598>

**Contribution:** all the authors have equally contributed to the development of the review article concept and to the writing of the article.

**Acknowledgment.** The review article presented has had no financial support.

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

Received 02 March 2020

Accepted 18 March 2020

По данным ВОЗ на 2017 г., из 6 млрд населения земли 3 млрд 700 млн человек были инфицированы вирусом простого герпеса (ВПГ). Статистические исследования, проводимые ВОЗ и опубликованные в 2016 г., показали, что в структуре инфекций, передаваемых половым путём, генитальный герпес продолжает занимать одно из ведущих мест. В 10–20% случаев генитальный герпес имеет рецидивирующее течение, что является серьёзной медико-социальной проблемой здравоохранения. Рецидивы генитального герпеса наблюдаются в течение последующего года у 90% больных, заражённых вирусом простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2), и у 60% инфицированных вирусом простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1). В России число только госпитализированных с диагнозом «герпетическая инфекция» ежегодно превышает 2,5 млн человек. Герпесвирусные инфекции роговой оболочки глаза отмечены у 900 тыс. человек. Герпесвирусная этиология также прослеживается у 10% больных энцефалитом [1, 2].

### Ранняя диагностика вируса простого герпеса

Семейство *Herpesviridae* включает свыше 200 вирусов, поражающих разных животных. Общей характеристикой герпесвирусов является их способность вызывать пожизненную медленно текущую или латентную инфекцию в организме хозяина. При латентной инфекции зрелые вирионы не формируются, а продуктами транскрипции являются несколько РНК продуктов, ассоциированных с латенцией [3].

ВПГ-1 и -2 входят в подсемейство *Alphaherpesvirinae*. Для них характерны быстрый инфекционный цикл в культуре клеток и латентная инфекция в нейронах, прежде всего в сенсорных ганглиях [1, 2]. Этот признак является критическим в стратегии выживания вируса и осложняет диагностику ВПГ, так как латентно инфицированные клетки служат резервуаром для периодической реактивации и распространения вируса.

Инфекция простого герпеса начинается на поверхности эпителия или слизистой. Она может быть симптоматической или асимптоматической в зависимости от иммунного статуса хозяина и других факторов.

Первичная инфекция приводит к проникновению вируса в сенсорные или симпатические нейроны, которые иннервируют поверхность эпителия. В периферийной нервной системе устанавливается латентное состояние. Точный механизм перехода вируса из эпителия в нервные клетки неясен. После реактивации в нервной ткани вирус может перемещаться по нервному тракту обратно в эпителиальные клетки, вызывая повреждение тканей и инфицирование новых хозяев [4].

Высокопродуктивное секвенирование (англ. high-throughput sequencing, HTS), или секвенирование следующего поколения (англ. next generation sequencing), произвело революцию в исследовании и диагностике патогенов. Сейчас возможна полногеномная характеристика многих патогенов [5].

HTS также положило начало новому направлению, мегагеномике. Этот подход позволяет объективно охарактеризовать все микроорганизмы в данной экосистеме или в клиническом образце без каких-либо предварительных сведений [6–8]. Рутинное использование HTS в клинической диагностике, в том числе инфекционных болезней, стало возможным в связи со снижением стоимости оборудования.

Более того, существует реальная возможность одновременного секвенирования геномов множества изолятов для каждого вируса [9–13]. Это позволяет выявить генетические вариации в пределах одного вида вируса. Применение HTS даёт возможность осуществлять раннюю диагностику инфекции, идентифицировать мутации, приводящие к лекарственной устойчивости. С помощью HTS патогены можно исследовать как генетически гетерогенные популяции, не клоны. Также данный метод выявляет генетические вариации, возникающие с низкой частотой, включая большие делеции, инсерции, инверсии и транслокации нуклеотидных последовательностей [14, 15].

В частности, лекарственная устойчивость ВПГ, как правило, обусловлена мутациями в вирусных генах тимидинкиназы (ТК) и полимеразы [16]. Продолжительное применение ацикловира и его производных может привести к селекции вариантов, устойчивых к препарату, особенно у индивидов с низкой иммуно-

реактивностью. Раннее выявление субконсенсусных мутаций, способствующих развитию лекарственной устойчивости, может позволить в будущем корректно разработать противовирусную терапию. Например, показано преимущество HTS по сравнению с секвенированием по Сэнгеру для выявления устойчивых к ацикловиру мутантов среди изолятов ВПГ-1, выделенных от пациентов после пересадки гемопоэтических стволовых клеток [17].

Мутации в гене ТК на субконсенсусном уровне можно выявить с помощью HTS примерно на 1 нед раньше, чем они достигнут консенсусного уровня (когда их можно выявить методом Сэнгера). Известно, что вирусный генотип, обладающий лекарственной устойчивостью и присутствующий в популяции в малом количестве, может быстро стать превалирующим при подходящих факторах селекции. В недавнем проведённом исследовании метагеномный анализ образцов сыворотки крови от пациентов с тяжёлой печёночной недостаточностью позволил идентифицировать лекарственно-устойчивые варианты ВПГ-1 наряду с вирусами гепатита А и В [18]. HTS также успешно применяют для изучения лекарственной устойчивости цитомегаловируса и вируса варицелла-зостер [19, 20].

Помимо точечных мутаций, гомологичная рекомбинация между геномами разных штаммов ВПГ является сильным фактором эволюции. Рекомбинация между аттенуированными изолятами ВПГ может приводить к появлению высоковирулентных вариантов как в натуральных, так и в лабораторных условиях [21–26]. HTS предоставляет лучшие возможности для изучения рекомбинации ВПГ и других вирусов данного семейства [27].

### Обнаружение генов, связанных с вирулентностью

С появлением HTS сопоставление фенотипов и генотипов вирусных вариантов претерпело значительные изменения. Сформировалось направление «генетика вперёд» (forward genetics), имеющее целью поиск геномов, определяющих выраженные фенотипические вариации [24, 28, 29].

Ценность описываемых методов диагностики определяется и тем фактом, что клинические проявления простого герпеса у пациентов различаются и, следовательно, их недостаточно для корректного диагноза.

На животных моделях показана корреляция генетической вариации между штаммами ВПГ-1 и вызываемой ими патологией, включая реактивацию из латентного состояния и тяжесть изъязвлений [15, 24, 26]. Корреляция между генетическими вариациями изолятов ВПГ и различиями в тяжести заболевания давно проявлялась в опытах на лабораторных животных с использованием культуральных вариантов вируса. Анализ полных последовательностей клинических изолятов ВПГ-1 показал, что 10 из 74 генов коррелировали с тяжестью болезни глаз у мышей [24]. Однако о том, как изменчивость вируса коррелирует с характером болезни при натуральной ВПГ-инфекции человека, известно мало. Для выявления клинически

значимых маркеров вирулентности в геноме ВПГ необходимы дополнительные исследования генома изолятов вируса, выделенных от пациентов с той или иной формой патологии [30].

Наряду с вирусной генетикой, генетика организма-хозяина не менее важна для определения восприимчивости к заболеванию и его клинического проявления. В настоящее время высокопродуктивное секвенирование в комбинации с полногеномным поиском ассоциаций (HTS/GWAS) часто используют для выявления генетических факторов человека, коррелирующих с различными болезнями, включая ВПГ-инфекцию. С одной стороны, обнаружены вариации в гене *c21orf91* (CSSG1) хромосомы 21, коррелирующие с частотой простудных заболеваний [28]. С другой стороны, полногеномный поиск ассоциаций для идентификации генетических факторов, коррелирующих с интенсивностью выделения инфекционного ВПГ-2, не дал надёжных результатов [31]. В связи со сложным фенотипом ВПГ-инфекции установление корреляции между характером болезни и генотипом организма-хозяина затруднено. Кроме того, результаты полногеномного поиска ассоциаций зависят от других факторов, таких как число пациентов, участвующих в исследовании, и их аллельные вариации. Поэтому отсутствие корреляции при использовании одного фенотипического фактора не уменьшает значение этого метода в изучении патогенеза ВПГ.

### Разработка терапевтических и диагностических средств с применением HTS

В настоящее время доказано, что ВПГ-1 и -2 являются этиологическими агентами генитального герпеса [1, 2]. Генитальный герпес представляет существенный риск для новорождённых, и в течение десятилетий учёные пытаются разработать профилактическую вакцину для предотвращения симптоматического и асимптоматического генитального герпеса. Все существующие на сегодняшний день вакцины и кандидаты в вакцины малоэффективны [32]. Одна из причин их низкой эффективности – генетическая гетерогенность циркулирующих штаммов ВПГ. Так, недавние исследования генома ВПГ-1 показали, что независимые изоляты вируса различаются по нуклеотидной последовательности на 2–4% генома [9], что может составлять тысячи нуклеотидных вариантов. Также показано, что независимые изоляты ВПГ-1 генетически более вариабельны, чем изоляты ВПГ-2 [33]. Знание вариаций генома ВПГ в больших выборках изолятов из различных географических регионов должно способствовать оптимизации вакцинных препаратов в мире. Недавнее исследование штаммов ВПГ-2, циркулирующих в Северной Америке, Южной Америке и Африке, основанное на полноразмерных геномах, выявило низкую частоту встречаемости двух и более штаммов этого вируса в одном организме [34]. Эти данные предполагают, что вакцинальный иммунный ответ может быть протективным в отношении более чем одного циркулирующего штамма ВПГ-2.

Исследования полноразмерного генома изолятов ВПГ не менее важны при разработке диагностических методов для клинических лабораторий. В настоящее время большинство клинических лабораторий используют ПЦР для обнаружения генома ВПГ. Однако замена нуклеотидов в участке связывания праймера или зонда приводит к неспособности этого высокочувствительного метода выявить конкретный вариант (изолят) ВПГ [35]. Набор полноразмерных геномов, полученный методом HTS, поможет идентифицировать более консервативные регионы в геноме для создания праймеров, которые позволят повысить эффективность (чувствительность) ПЦР тест-систем.

### Использование HTS для понимания передачи вируса простого герпеса

ВПГ-1 и -2 – наиболее широко распространённые представители семейства *Herpesviridae* [36]. Инфицирование происходит при их выделении из слизистых рта или гениталий вирусоносителя (донора). Изъязвления на эпителиальных поверхностях служат источником вируса в больших концентрациях, однако инфекционные вирионы могут выделяться и при отсутствии симптомов инфекции. Высокая контагиозность ВПГ затрудняет отслеживание передачи и распространения вируса. Клинически наиболее тяжёлой является передача ВПГ новорождённым и ВИЧ-инфицированным. Так, в США на 3200 родов приходится примерно один случай инфицирования ВПГ [3], поэтому неонатальный герпес является значимой причиной заболеваемости и смертности новорождённых. Передача вируса происходит перинатально (во время родов) или постнатально (при контакте с медперсоналом или членами семьи). Понимание деталей различных путей передачи вируса и генетических особенностей, лежащих в её основе, определяет направление клинического лечения и разработки стратегии здравоохранения. По традиции доказательство передачи ВПГ базируется на данных метода полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (RFLP) или выборочного секвенирования по Сэнгеру [37]. Однако эти методы недостаточны чувствительные, так как не выявляют однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) и малые инсерции/делеции. Развитие HTS обеспечивает исследователей мощным инструментом для полномасштабного (всестороннего) изучения генетической вариативности вирусной популяции, которая переносится от одного хозяина к другому [15].

При передаче вируса из всей популяции организма донора реципиенту передаётся лимитированное число вирионов. Для ряда РНК-вирусов экспериментально доказано, что от донора реципиенту передаётся генетически относительно гомогенная популяция вируса, которая в новом организме даёт генетическое разнообразие *de novo* [38]. Таким образом, гетерогенность вируса между хозяевами увеличивается. О генетическом разнообразии ВПГ при передаче от человека к человеку известно очень мало. Для цитомегаловируса человека доказано, что от матери плоду передаются десятки и даже сотни вирусных частиц

[10]. Поэтому похоже, что ДНК-вирусы сохраняют генетическую гетерогенность при передаче другому организму. Однако параллели с другими ДНК-вирусами следует проводить с осторожностью.

### Практические замечания по высокопродуктивному секвенированию вируса простого герпеса

Содержание G+C в уникальных регионах генома ВПГ составляет около 68% [4]. В повторяющихся регионах генома эта цифра может достигать порядка 90%. Сборка этих последовательностей после HTS представляется проблематичной, поскольку многие платформы секвенирования делают большое число ошибок в данных участках ДНК [39].

HTS генома ВПГ можно проводить в зависимости от конкретной поставленной задачи клинического или научного исследования. Можно провести полногеномное секвенирование определённых регионов, соответствующих ампликонам. Полногеномное секвенирование позволяет конструировать полный геном вируса, что предпочтительно для идентификации переменных регионов и филогенетического анализа данного изолята вируса относительно полных последовательностей геномов различных штаммов [9, 15]. В то же время полногеномное секвенирование требует большего числа прочтений последовательностей от каждого штамма вируса для реконструкции полного генома, что лимитирует число изолятов, которые можно секвенировать за один заход.

Для секвенирования отдельных ампликонов, напротив, используют определённые регионы генома. Например, можно подобрать праймеры для амплификации гена полимеразы (UL30) и гена ТК (UL23) из большого числа штаммов ВПГ за один заход. Также секвенирование ампликонов информативно при типировании большого числа изолятов. Если интересные регионы в геноме ВПГ неизвестны, можно применять полногеномное секвенирование для идентификации наиболее переменных локусов, а затем эту информацию использовать для разработки тестов адресного генотипирования [34].

Следует учитывать, что ранние версии HTS для ВПГ были отработаны на лабораторных штаммах, адаптированных к культуре клеток и прошедших много серийных пассажей. Применение HTS в клинических исследованиях вызвало развитие подходов, позволяющих проводить HTS прямо из клинических образцов, без выделения вируса в культуре клеток. Клинические образцы ВПГ часто собирают с помощью тампонов. Такие образцы легко собирать и хранить в течение долгого периода, но в них мало вирусных геномов и они часто контаминированы ДНК хозяина. Данный факт привёл к развитию методов обогащения, когда амплификация вирусной ДНК проводится прямо из образца, одновременно уменьшая количество ДНК хозяина [30, 40]. Этот подход основан на использовании коротких ДНК-зондов (олигонуклеотидов), комплементарных геному ВПГ. Зонд соединён с меткой, которая обеспечивает иммобилизацию в суспензии с последующим отделением вирусной нуклеиновой

кислоты, связанной этими олигонуклеотидными зондами. Выделенная вирусная ДНК проходит несколько циклов ПЦР, очистку и создание сиквенс-библиотеки. Высокая надёжность данного метода была показана при реконструкции генома ВПГ из клинических образцов [30].

В отличие от амплификации с использованием олигонуклеотидов, которая нацелена на нуклеиновую кислоту интересующего патогена, существуют коммерческие наборы, позволяющие амплифицировать все типы ДНК в данном образце. Этот метод называется полногеномной амплификацией (WGA). Повышая количество ДНК как вируса, так и хозяина в данном образце, WGA повышает вероятность обнаружения и секвенирования ДНК патогена. Так, в метагеномном исследовании цереброспинальной жидкости, взятой от пациентов с подозрением на вирусный менингоэнцефалит, с помощью WGA были успешно выявлены ВПГ-1 и -2 как этиологические агенты [41]. В данном исследовании была использована коммерческая система WGA4 производства компании Sigma-Aldrich (США).

### Заключение

ВПГ-1 и -2 – широко распространены и чрезвычайно опасны для здоровья человека. Своевременная и точная диагностика простого герпеса актуальна как для взрослых, так и для детей. В настоящее время методы диагностики ВПГ значительно усовершенствованы. Если раньше основным подходом было выделение вируса в культуре клеток с последующим выявлением вирусного антигена, то теперь методы диагностики основаны на ПЦР. Несмотря на прогресс диагностика ВПГ-инфекции проблематична, когда этиология заболевания неясна. Генетическая основа вирулентности ВПГ остаётся малопонятной. Также почти неизвестна эволюция ВПГ на фоне интенсивной антивирусной терапии. Глубокое понимание отмеченных аспектов необходимо для эффективного клинического контроля ВПГ-инфекции.

HTS признано высокоэффективным подходом в решении трудных задач. Пожалуй, наиболее важным в применении HTS при ВПГ-инфекции является понимание возникающей лекарственной устойчивости. Этот метод позволил клиницистам не только документировать мутации, приводящие к лекарственной устойчивости, но также оценить скорость и частоту их возникновения в том или ином организме [17]. Данным методом ВПГ идентифицирован как этиологический агент при энцефалите и некоторых атипичных клинических проявлениях, например, болезни печени [18]. Ещё HTS использовали для установления передачи ВПГ как на индивидуальном, так и на популяционном уровне [15, 34]. Эти исследования позволили по-новому взглянуть на передачу геноварианта вируса между индивидами и на эпидемиологию в целом. Оценка генетических вариаций в ходе секвенирования изолятов ВПГ выявила потенциальные факторы, обуславливающие неэффективность ранних анти-ВПГ вакцин и помогла сформулировать

стратегии их разработки [9, 34]. Сравнение геномов ВПГ также способствует идентификации участков генома, которые могут определять вирулентность [24, 30]. В то же время HTS геномов пациентов с тяжёлой формой ВПГ-инфекции позволяет выявлять гены и их участки в геноме, которые могут обуславливать тяжёлое течение болезни у людей [28].

Таким образом, вклад HTS в лучшее понимание патогенеза ВПГ и в усовершенствование методов диагностики трудно переоценить. Поэтому следует понимать практические рекомендации по секвенированию и сборке генома ВПГ. Частота GC-оснований в геноме ВПГ мешает безошибочному секвенированию и сборке генома с использованием стандартных сиквенс-платформ. Следовательно, необходим биоинформатический подход для корректной интерпретации данных секвенирования и конструирования полноразмерных геномов [40, 42–46]. Дороговизна метода HTS является главным препятствием для его повседневного использования в клинических лабораториях. Для таких лабораторий рентабельным может быть мультиплексное секвенирование образцов, обогащённых ДНК ВПГ с использованием олигонуклеотидов.

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. WHO. Fact sheet. Herpes simplex virus. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>
2. Looker K.J., Magaret A.S., Turner K.M.E., Vickerman P., Gottlieb S.L., Newman L.M. Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012. *PLoS One*. 2015; 10(1): e114989. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0114989>
3. Corey L., Wald A., Celum C.L., Quinn T.C. The effects of herpes simplex virus-2 on HIV-1 acquisition and transmission: a review of two overlapping epidemics. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2004; 35(5): 435-45. DOI: <http://doi.org/10.1097/00126334-200404150-00001>
4. Knipe D.M., Howley P. *Fields Virology*. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
5. Behjati S., Tarpey P.S. What is next generation sequencing? *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* 2013; 98(6): 236-8. DOI: <http://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
6. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004; 68(4): 669-85. DOI: <http://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004>
7. Deurenberg R.H., Bathoorn E., Chlebowicz M.A., Couto N., Ferdous M., Garcia-Cobos S., et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J. Biotechnol.* 2017; 243: 16-24. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.12.022>
8. Buchman T.G., Simpson T., Nosal C., Roizman B., Nahmias A.J. The structure of herpes simplex virus DNA and its application to molecular epidemiology. *Ann. NY Acad. Sci.* 1980; 354: 279-90. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1980.tb27972.x>
9. Szpara M.L., Gatherer D., Ochoa A., Greenbaum B., Dolan A., Bowden R.J., et al. Evolution and diversity in human herpes simplex virus genomes. *J. Virol.* 2014; 88(2): 1209-27. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01987-13>
10. Renzette N., Gibson L., Bhattacharjee B., Fisher D., Schleiss M.R., Jensen J.D., et al. Rapid intrahost evolution of human cytomegalovirus is shaped by demography and positive selection. *PLoS Genet.* 2013; 9(9): e1003735. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003735>
11. Sanjuán R., Domingo-Calap P. Mechanisms of viral mutation. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016; 73(23): 4433-48. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00018-016-2299-6>
12. Drake J.W., Hwang C.B.C. On the mutation rate of herpes simplex virus type I. *Genetics.* 2005; 170(2): 969-70. DOI: <http://doi.org/10.1534/genetics.104.040410>
13. Szpara M.L., Tafuri Y.R., Parsons L., Shamim S.R., Verstrepen K.J., Legendre M., et al. A wide extent of inter-strain diversity in viru-

- lent and vaccine strains of alphaherpesviruses. *PLoS Pathog.* 2011; 7(10): 1-23. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002282>
14. Pandey U., Bell A.S., Renner D.W., Kennedy D.A., Shreve J.T., Cairns C.L., et al. DNA from dust: comparative genomics of large DNA viruses in field surveillance samples. *mSphere.* 2016; 1(5): e00132-16. DOI: <http://doi.org/10.1128/mSphere.00132-16>
  15. Pandey U., Renner D.W., Thompson R.L., Szpara M.L., Sawtell N.M. Inferred father-to-son transmission of herpes simplex virus results in near-perfect preservation of viral genome identity and in vivo phenotypes. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 13666. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41598-017-13936-6>
  16. Morfin F., Thouvenot D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *J. Clin. Virol.* 2003; 26(1): 29-37. DOI: [http://doi.org/10.1016/s1386-6532\(02\)00263-9](http://doi.org/10.1016/s1386-6532(02)00263-9)
  17. Fujii H., Kakiuchi S., Tsuji M., Nishimura H., Yoshikawa T., Yamada S., et al. Application of next-generation sequencing to detect acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 variants at low frequency in thymidine kinase gene of the isolates recovered from patients with hematopoietic stem cell transplantation. *J. Virol. Methods.* 2018; 251: 123-8. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.10.019>
  18. Somasekar S., Lee D., Rule J., Naccache S.N., Stone M., Busch M.P., et al. Viral surveillance in serum samples from patients with acute liver failure by metagenomic next-generation sequencing. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 65(9): 1477-85. DOI: <http://doi.org/10.1093/cid/cix596>
  19. Mercier-Darty M., Boutolleau D., Lepeule R., Rodriguez C., Burrel S. Utility of ultra-deep sequencing for detection of varicella-zoster virus antiviral resistance mutations. *Antiviral Res.* 2018; 151: 20-3. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.01.008>
  20. Houldcroft C.J., Bryant J.M., Depledge D.P., Margetts B.K., Simmonds J., Nicolaou S., et al. Detection of low frequency multi-drug resistance and novel putative maribavir resistance in immunocompromised pediatric patients with cytomegalovirus. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 1317. DOI: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01317>
  21. Bowden R., Sakaoka H., Donnelly P., Ward R. High recombination rate in herpes simplex virus type 1 natural populations suggests significant co-infection. *Infect. Genet. Evol.* 2004; 4(2): 115-23. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.01.009>
  22. Lee S.W., Markham P.F., Coppo M.J., Legione A.R., Markham J.F., Noormohammadi A.H., et al. Attenuated vaccines can recombine to form virulent field viruses. *Science.* 2012; 37(6091): 188. DOI: <http://doi.org/10.1126/science.1217134>
  23. Lee K., Kolb A.W., Sverchkov Y., Cuellar J.A., Craven M., Brandt C.R. Recombination analysis of herpes simplex virus 1 reveals a bias toward GC content and the inverted repeat regions. *J. Virol.* 2015; 89(14): 7214-23. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.00880-15>
  24. Kolb A.W., Lee K., Larsen I., Craven M., Brandt C.R. Quantitative trait locus based virulence determinant mapping of the HSV-1 genome in murine ocular infection: genes involved in viral regulatory and innate immune networks contribute to virulence. *PLoS Pathog.* 2016; 12(3): e1005499. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005499>
  25. Koelle D.M., Norberg P., Fitzgibbon M.P., Russell R.M., Greninger A.L., Huang M.L., et al. Worldwide circulation of HSV-2 x HSV-1 recombinant strains. *Sci. Rep.* 2017; 7: 44084. DOI: <http://doi.org/10.1038/srep44084>
  26. Javier R.T., Sedarati F., Stevens J.G. Two avirulent herpes simplex viruses generate lethal recombinants in vivo. *Science.* 1986; 234(4777): 746-8. DOI: <http://doi.org/10.1126/science.3022376>
  27. Lassalle F., Depledge D.P., Reeves M.B., Brown A.C., Christiansen M.T., Tutill H.J., et al. Islands of linkage in an ocean of pervasive recombination reveals two-speed evolution of human cytomegalovirus genomes. *Virus Evol.* 2016; 2(1): vew017. DOI: <http://doi.org/10.1093/ve/vew017>
  28. Kriesel J.D., Bhatia A., Thomas A. Cold sore susceptibility gene-1 genotypes affect the expression of herpes labialis in unrelated human subjects. *Hum. Genome Var.* 2014; 1: 14024. DOI: <http://doi.org/10.1038/hgv.2014.24>
  29. Thompson R.L., Williams R.W., Kotb M., Sawtell N.M. A forward phenotypically driven unbiased genetic analysis of host genes that moderate herpes simplex virus virulence and stromal keratitis in mice. *PLoS One.* 2014; 9(3): e92342. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0092342>
  30. Shipley M.M., Renner D.W., Ott M., Bloom D.C., Koelle D.M., Johnston C., et al. Genome-wide surveillance of genital herpes simplex virus type 1 from multiple anatomic over time. *J. Infect. Dis.* 2018; 218(4): 595-605. DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jiy216>
  31. Kleinstein S.E., Shea P.R., Allen A.S., Koelle D.M., Wald A., Goldstein D.B. Genome-wide association study (GWAS) of human host factors influencing viral severity of herpes simplex virus type 2 (HSV-2). *Genes Immun.* 2018; 20(2): 112-20. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41435-018-0013-4>
  32. Johnston C., Koelle D.M., Wald A. Current status and prospects for development of an HSV vaccine. *Vaccine.* 2014; 32(14): 1553-60. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.08.066>
  33. Newman R.M., Lamers S.L., Weiner B., Ray S.C., Colgrove R.C., Diaz F., et al. Genome sequencing and analysis of geographically diverse clinical isolates of herpes simplex virus 2. *J. Virol.* 2015; 89(16): 8219-32. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01303-15>
  34. Johnston C., Magaret A., Roychoudhury P., Greninger A.L., Reeves D., Schiffer J., et al. Dual-strain genital herpes simplex virus type 2 (HSV-2) infection in the US, Peru, and 8 countries in sub-Saharan Africa: a nested cross-sectional viral genotyping study. *PLoS Med.* 2017; 14(12): e1002475. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002475>
  35. Anderson T.P., Werno A.M., Beynon K.A., Murdoch D.R. Failure to genotype herpes simplex virus by real-time PCR assay and melting curve analysis due to sequence variation within probe binding sites. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(5): 2135-7. DOI: <http://doi.org/10.1128/jcm.41.5.2135-2137.2003>
  36. Wald A., Corey L. Persistence in the population: epidemiology, transmission. In: Arvin A., Campadelli-Fiume G., Mocarski E., Moore P.S., Roizman B., Whitley R., et al. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.* Cambridge: Cambridge University Press; 2007.
  37. Sataoka H., Saheki Y., Uzuki K., Nakakita T., Saito H., Sekine K., et al. Two outbreaks of herpes simplex virus type 1 nosocomial infection among newborns. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 24(1): 36-40.
  38. Gutiérrez S., Michalakakis Y., Blanc S. Virus population bottlenecks during within-host progression and host-to-host transmission. *Curr. Opin. Virol.* 2012; 2(5): 546-55. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.08.001>
  39. Nakamura K., Oshima T., Morimoto T., Ikeda S., Yoshikawa H., Shiwa Y., et al. Sequence-specific error profile of Illumina sequencers. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(13): e90. DOI: <http://doi.org/10.1093/nar/gkr344>
  40. Greninger A.L., Roychoudhury P., Xie H., Casto A., Cent A., Pepper G., et al. Ultrasensitive capture of human herpes simplex virus genomes directly from clinical samples reveals extraordinarily limited evolution in cell culture. *mSphere.* 2018; 3(3): e00283-18. DOI: <http://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00283-18>
  41. Guan H., Shen A., Lv X., Yang X., Ren H., Zhao Y., et al. Detection of virus in CSF from the cases with meningoencephalitis by next-generation sequencing. *J. Neurovirol.* 2016; 22(2): 240-5. DOI: <http://doi.org/10.1007/s13365-015-0390-7>
  42. Naccache S.N., Federman S., Veeraraghavan N., Zaharia M., Lee D., Samayoa E., et al. A cloud-compatible bioinformatics pipeline for ultrarapid pathogen identification from next-generation sequencing of clinical samples. *Genome Res.* 2014; 24(7): 1180-92. DOI: <http://doi.org/10.1101/gr.171934.113>
  43. Oliver G.R., Hart S.N., Klee E.W. Bioinformatics for clinical next generation sequencing. *Clin. Chem.* 2015; 61(1): 124-35. DOI: <http://doi.org/10.1373/clinchem.2014.224360>
  44. Parsons L.R., Tafuri Y.R., Shreve J.T., Bowen C.D., Shipley M.M., Enquist L.W., et al. Rapid genome assembly and comparison decode intrastrain variation in human alphaherpesviruses. *mBio.* 2015; 6(2): e02213-14. DOI: <http://doi.org/10.1128/mBio.02213-14>
  45. Wan Y., Renner D.W., Albert I., Szpara M.L. VirAmp: a galaxy-based viral genome assembly pipeline. *Gigascience.* 2015; 4: 19. DOI: <http://doi.org/10.1186/s13742-015-0060-y>
  46. Lavezzo E., Barzon L., Toppo S., Palù G. Third generation sequencing technologies applied to diagnostic microbiology: benefits and challenges in applications and data analysis. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2016; 16(9): 1011-23. DOI: <http://doi.org/10.1080/14737159.2016.1217158>

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

## Тест-система для выявления IgG-антител к вирусу гепатита E (*Hepeviridae*, *Orthohepevirus*, *Orthohepevirus A*) методом линейного иммуноанализа

Алаторцева Г.И.<sup>1</sup>, Доценко В.В.<sup>1</sup>, Нестеренко Л.Н.<sup>1</sup>, Лухверчик Л.Н.<sup>1</sup>, Кабаргина В.Ю.<sup>1</sup>, Амиантова И.И.<sup>1</sup>, Жукина М.В.<sup>1</sup>, Жаворонок С.В.<sup>2</sup>, Нурматов З.Ш.<sup>3</sup>, Нурматов А.З.<sup>3</sup>, Зверев В.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия;

<sup>2</sup> Белорусский государственный медицинский университет, 220116, Минск, Республика Беларусь;

<sup>3</sup> НПО «Профилактическая медицина», 720005, Бишкек, Кыргызская Республика

**Введение.** Эффективность методов серодиагностики гепатита E варьирует в широких пределах, поэтому рекомендуется комбинированное использование тестов различных форматов.

**Цель** исследования – разработка тест-системы для выявления IgG-антител к вирусу гепатита E (ВГЕ) в сыворотке крови человека методом линейного иммуноанализа (ЛИА).

**Материал и методы.** Образцы сывороток крови больных гепатитами и условно здоровых лиц типировали с применением коммерческих иммуноферментных тест-систем на IgG-антитела к возбудителям вирусных гепатитов и иных инфекций, вызывающих патологию печени. В ЛИА применяли рекомбинантные антигены ORF2 и ORF3 ВГЕ 1-го и 3-го генотипов. В качестве тест-системы сравнения использовали набор реагентов «RecomLine HEV IgG/IgM» (Mikrogen GmbH, Германия).

**Результаты.** Разработана первая отечественная тест-система «Блот-ВГЕ», предназначенная для выявления IgG-антител к индивидуальным белкам ВГЕ в сыворотке крови человека методом ЛИА. Антигенная основа представлена полосками нитроцеллюлозной мембраны с иммобилизованными на ней в виде дискретных линий рекомбинантными антигенами, содержащими С-концевые фрагменты белков ORF2 (406–660 а.о.), полноразмерные последовательности белков ORF3 (1–113 а.о.) ВГЕ 1-го и 3-го генотипов, и контрольными антигенами. Конъюгат – меченные пероксидазой хрена моноклональные антитела мыши к IgG человека, раствор хромогена содержит 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Предусмотрен визуальный и цифровой учёт результатов. Аналитическая чувствительность тест-системы составила 0,625 МЕ/мл для антигенов ORF2 и 2,5 МЕ/мл для антигенов ORF3. Показано, что эндогенные интерференты не влияют на результаты анализа и отсутствуют перекрёстные реакции с антителами к возбудителям гепатитов иной этиологии. Чувствительность тест-системы в сравнении с набором «RecomLine HEV IgG/IgM» составила 92%, специфичность – 97%. Определён срок её годности в заданных условиях хранения – 12 мес.

**Заключение.** Разработана тест-система для подтверждения результатов иммуноферментного анализа в лабораторной диагностике гепатита E.

**Ключевые слова:** гепатит E; вирус гепатита E; серодиагностика; линейный иммуноанализ; иммуно-блоттинг.

**Для цитирования:** Алаторцева Г.И., Доценко В.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Кабаргина В.Ю., Амиантова И.И., Жукина М.В., Жаворонок С.В., Нурматов З.Ш., Нурматов А.З., Зверев В.В. Тест-система для выявления IgG-антител к вирусу гепатита E (*Hepeviridae*, *Orthohepevirus*, *Orthohepevirus A*) методом линейного иммуноанализа. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(3): 132-142. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-132-142>

**Для корреспонденции:** Алаторцева Галина Ивановна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., зав. лабораторией клонирования вирусных геномов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Малый Казенный пер., д 5А. E-mail: [alatorseva@gmail.com](mailto:alatorseva@gmail.com)

**Участие авторов:** Алаторцева Г.И. – концепция и дизайн исследования, сбор данных литературы, написание текста, сбор и обработка материала; Доценко В.В. – сбор данных литературы, написание текста, сбор и обработка материала; Нестеренко Л.Н. – сбор и обработка материала; Лухверчик Л.Н. – сбор и обработка материала, написание текста, статистический анализ; Кабаргина В.Ю. – сбор и обработка материала; Амиантова И.И. – сбор и обработка материала, редактирование; Жукина М.В., Жаворонок С.В., Нурматов З.Ш. Нурматов А.З. – сбор и обработка материала; Зверев В.В. – редактирование.

**Финансирование.** Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2019-1481 от 15.08.2019 г., уникальный идентификатор проекта RFMEFI61319X0091).

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

Поступила 29.05.2020

Принята в печать 09.06.2020

## Line immunoassay for detection of IgG antibodies to hepatitis E virus (*Hepeviridae*, *Orthohepevirus*, *Orthohepevirus A*)

Galina I. Alatorseva<sup>1</sup>, Vera V. Dotsenko<sup>1</sup>, Lyubov N. Nesterenko<sup>1</sup>, Lyudmila N. Luhverchik<sup>1</sup>, Vera Yu Kabargina<sup>1</sup>, Irina I. Amiantova<sup>1</sup>, Marina V. Zhukina<sup>1</sup>, Sergey V. Zhavoronok<sup>2</sup>, Zuridin S. Nurmatov<sup>3</sup>, Asilbek Z. Nurmatov A.Z.<sup>3</sup>, Vitaliy V. Zverev<sup>1</sup>

<sup>1</sup> I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia;

<sup>2</sup> Belarusian State Medical University, Minsk, 220116, Republic of Belarus;

<sup>3</sup> Scientific Production Association "Preventive Medicine" Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, Bishkek, 720005, Kyrgyz Republic

**Introduction.** The diagnostic efficacy of methods for hepatitis E serodiagnostic varies over a wide range; therefore, the combined use of tests of various formats is recommended. The aim of the research was to develop a test system for the detection of IgG antibodies to hepatitis E virus (HEV) in human serum by linear immunoassay (LIA).

**Material and methods.** Serum samples from patients with hepatitis and healthy individuals were tested using commercial enzyme-linked immunosorbent assay systems for the presence of IgG antibodies to viral agents causing hepatitis and other infections associated with liver pathology. Recombinant antigens ORF2 and ORF3 of HEV genotypes 1 and 3 were used. The "RecomLine HEV IgG/IgM" reagent kit (Mikrogen GmbH, Germany) was used as a comparison test system.

**Results.** The first Russian diagnostic kit "Blot-HEV", designed to detect IgG antibodies to individual HEV proteins in human serum using LIA, was developed. The antigenic base is represented by strips of a nitrocellulose membrane with immobilized recombinant antigens ORF2 (aa 406–660) and ORF3 (aa 1–113) of HEV genotypes 1 and 3, and control antigens in the form of discrete lines. The conjugate was mouse monoclonal antibodies to human class G immunoglobulins labeled with horseradish peroxidase. The chromogen solution contained the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. A visual and digital recording of results was provided. The analytical sensitivity of the test kit was 0.625 IU/ml for ORF2 antigens and 2.5 IU/ml for ORF3 antigens. The absence of the influence of endogenous interfering substances on the results of the analysis and the absence of cross-reactions with antibodies to hepatitis pathogens of the other etiologies had been shown. The sensitivity of the test system compared to the "RecomLine HEV IgG/IgM" kit was 92%, specificity 97%. Shelf life in condition of storage was determined to be 12 months.

**Conclusions.** The developed test can be used to confirm the results of ELISA in laboratory diagnosis of hepatitis E.

**Keywords:** hepatitis E; hepatitis E virus; serodiagnosis; line immunoassay; immunoblotting.

**For citation:** Alatorseva G.I., Dotsenko V.V., Nesterenko L.N., Luhverchik L.N., Kabargina V.Yu., Amiantova I.I., Zhukina M.V., Zhavoronok S.V., Nurmatov Z.S., Nurmatov A.Z., Zverev V.V. Line immunoassay for detection of IgG antibodies for hepatitis virus E (*Hepeviridae*, *Orthohepevirus*, *Orthohepevirus A*). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology)*. 2020; 65(3): 132-142. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-132-142>.

**For correspondence:** Galina I. Alatorseva, PhD (Biol.), Lead Researcher, Head of the laboratory for cloning of viral genomes, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia.

E-mail: [alatorseva@gmail.com](mailto:alatorseva@gmail.com)

### Information about the authors:

Alatorseva G.I., <https://orcid.org/0000-0001-9887-4061>

Dotsenko V.V., <https://orcid.org/0000-0002-5866-944X>

Nesterenko L.N., <https://orcid.org/0000-0002-3825-3906>

Luhverchik L.N., <https://orcid.org/0000-0002-2997-8892>

Kabargina V.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8784-4497>

Amiantova I.I., <https://orcid.org/0000-0003-3483-0128>

Zhukina M.V., <https://orcid.org/0000-0002-2329-5089>

Zhavoronok S.V., <https://orcid.org/0000-0001-9727-1103>

Nurmatov Z.S., <https://orcid.org/0000-0003-3481-227X>

Nurmatov A.Z., <https://orcid.org/0000-0002-0717-4172>

Zverev V.V., <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

**Contribution:** Alatorseva G.I. – research concept and design, literature data collection, material collection and processing, text writing; Dotsenko V.V. – literature data collection, material collection and processing, text writing; Nesterenko L.N. – material collection and processing; Luhverchik L.N. – material collection and processing, text writing, statistic analysis; Kabargina V.Yu. – material collection and processing; Amiantova I.I. – material collection and processing, text editing; Zhukina M.V., Zhavoronok S.V., Nurmatov Z.S., Nurmatov A.Z. – material collection and processing; Zverev V.V. – text editing.

**Acknowledgment.** The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement № 075-15-2019-1481 from 15.08.2019, unique identifier of the project RFMEFI61319X0091).

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

Received 29 May 2020  
Accepted 09 June 2020

## Введение

Гепатит Е (ГЕ) представляет глобальную проблему для здравоохранения, поэтому очень важно совершенствование его лабораторной диагностики. Серологическим маркером острого или недавно перенесённого ГЕ служат IgM-антитела к вирусу ГЕ (ВГЕ), которые появляются в крови заболевших в течение первых 2 нед желтушного периода и могут обнаруживаться в течение 5 мес после начала заболевания [1]. Специфические IgG-антитела, которые в острой фазе ГЕ часто появляются одновременно или вскоре после IgM-антител и могут длительно персистировать в крови пациентов [2], часто рассматриваются как индикатор перенесённой инфекции и основной показатель серопревалентности ВГЕ. Тем не менее увеличение титра IgG-антител к ВГЕ более чем в 4 раза трактуется как показатель острого ГЕ. Например, Европейская ассоциация по изучению печени (European Association for the Study of the Liver) рекомендует для установления диагноза острого ГЕ учитывать одновременное присутствие в анализируемых пробах РНК ВГЕ и специфических IgM- и/или IgG-антител, а также повышение титров IgG-антител на фоне присутствия IgM-антител [3]. Сравнительные испытания коммерческих тест-систем разных производителей, проведённые на идентичных образцах сывороток крови больных острым ГЕ, показали, что по диагностической эффективности эти тесты различаются в широких пределах. Например, 4 набора для определения IgG-антител к ВГЕ различались по чувствительности в диапазоне от 40 до 1000 МЕ/мл, а получаемые с их применением результаты совпадали в 56–87% случаев [4]. Метаанализ результатов 73 исследований серопревалентности ВГЕ в Европе, проведённых с 2003 по 2015 г., показал, что данные сероэпидемиологических исследований решающим образом зависят от чувствительности применяемых тестов. Доля серопозитивной прослойки среди населения обследованных территорий, определённая с помощью пяти коммерческих тест-систем, варьировала в широком диапазоне: 17% (Wantai, Китай), 10% (Mikrogen, Германия), 7% (MP Diagnostics, США), 4% (DiaPro, Италия), 2% (Abbott, США). Среди причин выявленных несоответствий рассматриваются переменная кинетика синтеза антител к индивидуальным вирусным белкам при ГЕ, неполная гомология антигенной структуры у белков ВГЕ разных генотипов, приводящая к различиям в составе эпитопов рекомбинантных белков, применяемых в тестах [5].

Для уточнения диагноза ГЕ рекомендуется комбинированное применение тест-систем различных форматов. Исключить ложноположительные результаты в инфекционной серодиагностике позволяет повторное исследование положительных образцов в подтверждающих тестах, один из них – линейный иммуноанализ (ЛИА), или лайн-блот, основанный на применении рекомбинантных вирусспецифических антигенов. Используемый при этом метод является вариантом мультиплексного анализа, позволяющим тестировать исследуемый образец в реакции одно-

временно с несколькими антигенами. Наряду с высокой чувствительностью и специфичностью достоинством метода является возможность его применения в отсутствие оборудования для проведения иммуноферментного анализа (ИФА). На сегодняшний день немецкая компания Mikrogen GmbH – единственный в мире производитель тест-системы для выявления антител к ВГЕ методом ЛИА [6].

Рекомбинантные антигены, на основе которых созданы коммерческие отечественные и зарубежные тест-системы для серодиагностики ГЕ, содержат различные фрагменты белков ORF2 и ORF3 ВГЕ 1-го, 2-го или 3-го генотипов. Известно, что для белков ВГЕ разных генотипов характерны отличия в антигенных свойствах [7]. В связи с этим для разработки диагностических тестов ранее были получены в системе экспрессии *Escherichia coli* рекомбинантные антигены, содержащие С-концевые фрагменты (406–660 а.о.) капсидных белков ORF2 и полноразмерные аналоги белков ORF3 штаммов ВГЕ 1-го и 3-го генотипов, циркулирующих на территории стран постсоветского пространства [8].

**Цель** данной работы – разработка тест-системы для выявления IgG-антител к ВГЕ в сыворотке крови человека методом ЛИА с применением рекомбинантных антигенов ORF2 и ORF3 ВГЕ 1-го и 3-го генотипов.

## Материал и методы

В работе использованы иммунореагенты: рекомбинантные антигены ORF2 и ORF3 1-го и 3-го генотипов [9–12], β-галактозидаза, выделенная из клеток штамма *E coli* PLT90, трансформированных плазмидой pEL5a без вставки фрагмента ДНК ВГЕ, из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова [13, 14]; полученные в лаборатории клонирования вирусных геномов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова методом периодатного окисления пероксидазные конъюгаты моноклональных антител (МАТ) мыши к Fab-фрагменту IgG человека (ООО «Сорбент-Сервис», Россия) – МАТ2А11-ПХ, МАТ к Fc-фрагменту IgG человека (ООО «Сорбент-Сервис», Россия) – МАТСН1-ПХ, поликлональных кроличьих антител к IgG человека – ПАТ IgG-ПХ.

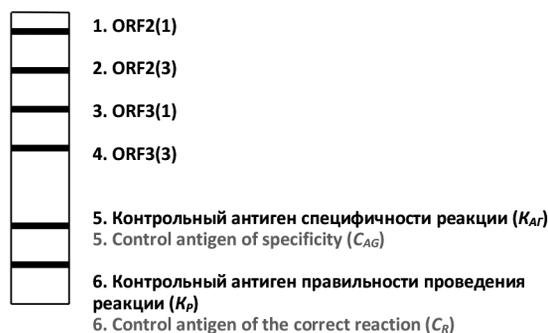
Для отработки условий анализа и испытаний тест-системы «Блот-ВГЕ» использовали Международный стандарт Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) «Anti-hepatitis E Serum, Human» 95/584 NIBSC, контрольную панель сывороток ( $n=8$ ), содержащих и не содержащих анти-HEV-G (кат. № E-331, НПО «Диагностические системы», Россия), образцы ( $n=239$ ) сывороток крови здоровых лиц и больных гепатитами А, В, С и Е и другими инфекционными патологиями печени, предоставленные кафедрой инфекционных болезней Белорусского государственного медицинского университета, НПО «Профилактическая медицина» Минздрава Кыргызской Республики, клинико-диагностическим отделением ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (Россия). Образцы хранили при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Антитела IgG к ВГЕ в образцах сывороток крови выявляли с помощью иммуноферментной тест-системы «ДС-ИФА-Анти-HEV-G» (РУ № ФС 01262006/5408-06, НПО «Диагностические системы», Россия). Каждый образец исследовали в повторах. Для каждого положительного образца рассчитывали коэффициент позитивности (КП) по формуле:

$$КП = \frac{ОП_{обр.}}{ОП_{крит.}}$$

где  $ОП_{обр.}$  – оптическая плотность образца,  $ОП_{крит.}$  – её пороговое значение, рассчитанное в соответствии с инструкциями производителя. Серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов А (ВГА), В (ВГВ), С (ВГС) и возбудителями инфекционной патологии печени иной вирусной этиологии определяли с помощью коммерческих иммуноферментных тест-систем «ДС-ИФА-Анти-HAV-G-РЕКОМБ» (кат. № А-151, ООО «НПО «Диагностические системы», Россия), БЛОТ ВИЧ 1/2+0 (РУ № ФСР 2009/04019, АО «Биосервис», Россия) и тест-систем производства АО «Вектор-Бест», Россия: «Вектогеп В-НВс-антиген» (РУ № РЗН 2015/2887), «ГепаБест анти-НВс-IgG» (РУ РЗН 2017/5606), «Бест анти-ВГС-авто» (РУ № РЗН 2015/2674), «Бест анти-ВГС-подтверждающий тест» (РУ № РЗН 2015/2895), «ВектоЦМВ-IgG-авидность» (РУ № РЗН 2014/2219), «ВектоВЭБ-ЕА-IgG» (РУ № РЗН 2013/1274), «ВектоВЭБ-НА-IgG» (РУ № РЗН 2013/1273). В качестве тест-системы сравнения использовали набор реагентов «RecomLine HEV IgG/IgM» (РУ № ФСЗ 2012/13543 кат. № 5072, Mikrogen Diagnostik GmbH, Германия). Анализ выполняли в соответствии с инструкциями производителей соответствующих тест-систем.

Для проведения ЛИА на поверхности иммуносорбента (полосок нитроцеллюлозной мембраны) в виде поперечных линий сорбировали очищенные рекомбинантные антигены ORF2 и ORF3 ВГЕ 1-го (ORF2(1) и ORF3(1)) и 3-го (ORF2(3) и ORF3(3)) генотипов (линии № 1–4 на **рис. 1**) и контрольные антигены. Контрольным антигеном специфичности реакции ( $K_{АГ}$  линия № 5) был синтезированный в *E. coli* рекомбинантный полипептид, содержащий аминокис-



**Рис. 1.** Размещение линий с иммобилизованными специфическими и контрольными антигенами на полоске нитроцеллюлозной мембраны.

**Fig. 1.** Positions of lines with immobilized specific and control antigens on a strip of nitrocellulose membrane.

лотную последовательность фрагмента  $\beta$ -галактозидазы *E. coli* и не содержащий фрагментов белков ВГЕ. Для контроля правильности проведения реакции ( $K_p$ , линия № 6) использовали иммунную сыворотку против IgG человека. Иммобилизацию антигенов проводили, выдерживая растворы с их разведениями в течение 16 ч при температуре 9 °C в канальцах прибора для пассивной сорбции белков на поверхности мембран. В качестве положительного контрольного образца  $K^+$  использовали сыворотку крови человека, содержащую IgG-антитела к белкам ВГЕ и не содержащую антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВГС, антигена р24 ВИЧ-1 и НВсAg. Отрицательным контрольным образцом  $K^-$  была сыворотка крови человека, не содержащая антител к белкам ВГЕ, к ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВГС, антигена р24 ВИЧ-1 и НВсAg. Контрольные образцы инактивировали прогреванием при температуре от 54 до 56 °C в течение 3 ч. Для выявления вступивших в реакцию с антигенами антител применяли пероксидазный конъюгат МАТ мыши или поликлональных антител кролика к IgG человека. Хромогеном был 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, раствор для разведения хромогена содержал перекись водорода.

При проведении ЛИА в канавки реакционной ванночки погружали иммуносорбент – нитроцеллюлозные стрипы с иммобилизованными рекомбинантными антигенами ВГЕ, добавляли раствор для разведения образцов, содержащий лизат клеток *E. coli*, и испытуемые образцы в конечном разведении 1:50. Инкубировали в течение 2 ч (в варианте дневной постановки) или 16–18 ч (в варианте ночной постановки) при комнатной температуре, используя лабораторный орбитальный шейкер. Не вступившие в реакцию антитела сыворотки крови удаляли 3-кратным промыванием. По 1 мл рабочего разведения конъюгата вносили в каждую канавку реакционной ванночки, инкубировали 1 ч (в варианте дневной постановки) или 30 мин (в варианте ночной постановки) при комнатной температуре, затем 3-кратно промывали. В каждую ванночку вносили по 1 мл субстратного раствора и инкубировали в течение 15 мин в защищённом от света месте. Реакционную смесь удаляли, реакцию останавливали, внося в каждую канавку по 1 мл фосфатно-солевого буфера. Через 5 мин стрипы промывали дистиллированной водой, высушивали и проводили визуальный или цифровой учёт результатов по наличию окрашенных линий на полосках иммуносорбента. Для цифрового учёта окрашенные стрипы сканировали с помощью планшетного сканера и анализировали интенсивность окрашивания с помощью программы TotalLab. На каждом стрипе для отдельных линий антигенов определяли КП по отношению площадей пиков, соответствующих полосам индивидуального вирусспецифического антигена и  $K_{АГ}$  на денситограмме.

## Результаты

Перед разработкой тест-системы для определения антител к ВГЕ методом ЛИА была создана стандартная лабораторная панель сывороток крови человека,

содержащих и не содержащих IgG-антитела к ВГЕ, из проб от здоровых и больных людей с предварительным диагнозом «вирусный гепатит» из лечебно-профилактических учреждений Республики Беларусь, Кыргызстана и России. Все полученные образцы исследовали на антитела к ВГС, *T. pallidum*, ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антигены р24 ВИЧ и HBsAg ВГВ. В дальнейших исследованиях использовали только отрицательные по этим показателям образцы. Отобранные образцы протестировали в тест-системе «ДС-ИФА-Анти-HEV-G». Сформированная таким образом лабораторная панель (ЛП) включала 25 (№ 1–25) положительных образцов (восемь – с КП от 6,0 до 8,5; десять – с КП от 3,7 до 5,7; семь – с КП от 2,0 до 3,6 и 50 (№ 26–75) отрицательных образцов с КП от 0,2 до 0,9. В соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 23640-2015 проведено предварительное испытание стабильности образцов ЛП в течение 21 сут в двух режимах: при температуре  $4,0 \pm 1^\circ\text{C}$  и в условиях моделирования ускоренного старения при температуре  $37,0 \pm 1^\circ\text{C}$ . Анализ результатов исследования образцов по истечении срока хранения в наборе «ДС-ИФА-Анти-HEV-G» показал, что КП образцов ЛП, хранившихся при  $4,0 \pm 1^\circ\text{C}$ , оставались неизменными, в то же время образцы, выдержанные при  $37,0 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 21 сут, не теряли специфичности, при этом их КП снижался не более чем на 20%, что соответствует стабильности в течение 1 года при температуре от 2 до  $8^\circ\text{C}$ .

Критерием выбора при отработке оптимальных условий проведения ЛИА считали максимальное соотношение между значениями КП для положительных и отрицательных образцов при отсутствии окрашивания полосы  $K_{AG}$ . Концентрацию каждого из рекомбинантных антигенов ВГЕ и  $K_{AG}$  для сорбции на поверхности нитроцеллюлозных мембран определяли в сериях их разведений в концентрациях от 10 до 40 мкг/мл. По результатам анализа реакций с положительными и отрицательными образцами были установлены оптимальные концентрации антигенов ВГЕ для сорбции: ORF2(1) – 8,75 мкг/мл, ORF2(3) – 8,75 мкг/мл, ORF3(1) – 35 мкг/мл, ORF3(3) – 35 мкг/мл,  $K_{AG}$  – 45 мкг/мл. С целью выбора наиболее специфичного препарата пероксидазного конъюгата антител к IgG человека и определения его рабочего разведения было протестировано 3 вида антител к IgG человека, меченных пероксидазой хрена: МАТ2А11-ПХ, МАТ-СН1-ПХ и ПАТ IgG-ПХ. Конъюгаты тестировали в разведениях от 1 : 20 000 до 1 : 60 000 в режиме ночной постановки. Анализ полученных результатов позволил выбрать оптимальный вариант конъюгата – МАТ2А11-ПХ в разведении 1 : 60 000. Для отработки наиболее приемлемых режимов инкубации иммуносорбента с исследуемыми образцами сывороток и конъюгатом изучили влияние продолжительности инкубации сывороток с иммобилизованными рекомбинантными антигенами ВГЕ от 1 до 3 ч в при дневной постановке и длительности реакции с конъюгатом в течение 30, 60 и 90 мин после дневной и ночной реакции иммуносорбента с сыворотками. Установле-

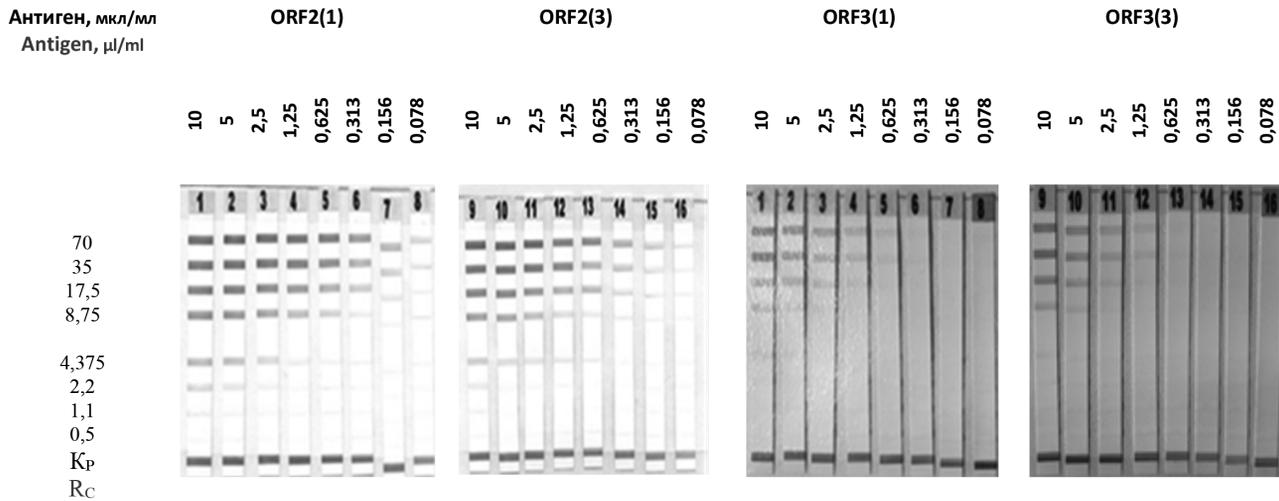
но, что в дневном варианте постановки оптимальное время инкубации с образцами сывороток составляет 120 мин, с конъюгатом – 60 мин. В ночном варианте постановки необходимая продолжительность реакции с конъюгатом составила 30 мин. За более короткое время не происходило достаточного окрашивания стрипов в реакциях с положительными образцами ЛП, а увеличение продолжительности инкубаций приводило к фоновому неспецифическому окрашиванию нитроцеллюлозных мембран. В серии отдельных экспериментов также были определены оптимальный режим послеинкубационной промывки стрипов, условия и время взаимодействия с субстратной смесью, время останова ферментативной реакции и составы соответствующих растворов.

Апробирован визуальный и цифровой учёт результатов и отработана их интерпретация.

Визуальный учёт результатов осуществляли по окрашиванию участков мембран с иммобилизованными вирусспецифическими и контрольными антигенами. Визуальный учёт результатов исследования проводили, если в реакции с контрольными сыворотками ( $K^+$  и  $K^-$ ) происходило фиолетово-синее окрашивание линии № 6 ( $K_p$ : контрольный антиген правильности проведения реакции) и отсутствовало в области линии № 5 ( $K_{AG}$ : контрольный антиген специфичности реакции), а также, если линии № 1–4 чётко окрашены в реакции с  $K^+$  и не окрашены в реакции с  $K^-$ . Результат исследования образца учитывали как положительный, если окрасились две и более линий № 1–4; как неопределённый, если произошло окрашивание не более одной из линий № 1–4; как отрицательный, если не окрасилась ни одна из линий.

Окрашивание линии № 5 ( $K_{AG}$ ) в реакциях с испытуемыми образцами рассматривали как неспецифическое взаимодействие за счёт присутствия антител к бактериальным антигенам *E. coli* или вследствие несоблюдения правил приготовления и хранения образца сыворотки. В этом случае окрашивание любой из линий № 1–4 учитывали как специфическое, если его интенсивность заметно превышала интенсивность окрашивания полосы № 5. При одинаковом или менее выраженном окрашивании любой из линий № 1–4 в сравнении с линией № 5 результат окрашивания этой линии учитывали как отрицательный. Если при исследовании по варианту с 2-часовой инкубацией образцов происходило окрашивание только одной полосы (неопределённый результат) или наблюдалось столь слабое окрашивание линий № 1–4 мембраны, что это не давало возможности учитывать результат, то анализ такого образца сыворотки повторяли по схеме с 18-часовой инкубацией. Повторное получение неопределённого результата рассматривали как свидетельство необходимости дополнительно исследования образца другими методами.

По результатам тестирования массива отрицательных в тест-системе «ДС-ИФА-Анти-HEV-G» сывороток ( $n=140$ ) пороговое значение КП ( $KP_{пор}$ ) по каждому из антигенов определено равным 2,1 ( $p < 0,05$ ) для цифрового учёта результатов. Интерпретацию резуль-



**Рис. 2.** Титрование Международного стандарта ВОЗ «Anti-hepatitis E Serum, Human» 95/584 NIBSC на рекомбинантных антигенах ORF2 и ORF3 ВГЕ 1-го (ORF2(1), ORF3(1)) и 3-го (ORF2(3), ORF3(3)) генотипов, К<sub>р</sub> – контроль реакции.

**Fig. 2.** Titration of the WHO International Standard «Anti-hepatitis E Serum, Human» 95/584 NIBSC against the recombinant antigens ORF2 and ORF3 of HEV 1 (ORF2(1), ORF3(1)) and 3 (ORF2(3), ORF3(3)) genotypes, R<sub>c</sub> – reaction control.

татов окрашивания линий на стрипе проводили с соблюдением тех же условий и в том же порядке, что и при визуальном учёте, при этом окрашивание линий антигенов подлежало учёту при КП более КП<sub>нор.</sub>

Для оценки аналитической чувствительности тест-системы выполняли титрование Международного стандарта ВОЗ «Anti-hepatitis E Serum, Human» 95/584 NIBSC на отдельных антигенах ORF2 и ORF3 ВГЕ 1-го (ORF2(1), ORF3(1)) и 3-го (ORF2(3), ORF3(3)) генотипов. Лиофильно высушенный препарат стандарта восстанавливали согласно инструкции производителя и готовили его последовательные двукратные разведения, начиная от 10 МЕ/мл, используя раствор для разведения образцов из тест-системы «Блот-ВГЕ». На **рис. 2** представлены результаты титрования образца ВОЗ на рекомбинантных антигенах, сорбированных на стрипах нитроцеллюлозных мембран в двукратных разведениях от 70 до 0,5 мкг/мл. Аналитическая чувствительность разработанного экспериментального образца тест-системы составила 0,625 МЕ/мл при сорбции антигенов ORF2(1) и ORF2(3) в концентрации 8,75 мкг/мл и 2,5 МЕ/мл при сорбции антигенов ORF3(1) ORF3(3) в концентрации 35 мкг/мл.

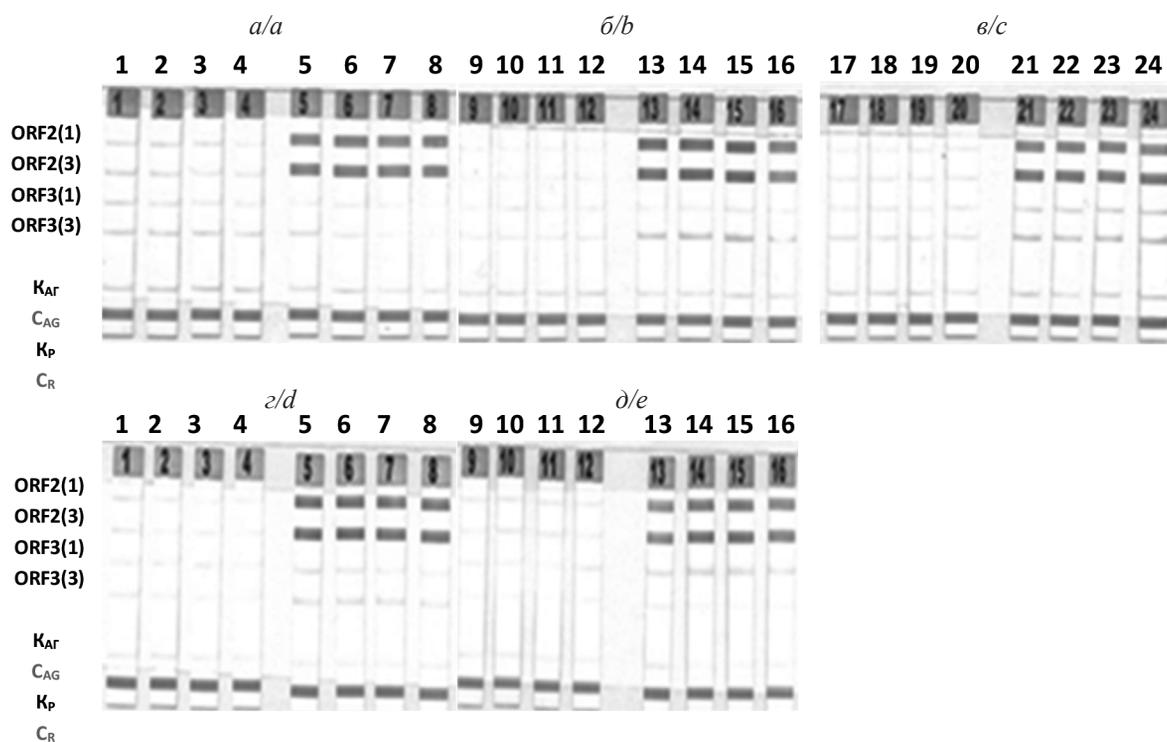
Аналитическую специфичность исследовали как способность теста обнаруживать только исследуемый аналит при наличии в пробе потенциально интерферирующих веществ или антител к возбудителям вирусных гепатитов и патологий печени иной этиологии. На искусственно смоделированных образцах сыворотки крови, содержащих потенциальные эндогенные интерференты, исследовано влияние на результат анализа с положительными и отрицательными образцами ЛП их нормальных и повышенных концентраций: ревматоидный фактор – 20 (норма), 40–50 и 80–90 МЕ/мл; церулоплазмин – 0,6 (норма), 1–3 и 6–8 г/л; триглицериды –

0,75 (норма), 3,75 и 7,5 мг/мл; глюкоза – до 6,1 (норма), 16,5 и 33,5 ммоль/л; билирубин – 20 (норма), 30–40 и 55–65 мкмоль/л. Анализ полученных результатов показал, что интенсивность окрашивания полос с рекомбинантными и контрольными антигенами не зависит от присутствия в образцах интерферирующих агентов (**рис. 3**).

Чувствительность экспериментального образца тест-системы «Блот-ВГЕ» вначале была оценена на положительных и отрицательных образцах контрольной панели производства ООО «НПО «Диагностические системы» (Россия). Из результатов, представленных в **табл. 1**, видно, что значения КП по отдельным антигенам, полученные в тест-системе «Блот-ВГЕ», в среднем превышают этот показатель при тестировании образцов методом ИФА.

При проведении испытаний с использованием сывороток ЛП была установлена 100% чувствительность и 100% специфичность экспериментального образца тест-системы «Блот-ВГЕ».

Диагностическую чувствительность и диагностическую специфичность тест-системы «Блот-ВГЕ» исследовали в сравнении с единственным коммерческим аналогом – зарегистрированной в России тест-системой «RecomLine HEV IgG/IgM», основанной на использовании рекомбинантных антигенов, содержащих С-концевые (антигены O2C(1) и O2C(3)), N-концевые (антигены O2N(1) и O2N(3)) фрагменты ORF2 ВГЕ 1-го и 3-го генотипов, срединного участка белка ORF2 ВГЕ 1-го генотипа (антиген O2M) и аминокислотные последовательности белков ORF3 (антигены O3(1) и O3(2)) ВГЕ 1-го и 3-го генотипов. Всего в обеих тест-системах в соответствии с ГОСТ Р 51352-2013 было исследовано 75 образцов ЛП (№ 1–75) и 30 образцов контрольной группы, содержащих специфические IgG-антитела к другим возбудителям вирусных гепатитов и инфекционной



**Рис. 3.** Влияние интерферентов на результаты реакции с отрицательными (верхний ряд: стрипы 1–4, 9–12, 17–20; нижний ряд: стрипы 1–4, 9–12) и положительными (верхний ряд: стрипы 5–8, 13–16, 21–24; нижний ряд: стрипы 8, 13–16) образцами лабораторной панели в присутствии возрастающих концентраций ревматоидного фактора (а), церулоплазмينا (б), триглицеридов (в), глюкозы (z), билирубина (d).

Контроль без добавки интерферентов: стрипы 1, 5, 9, 13, 17, 21 (верхний ряд); 1, 5, 9, 13 (нижний ряд).

**Fig. 3.** Influence of interfering substances on the reaction results with negative (upper row: strips 1–4, 9–12, 17–20, bottom row: strips 1–4, 9–12) and positive (upper row: strips 5–8, 13–16, 21–24, bottom row: strips 5–8, 13–16) samples from laboratory panel in the presence of increasing concentrations of rheumatoid factor (a), ceruloplasmin (b), triglycerides (c), glucose (d), bilirubin (e).

Controls without the addition of interfering substances: strips 1, 5, 9, 13, 17, 21 (upper row); strips 1, 5, 9, 13 (bottom row).

**Таблица 1.** Оценка чувствительности тест-системы «Блот-ВГЕ» на сыворотках контрольной панели

**Table 1.** Assessment of the sensitivity of the test system Blot-HEV on the sera of the control panel

Линии на полосе иммуносорбента Lines on the strip of immunosorbent	Образцы контрольной панели «Анти-HEV-G» (ООО «НПО «Диагностические системы», Россия) Samples of the "Anti-HEV-G control panel" (RPC Diagnostic Systems, Russia)							
	1+	2+	3+	4+	1-	2-	3-	4-
	Результаты исследования методом ЛИА (Блот-ВГЕ), КП The results of the study by the LIA method (Blot-HEV), COI							
1 – ORF2(1)	10,26	32,57	18,16	16,36	0,94	1,35	1,17	1,13
2 – ORF2(3)	14,13	37,86	20,10	17,17	0,93	0,93	0,93	1,00
3 – ORF3(1)	1,26	2,03	1,41	1,12	0,56	0,76	0,64	1,00
4 – ORF3(3)	1,02	2,41	1,54	0,87	0,64	0,62	0,64	0,81
5 – K <sub>Ag</sub>								
5 – C <sub>Ag</sub>	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
6 – K <sub>p</sub>								
6 – C <sub>R</sub>	15,36	39,11	13,93	15,60	9,23	8,86	7,44	9,03
	Результаты исследования методом ИФА, КП The results of the study by ELISA, COI							
ДС-ИФА-Анти-HEV-G DS-IFA-Anti-HEV-G	7,4	5,9	5,80	8	0,04	0,02	0,03	0,02
Вектоген E-IgG Vectogen E-IgG	17,1	10,8	14,2	20,3	0,87	0,87	0,74	0,5

**Примечание.** ЛИА – линейный иммуноанализ; ИФА – иммуноферментный анализ; КП – коэффициент позитивности.

**Note.** LIA – Line immunoassay, ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, COI – cut-off index.

**Таблица 2.** Результаты испытаний тест-системы «Блот-ВГЕ» в сопоставлении с набором «RecomLine HEV IgG/IgM» на образцах лабораторной панели и контрольной группы**Table 2.** Comparison of the test system Blot-HEV and a set “RecomLine HEV IgG/IgM” in testing of samples from LP and control group

№ образца Sample No.	Блот-ВГЕ Blot-HEV				Результат Result	RecomLine HEV IgG/IgM						Результат Result	
	Белковый «профиль» Protein «profile»					Белковый «профиль» Protein «profile»							
	ORF2(1)	ORF2(3)	ORF3(1)	ORF3(3)		O2N(1)	O2N(3)	O2M	O2C(1)	O2C(3)	O3(1)		O3(3)
<b>Образцы стандартной лабораторной панели Samples of a standard laboratory panel</b>													
1–12	+	+	-	-	Пол. Pos.	-	-	-	+	+	-	-	Пол. pos.
13–16	+	+	+	+	Пол. Pos.	-	-	-	+	+	+	-	Пол. Pos.
17–19	+	+	-	+	Пол. Pos.	-	-	-	+	+	-	-	Пол. Pos.
20, 21	+	+	+	+	Пол. Pos.	-	-	-	+	+	+	+	Пол. Pos.
22, 23	+	+	+	-	Пол. Pos.	-	-	-	-	+	-	-	Пол. Pos.
24, 25	+	+	-	+	Пол. Pos.	+	-	-	+	+	+	-	Пол. Pos.
26–75	-	-	-	-	Отр. Neg.	-	-	-	-	-	-	-	Отр. Neg.
<b>Контрольная группа Control group</b>													
76–80	-	-	-	-	Отр. Neg.	-	-	-	-	-	-	-	Отр. Neg.
81–85	-	-	-	-	Отр. Neg.	-	-	-	-	-	-	-	Отр. Neg.
86–90	-	-	-	-	Отр. Neg.	-	-	-	-	-	-	-	Отр. Neg.
91–95	-	-	-	-	Отр. Neg.	-	-	-	-	-	-	-	Отр. Neg.
96–100	-	-	-	-	Отр. Neg.	-	-	-	-	-	-	-	Отр. Neg.
101, 102	-	-	-	-	Отр. Neg.	-	-	-	-	-	-	-	Отр. Neg.
103	-	+	-	-	Н/о* U/d	-	-	-	-	-	-	-	Отр. Neg.
104, 105	-	-	-	-	Отр. Neg.	-	-	-	-	-	-	-	Отр. Neg.

**Примечание.** \* Пол. – положительный; Отр. – отрицательный; Н/о – неопределенный результат.

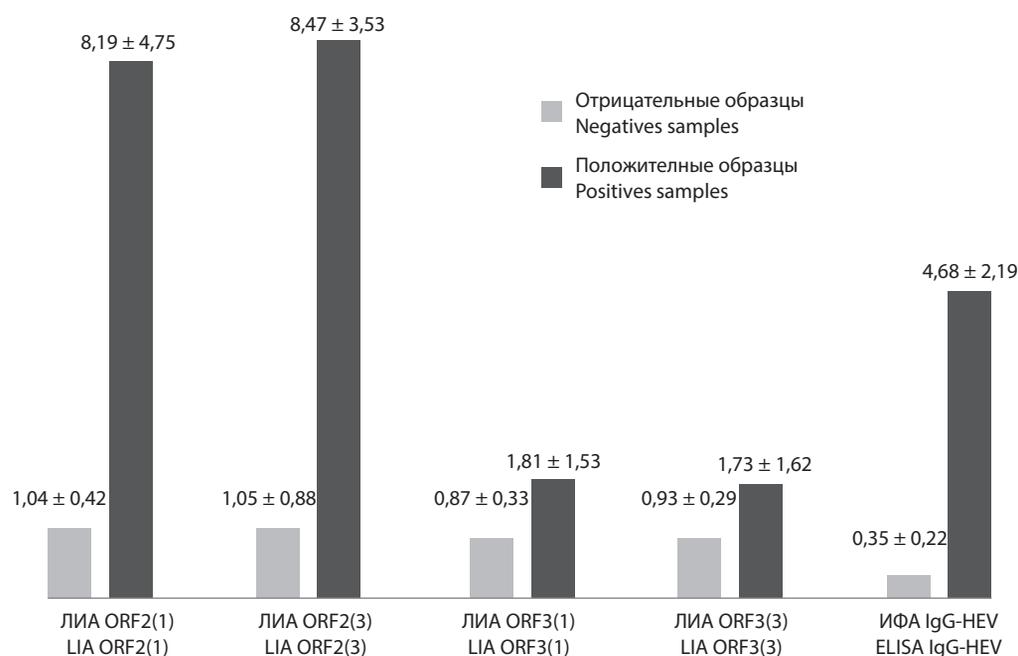
**Note.** \* Pos. – positive, Neg. – negative, U/d – undetermined result.

патологии печени – ВГА (№ 76–80), ВГВ (№ 81–85), ВГС (№ 86–90), цитомегаловирусу (№ 91–95), вирусу Эпштейна–Барр (№ 96–100), ВИЧ-1 (№ 101–105) (табл. 2). Проведён визуальный учёт результатов, поскольку только он предусмотрен инструкцией к набору «RecomLine HEV IgG/IgM».

В группе сывороток ЛП, содержащих IgG-антитела к ВГЕ, доля положительных результатов анализа в обеих тест-системах была одинаковой и составила 100%. В контрольной группе сывороток в наборе Блот-ВГЕ был получен один неопределённый результат при отрицательном в наборе сравнения. Таким образом, диагностическая эффективность экспериментального образца тест-системы «Блот-ВГЕ», оценённая в соответствии с Методическими рекомендациями ФГБУ «ВНИИМТ» Росздравнадзора от 03.08.2016, при исследовании 105 образцов сыворотки крови человека

(25 положительных и 80 отрицательных) относительно ограниченного количества экземпляров набора сравнения «RecomLine HEV IgG/IgM» соответствовала 92% чувствительности и 97% специфичности. О высокой диагностической специфичности разработанной тест-системы свидетельствует и отсутствие перекрёстных реакций с возбудителями гепатитов иной этиологии. Воспроизводимость тест-системы, рассчитанная на трёх лабораторных сериях её экспериментального образца по величине КП для каждого из антигенов на четырёх положительных образцах ЛП, соответствует коэффициенту вариации от 6,29 до 12,43%, что не превышает допустимых пределов (менее 15%).

Изучение стабильности экспериментального образца тест-системы в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 23640-2015 показало, что тест-система



**Рис. 4.** Испытание тест-системы «Блот-ВГЕ» (линейный иммуноанализ, ЛИА) на образцах, типированных в тест-системе «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (иммуноферментный анализ, ИФА).

Цифрами указаны средние значения коэффициента позитивности.

**Fig. 4.** Performance of “Blot-HEV” test system (Line immunoassay, LIA) with samples tested using «DS-IFA-ANTI-HEV-G» kit (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA).

Average values of the cut-off index are indicated by numbers.

ма сохраняет свои диагностические характеристики в течение 3 нед хранения в условиях ускоренного старения, что соответствует 12 мес хранения при температуре от 4 до 8 °С, остаётся стабильной в условиях лабораторного моделирования транспортирования в течение 3 сут при температуре от 9 до 30 °С, а все её готовые компоненты после вскрытия индивидуальной упаковки сохраняют стабильность в течение 2 мес.

С целью уточнения практической значимости тест-системы «Блот-ВГЕ», протестированы 134 образца сывороток, из них 68 были положительными в тест-системе «ДС-ИФА-Анти-HEV-G». Подтверждено присутствие IgG-антител к ВГЕ во всех положительных образцах. При исследовании сывороток крови контрольной группы отрицательные результаты были получены в 65 случаях, с одним образцом получен слабоположительный результат, причём произошло окрашивание линий с антигенами ORF2(1) и ORF2(3). Средние значения КП положительных образцов, определённые с помощью тест-системы «Блот-ВГЕ» по антигенам ORF2(1) и ORF2(3), превышали данный показатель, определённый методом ИФА (рис. 4). Для антигенов ORF3 ВГЕ 1-го и 3-го генотипов показано более редкое и менее выраженное взаимодействие с положительными образцами.

### Обсуждение

ЛИА является альтернативой классическому иммуноблоттингу, или вестерн-блоту. Известно, что по чувствительности и специфичности тесты, осно-

ванные на ЛИА, не уступают вестерн-блоту, а также превосходят по этим показателям ИФА за счёт анализа взаимодействия антител с несколькими индивидуальными антигенами инфекционного агента, представленными в большем содержании, чем позволяет сорбционная ёмкость планшета для ИФА. В настоящее время этот метод признан «золотым стандартом» для подтверждения результатов ИФА. Нами разработан первый отечественный экспериментальный образец тест-системы, предназначенной для определения IgG-антител к индивидуальным белкам ВГЕ в сыворотке крови человека методом ЛИА для подтверждения положительных или уточнения сомнительных результатов ИФА. В тест-системе используются очищенные рекомбинантные антигены, что гарантирует воспроизводимо высокую чувствительность и специфичность. Применение гомологичных белков двух разных генотипов вируса обеспечивает эффективность применения теста для анализа образцов не только из высокоэндемичных регионов, но и из регионов с невысокой спорадической заболеваемостью или преобладанием завозных случаев ГЕ.

Результаты сравнительных испытаний позволили заключить, что разработанная тест-система практически не уступает импортному коммерческому аналогу по показателям чувствительности и специфичности. Кроме того, она превосходит его по ряду потребительских свойств. В частности, все её компоненты представлены в жидком виде, в её составе есть положительный и отрицательный контрольные образцы,

а также предусмотрена возможность 16–18-часовой ночной постановки, которая часто бывает более удобна при проведении клинических исследований. Важным преимуществом тест-системы является также цифровой учёт результатов с использованием общедоступного офисного оборудования.

Выявление специфических антител в отрицательном образце по результатам тестирования в ИФА-наборе может свидетельствовать о более высокой чувствительности тест-системы «Блот-ВГЕ». В пользу такой трактовки результатов свидетельствуют отсутствие в антигенной основе тест-системы, в которой были отобраны образцы, белков ВГЕ 3-го генотипа [15], а также особенности конструкции используемых в тест-системе «Блот-ВГЕ» рекомбинантных антигенов, содержащих более протяжённый участок белков ORF2, а следовательно, и дополнительные вирусспецифические эпитопы. Более редкое и менее выраженное взаимодействие с положительными образцами белков ORF3 ВГЕ 1-го и 3-го генотипов можно объяснить тем, что данные антигены индуцируют преимущественно образование IgM- и ранних IgG-антител [7], а отбор образцов опытной группы проводили на тест-системе, содержащей в антигенной основе фрагменты белка ORF2 ВГЕ и предназначенной для выявления IgG-антител.

Учитывая различия в результатах, получаемых с применением производимых разными компаниями тест-систем [16, 17], проблема разработки надёжных тестов для подтверждающей диагностики ГЕ и их стандартизации остаётся актуальной. В частности, пока не решена задача по созданию тестов, подтверждающих наличие специфических IgM-антител – важного маркера ранней стадии заболевания, когда IgG-антител ещё не вырабатываются, а период вирусемии продолжается и больной ГЕ является источником инфекции. В качестве развития выбранного направления исследований запланирована разработка метода ЛИА для выявления антител класса IgM к белкам ORF2 и ORF3 ВГЕ 1-го и 3-го генотипов.

Следует отметить, что корректная диагностика ГЕ должна обеспечиваться комплексным анализом всех лабораторных (биохимических, серологических, молекулярно-генетических) показателей и клинических проявлений заболевания [3].

### Выводы

1. Разработана первая отечественная тест-система «Блот-ВГЕ» для выявления IgG-антител к индивидуальным белкам ВГЕ в сыворотке крови человека методом ЛИА с применением ранее полученных авторами рекомбинантных ORF2 и ORF3 ВГЕ 1-го и 3-го генотипов.

2. Аналитическая чувствительность тест-системы по Международному стандарту ВОЗ «Anti-hepatitis E Serum, Human» 95/584 NIBSC составила 0,625 МЕ/мл для антигенов ORF2 и 2,5 МЕ/мл для антигенов ORF3. Чувствительность тест-системы в сравнении с коммерческим аналогом – набором «RecomLine HEV IgG/IgM» (Mikrogen Diagnostik GmbH, Германия) – составила 92%, специфичность – 97%.

3. Доказано отсутствие влияния эндогенных интерферонов и отсутствие перекрёстных реакций с антителами к возбудителям гепатитов иной этиологии на результаты анализа.

4. Определён срок годности тест-системы «Блот-ВГЕ» в заданных условиях хранения – 12 мес.

5. Разработанная тест-система может применяться для подтверждения результатов ИФА в лабораторной диагностике ГЕ.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Favorov M.O., Fields H.A., Purdy M.A., Yashina T.L., Aleksandrov A.G., Alter M.J., et al. Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. *J. Med. Virol.* 1992; 36(4): 246-50. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.1890360403>
2. Khudyakov Y.E., Kamili S. Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus Res.* 2011; 161(1): 84-92. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.06.006>
3. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. *J. Hepatol.* 2018; 68(6): 1256-71. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.005>
4. Kodani M., Kamili N.A., Tejada-Strop A., Poe A., Denniston M.M., Drobeniuc J., et al. Variability in the performance characteristics of IgG anti-HEV assays and its impact on reliability of seroprevalence rates of hepatitis E. *J. Med. Virol.* 2017; 89(6): 1055-61. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.24741>
5. Hartl J., Otto B., Madden R.G., Webb G., Woolson K.L., Kriston L., et al. Hepatitis E seroprevalence in Europe: a meta-analysis. *Viruses.* 2016; 8(8): 211. DOI: <http://doi.org/10.3390/v8080211>
6. Mikrogen. recomLine HEV IgG/IgM. Available at: <https://mikrogen.de/english/deutschland/products/product-overview/testsystem/hev-iggigm.html>
7. Ma H., Song X., Li Z., Harrison T.J., Zhang H., Huang W., et al. Varying abilities of recombinant polypeptides from different regions of hepatitis E virus ORF2 and ORF3 to detect anti-HEV immunoglobulin M. *J. Med. Virol.* 2009; 81(6): 1052-61. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.21484>
8. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Амиантова И.И., Доценко В.В. и др. Рекомбинантный белок, содержащий антигенно-значимые фрагменты белков вируса гепатита Е, используемый в тест-системах для серодиагностики гепатита Е (варианты). Патент РФ № 2711907С2; 2020.
9. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Доценко В.В., Амиантова И.И. и др. Получение рекомбинантного белка ORF3 вируса гепатита Е 1-го генотипа с применением метода оптимизации кодонов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2017; 94(6): 63-72. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-6-63-72>
10. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Доценко В.В., Амиантова И.И. и др. Получение рекомбинантного аналога капсидного белка вируса гепатита Е первого генотипа: клонирование, экспрессия, очистка, оценка антигенных свойств. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2017; 94(6): 72-80. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-6-72-80>
11. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Милованова А.В., Аммури Ю.И. и др. Получение рекомбинантного белка ORF3 вируса гепатита Е 3 генотипа и оценка его антигенных свойств. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2018; 95(5): 46-53. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-5-46-53>
12. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Доценко В.В., Амиантова И.И. и др. Разработка рекомбинантного белка капсида вируса гепатита е третьего генотипа: клонирование, экспрессия, очистка, оценка антигенных свойств. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2019; 96(1): 10-7. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-10-17>
13. Алаторцев В.Е., Алаторцева Г.И. Штамм бактерий *Escherichia coli*, используемый для получения рекомбинантных белков. Патент РФ № 2043409; 1992.

14. Алаторцев В.Е., Алаторцева Г.И. Вектор pEL5a, предназначенный для экспрессии чужеродной ДНК. Патент РФ № 2071501; 1992.
15. Ulanova T.I., Obriadina A.P., Talekar G., Burkov A.N., Fields H.A., Khudyakov Y.E. A new artificial antigen of the hepatitis E virus. *J. Immunoassay Immunochem.* 2009; 30(1): 18-39. DOI: <http://doi.org/10.1080/15321810802570269>
16. Avellon A., Morago L., Garcia-Galera del Carmen M., Munoz M., Echevarria J.M. Comparative sensitivity of commercial tests for hepatitis E genotype 3 virus antibody detection. *J. Med. Virol.* 2015; 87(11): 1934-9. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.24251>
17. Al-Sadeq Duaa W., Majdalawieh A.F., Mesleh A.G., Abdalla O.M., Nasrallah G.K. Laboratory challenges in the diagnosis of hepatitis E virus. *J. Med. Microbiol.* 2018; 67(4): 466-80. DOI: <http://doi.org/10.1099/jmm.0.000706>

#### REFERENCES

1. Favorov M.O., Fields H.A., Purdy M.A., Yashina T.L., Aleksandrov A.G., Alter M.J., et al. Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. *J. Med. Virol.* 1992; 36(4): 246-50. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.1890360403>
2. Khudyakov Y.E., Kamili S. Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus Res.* 2011; 161(1): 84-92. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.06.006>
3. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. *J. Hepathol.* 2018; 68(6): 1256-71. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.005>
4. Kodani M., Kamili N.A., Tejada-Strop A., Poe A., Denniston M.M., Drobeniuc J., et al. Variability in the performance characteristics of IgG anti-HEV assays and its impact on reliability of seroprevalence rates of hepatitis E. *J. Med. Virol.* 2017; 89(6): 1055-61. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.24741>
5. Hartl J., Otto B., Madden R.G., Webb G., Woolson K.L., Kriston L., et al. Hepatitis E seroprevalence in Europe: a meta-analysis. *Virus-es.* 2016; 8(8): 211. DOI: <http://doi.org/10.3390/v8080211>
6. Mikrogen. recomLine HEV IgG/IgM. Available at: <https://mikrogen.de/english/deutschland/products/product-overview/testsystem/hev-iggigm.html>
7. Ma H., Song X., Li Z., Harrison T.J., Zhang H., Huang W., et al. Varying abilities of recombinant polypeptides from different regions of hepatitis E virus ORF2 and ORF3 to detect anti-HEV immunoglobulin M. *J. Med. Virol.* 2009; 81(6): 1052-61. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.21484>
8. Alatorseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., Lukhverchik L.N., Amiantova I.I., Dotsenko V.V., et al. Recombinant protein contain-

- ing antigenically significant fragments of hepatitis E virus proteins, used in test kits for serodiagnosis of hepatitis E (options). Patent RF № 2711907C2; 2020. (in Russian)
9. Alatorseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., Lukhverchik L.N., Dotsenko V.V., Amiantova I.I., et al. Design of hepatitis E virus genotype 1 recombinant ORF3 protein by codon optimization method. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2017; 94(6): 63-72. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-6-63-72> (in Russian)
10. Alatorseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., Lukhverchik L.N., Dotsenko V.V., Amiantova I.I., et al. Design of hepatitis E virus genotype 1 recombinant capsid protein: cloning, expression, purification, evaluation of the antigenic properties. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2017; 94(6): 72-80. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-6-72-80> (in Russian)
11. Alatorseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., Lukhverchik L.N., Milovanova A.V., Ammur Yu.I., et al. Obtaining the recombinant ORF3 protein of hepatitis E genotype 3 and evaluation of its antigenic properties. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2018; 95(5): 46-53. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-5-46-53> (in Russian)
12. Alatorseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., Lukhverchik L.N., Dotsenko V.V., Amiantova I.I., et al. Development of hepatitis E 3 genotype recombinant protein capsid of: cloning, expression, purification, evaluation of the antigenic properties. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2019; 96(1): 10-7. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-10-17> (in Russian)
13. Alatorsev V.E., Alatorseva G.I. Escherichia coli bacterial strain used to produce recombinant proteins. Patent RF № 2043409; 1992. (in Russian)
14. Alatorsev V.E., Alatorseva G.I. Vector pEL5a designed for the expression of foreign DNA. Patent RF № 2071501; 1992. (in Russian)
15. Ulanova T.I., Obriadina A.P., Talekar G., Burkov A.N., Fields H.A., Khudyakov Y.E. A new artificial antigen of the hepatitis E virus. *J. Immunoassay Immunochem.* 2009; 30(1): 18-39. DOI: <http://doi.org/10.1080/15321810802570269>
16. Avellon A., Morago L., Garcia-Galera del Carmen M., Munoz M., Echevarria J.M. Comparative sensitivity of commercial tests for hepatitis E genotype 3 virus antibody detection. *J. Med. Virol.* 2015; 87(11): 1934-9. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.24251>
17. Al-Sadeq Duaa W., Majdalawieh A.F., Mesleh A.G., Abdalla O.M., Nasrallah G.K. Laboratory challenges in the diagnosis of hepatitis E virus. *J. Med. Microbiol.* 2018; 67(4): 466-80. DOI: <http://doi.org/10.1099/jmm.0.000706>



## Результаты исследования распространённости и активности циркуляции парвовируса B19 (*Parvoviridae*, *Parvovirinae*, *Erythroparvovirus*, *Primate erythroparvovirus 1*) среди социально значимых категорий населения

Никишов О.Н.<sup>1</sup>, Кузин А.А.<sup>1</sup>, Зобов А.Е.<sup>1</sup>, Лаврентьева И.Н.<sup>2</sup>, Антипова А.Ю.<sup>2</sup>, Останкова Ю.В.<sup>2</sup>, Хамитова И.В.<sup>2</sup>, Никишов С.Н.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Минобороны России, 194044, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup> ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Роспотребнадзора, 197101, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup> ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва», 430005, Саранск, Россия

В настоящее время наряду с возрастающей потребностью медицинских организаций в препаратах крови ощущаются и недостатки существующей системы, поскольку не для всех инфекций с гемоконтактным механизмом передачи разработаны алгоритмы лабораторного обследования доноров крови. Примером может служить инфекция, вызываемая парвовирусом B19.

**Цель** исследования – изучение распространённости носительства маркеров гуморального иммунитета и активности циркуляции возбудителей парвовирусной инфекции среди социально значимых категорий населения.

**Материал и методы.** Материалами исследования послужили образцы крови от доноров, проживающих в Санкт-Петербурге, а также изоляты парвовируса B19, выделенные из ДНК-положительных образцов плазмы.

**Результаты и обсуждение.** По результатам лабораторного обследования доноров была установлена высокая доля носителей вирусспецифических антител класса IgG, что свидетельствует о перенесённой ранее парвовирусной инфекции B19 и иллюстрирует её высокую распространённость в данной социально значимой группе. По результатам исследования препаратов крови с помощью метода полимеразной цепной реакции в значительном числе образцов обнаружена ДНК парвовируса B19. Это указывает на остропотекающий инфекционный процесс парвовирусной инфекции у обследованных доноров и обуславливает высокую эпидемическую опасность получаемых от них гемопродуктов. В результате секвенирования и филогенетического анализа фрагмента гена *VP1* у исследуемых изолятов выявлена принадлежность к генотипу A1 и его подтипу 1A2, что показывает наибольшее сходство с генотипами парвовируса B19, циркулирующими в странах Евросоюза и Азии. Кроме того, были выделены два неизвестных ранее изолята парвовируса B19, нуклеотидные последовательности которых депонированы в международную базу данных GenBank.

**Заключение.** По итогам работы обоснована целесообразность включения тестирования проб крови на маркеры парвовирусной инфекции B19 в алгоритмы лабораторного обследования доноров, что позволит обеспечить предупреждение гемоконтактного заражения реципиентов крови парвовирусом B19.

**Ключевые слова:** парвовирус B19; филогенетический анализ; секвенирование; доноры; аминокислотные последовательности; вирусная безопасность.

**Для цитирования:** Никишов О.Н., Кузин А.А., Зобов А.Е., Лаврентьева И.Н., Антипова А.Ю., Останкова Ю.В., Хамитова И.В., Никишов С.Н. Результаты исследования распространённости и активности циркуляции парвовируса B19 (*Parvoviridae*, *Parvovirinae*, *Erythroparvovirus*, *Primate erythroparvovirus 1*) среди социально значимых категорий населения. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(3): 143-149.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-143-149>

**Для корреспонденции:** Никишов Олег Николаевич, преподаватель кафедры общей и военной эпидемиологии ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, 194044, Санкт-Петербург. E-mail: [nikishov.oleg2015@yandex.ru](mailto:nikishov.oleg2015@yandex.ru)

**Участие авторов:** Никишов О.Н. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание текста; Кузин А.А. – концепция и дизайн исследования, написание текста, редактирование; Зобов А.Е. – сбор данных литературы, статистическая обработка, редактирование; Лаврентьева И.Н. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание текста, редактирование; Антипова А.Ю. – сбор и обработка материала, статистическая обработка; Останкова Ю.В. – сбор и обработка материала; Хамитова И.В. – сбор и обработка материала, редактирование; Никишов С.Н. – сбор данных литературы, редактирование.

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

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

Поступила 15.05.2020

Принята в печать 09.06.2020

## Results of a study of parvovirus B19 (*Parvoviridae*, *Parvovirinae*, *Erythroparvovirus*, *Primate erythroparvovirus 1*) prevalence and circulation activity in socially significant categories of the population

Oleg N. Nikishov<sup>1</sup>, Alexander A. Kuzin<sup>1</sup>, Andrey E. Zobov<sup>1</sup>, Irina N. Lavrentieva<sup>2</sup>, Anastasiya Yu. Antipova<sup>2</sup>, Yuliya V. Ostankova<sup>2</sup>, Irina V. Khamitova<sup>2</sup>, Sergey N. Nikishov<sup>3</sup>

<sup>1</sup> S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, 194044, Russia;

<sup>2</sup> Saint Petersburg Pasteur Institute, Saint Petersburg, 197101, Russia;

<sup>3</sup> National Research Mordovian State University named after N.P. Ogarev, Saransk, 430005, Russia

Currently, along with the increasing need of medical organizations for blood preparations, algorithms for laboratory testing of blood donors are not available for all infections with hemo-contact mechanism of transmission. A representative example is infection caused by parvovirus B19.

**Purpose of the study.** The article presents the results of the original study, the purpose of which was to study the prevalence of antibodies to parvovirus B19 and the activity of the circulation of this virus in socially important categories of the population.

**Material and methods.** The materials of the study were blood samples from blood donors of Saint Petersburg, as well as parvovirus B19 sequences isolated from DNA-positive plasma samples.

**Results and discussion.** According to the results of the laboratory examination, a high proportion of carriers of virus-specific IgG antibodies was found in studied group of donors, which confirms the previous infection of parvovirus B19 in them and illustrates the high prevalence of infection in this socially significant group. Based on the results of the blood preparations testing, the presence of parvovirus DNA B19 in a significant number of samples was determined by polymerase chain reaction method. This indicates an current parvovirus infection in the examined donors and points to a high epidemiological risk of the blood products obtained from them. Sequencing and phylogenetic analysis of a fragment of the VP1 gene demonstrated that the studied isolates belonged to A1 genotype and its subtype 1A2, which correlates with the genotypes of parvovirus B19 circulating in the European Union and Asia. In addition, two previously unknown B19 parvovirus isolates were isolated, the nucleotide sequences of which were deposited into the international GenBank database.

**Conclusion.** Based on the results of the study, it is justified to include testing of blood samples for markers of B19 parvovirus infection in existing algorithms of laboratory examination of donors, which will ensure prevention of hemo-contact infection of blood recipients with parvovirus B19.

**Keywords:** *parvovirus B19; phylogenetic analysis; sequencing; donors; amino acid sequences; viral safety.*

**For citation:** Nikishov O.N., Kuzin A.A., Zobov A.E., Lavrentieva I.N., Antipova A.Yu., Ostankova Yu.V., Khamitova I.V., Nikishov S.N. Results of a study of parvovirus B19 (*Parvoviridae*, *Parvovirinae*, *Erythroparvovirus*, *Primate erythroparvovirus 1*) prevalence and circulation activity in socially significant categories of the population. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology)*. 2020; 65(3): 143-149. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-143-149>

**For correspondence:** Oleg N. Nikishov, teacher of the Department (general and military epidemiology), S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, 194044, Russia. E-mail: [nikishov.oleg2015@yandex.ru](mailto:nikishov.oleg2015@yandex.ru)

### Information about the authors:

Nikishov O.N., <https://orcid.org/0000-0002-3677-1734>

Kuzin A.A., <https://orcid.org/0000-0001-9154-7017>

Zobov A.E., <https://orcid.org/0000-0001-7791-8993>

Lavrentieva I.N., <https://orcid.org/0000-0002-2188-6547>

Antipova A.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-7763-535X>

Ostankova Yu.V., <https://orcid.org/0000-0003-2270-8897>

Khamitova I.V., <https://orcid.org/0000-0003-1966-7860>

Nikishov S.N., <https://orcid.org/0000-0002-1573-6825>

**Contribution:** Nikishov O.N. – concept and design of research, material collection and processing, text writing; Zobov A.E. – literature data collection, statistical processing, text editing; Kuzin A.A. – concept and design of research, text writing and editing; Lavrentieva I.N. – concept and design of research, material collection and processing, text writing and editing; Antipova A.Yu. – material collection and processing, statistical processing; Ostankova Yu.V. – material collection and processing; Khamitova I.V. – material collection and processing, text editing; Nikishov S.N. – literature data collection, text editing;

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

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

Received 15 May 2020

Accepted 09 June 2020

## Введение

В настоящее время потребность медицинских организаций в препаратах крови значительно возросла, что связано с совершенствованием оказания медицинской помощи населению, особенно с внедрением специализированных высокотехнологичных методов лечения. При этом принципиально важно использование для этих целей сырья, либо полностью освобождённого от гемоконтактных вирусов, либо имеющего минимальную вирусную нагрузку [1, 2]. Данное требование закреплено постановлением Правительства РФ от 22.06.2019 № 797 в Правилах заготовки, хранения, транспортировки и клинического использования донорской крови и её компонентов.

Эпидемиологическая безопасность гемотрансфузий – один из важных компонентов профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи [2]. Предупреждение гемоконтактной передачи возбудителей вирусной природы (гепатиты В, С, D, ВИЧ-инфекция) является её обязательным элементом. В отношении данных инфекций осуществляется эпидемиологический мониторинг и нормативно закреплены алгоритмы лабораторного обследования лиц, являющихся донорами крови. Вместе с тем известны вирусные инфекции, которые могут распространяться посредством гемоконтактного механизма передачи.

К ним относится парвовирусная инфекция человека (ПВИ) В19, впервые обнаруженная Y. Cossart и соавт. при тестировании пробы плазмы крови от здорового донора на вирусный гепатит В [3]. Наименование возбудителя: парвовирус В19 (далее – PV В19) – связано с обозначением лунки лабораторного планшета, где находился исследуемый биологический материал плазмы крови, из которого был выделен патоген.

Гемоконтактный механизм передачи PV В19 особенно актуален для пациентов гематологического и хирургического профиля, являющихся реципиентами препаратов крови. Поэтому с позиции эпидемиологии весьма важно, что устойчивость PV В19 к традиционным режимам дезинфекции (стерилизации) обуславливает эпидемиологическую опасность продуктов крови, особенно со значительной вирусной нагрузкой ( $\geq 10^4$  копий/мл), как фактора передачи данной инфекции, способного приводить к заражению до 50% реципиентов [4, 5]. Кроме того, известно, что при развитии острой ПВИ в крови появляются нейтрализующие антитела, а собственно период вирусемии, несмотря на сравнительно малую продолжительность (не более 3 нед), сопровождается высокой концентрацией ДНК PV В19 в крови ( $\geq 10^{12}$  копий/мл) [6]. В свою очередь появление специфических антител класса IgM к PV В19, циркулирующих в крови до 3 мес, сопряжено со снижением уровня вирусной ДНК, а антитела класса IgG к PV В19, обеспечивающие напряжённый иммунитет, появляются в крови начиная с 14–15-го дня от начала заболевания [7, 8]. В связи с этим обнаружение в крови доноров антител того или иного класса может свидетельствовать о наличии или отсутствии острой ПВИ и, соответственно, об уровне эпидемиологической опасности данной кроводачи.

Таким образом, роль серопозитивных к PV В19 доноров крови в развитии эпидемического процесса ПВИ весьма значима, однако их активное выявление в нашей стране, к сожалению, не предусмотрено. При этом в некоторых странах Европы и в США, в отличие от Российской Федерации, внедрены прямые указания на тестирование крови доноров на PV В19 наряду с возбудителями других гемоконтактных инфекций (гепатиты В, С, D и др.).

**Цель** исследования – изучение распространённости носительства маркеров гуморального иммунитета и активности циркуляции возбудителей ПВИ среди социально значимых категорий населения (на примере результатов обследования доноров крови, проживающих в Санкт-Петербурге).

## Материал и методы

500 образцов плазмы крови доноров из Санкт-Петербурга исследовали на маркеры ПВИ – IgG-антитела и ДНК вируса.

Использовали эпидемиологические (эпидемиологический анализ), математико-статистические, молекулярно-генетические (диагностику методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), секвенирование, филогенетический анализ) и серологический (иммуноферментный анализ, ИФА) методы исследования.

Для лабораторной диагностики ПВИ применяли ИФА – стандартный метод определения вирусспецифических антител [9]. Антитела к PV В19 классов IgM и IgG выявляли с помощью тест-систем «recomWELLParvovirus В19 IgM» и «recomWELLParvovirus В19 IgG» (Microgen GmbH, Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Методом ПЦР с помощью диагностического набора реагентов «АмплиСенс®Parvovirus В19-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) определяли наличие ДНК PV В19 и вирусную нагрузку положительных образцов плазмы серопозитивных к PV В19 доноров. ДНК для генотипирования выделяли из образцов с наибольшей вирусной нагрузкой.

Выделенную ДНК амплифицировали по методике, описанной ранее [10, 11]. Генотипирование проводили по участку (локусу), по которому кодируется фрагмент гена *NS1* и область гена *VP1* (VP1u) возбудителя, что необходимо для филогенетического анализа изолятов PV В19. Для этого использовали специфические праймеры (ООО «Синтол», Россия), которые подбирали с помощью программы NCBI/Primer-BLAST с учётом данных литературы и в соответствии с общепринятыми рекомендациями.

В работе были использованы праймеры:

ParvoB19 1F CAATTGTCACAGACACCAGTA;

ParvoB19 2F CCCGCGCTCTAGTACGCCCA и ParvoB19 1R ACTTAGCCAGTTGGCTATACCT;

ParvoB19 2R TTGCGGGGGCCAGCTTGTA.

Секвенирующую реакцию проводили в соответствии с инструкцией к набору реагентов ABI PRISM BigDyeTerminator v3.1 (Applied Biosystems, США) в трёх повторах, на прямых и обратных праймерах. Очищенный осадок денатурировали в формамиде.

Продукт секвенирующей реакции анализировали на специальном оборудовании – генетическом анализаторе ABI Prism 3500 (Applied Biosystems, США).

При исследовании генетических элементов использовали программу NCBI Blast с выравниванием последовательностей нуклеотидов посредством программы MEGA 7.0 (алгоритм CluslW). Полученные результаты сравнивали с международными данными, представленными в GenBank. В филогенетическом анализе методом «присоединения соседей» оценивали расстояние между нуклеотидными последовательностями и строили филогенетическое дерево с учётом критерия сбалансированной эволюции. Кроме того, проведён бутстреп-анализ для 500 доноров, что позволило оценить достоверность построенного филогенетического дерева возбудителя.

Математические расчёты и статистический анализ выполнены с использованием методов, применяемых в медицинских исследованиях. При этом вычисляли частотные показатели и определяли 95% доверительный интервал (ДИ) по методу Вальда–Уилсона.

### Результаты

В результате проведённых исследований у 426 (85,2%) обследованных в сыворотках крови были обнаружены вирусспецифические антитела класса IgG. С одной стороны, это свидетельствует о перенесённой ПВИ В19, а с другой – показывает её распространённость в данной социально значимой группе населения (см. таблицу).

Как показали результаты исследований, в общей когорте обследованных доноров оказалось 79,4 (95% ДИ 75,6–83,2) мужчин и 5,8 (95% ДИ 3,9–7,7) женщин, серопозитивных к PV В19, на 100 человек. При этом наибольшая частота Ig-маркеров PV В19 выявлена в возрастной группе 18–20 лет: 38,0, особенно среди мужчин (37,0). В то же время среди лиц 40 лет отмечена невысокая распространённость маркеров специфического противовирусного иммунитета: 4,4 у мужчин и 1,8 у женщин на 100 обследованных.

Для определения вирусной нагрузки 426 (85,2%) образцов крови доноров, содержащих IgG-антитела к PV В19, были исследованы методом ПЦР. В результате в 17,4% пробах плазмы крови обнаружена вирусспецифическая ДНК, подтверждающая наличие

PV В19 у доноров. При этом отмечена неоднородность вирусной нагрузки: в 13,5% случаев ДНК PV В19 составила  $10^4$  копий/мл, в 1,6% –  $10^4$ – $10^5$  и в 2,4% – более  $10^5$ . С одной стороны, это свидетельствует об острой ПВИ В19, а с другой – об эпидемической опасности таких гемопродуктов, особенно при значительной вирусной нагрузке. Полученный вывод согласуется с данными как отечественных, так и зарубежных исследователей [4, 9, 12, 13].

Была проанализирована частота встречаемости ДНК PV В19 в зависимости от возраста доноров: 18–20 лет (1-я группа), 21 год – 30 лет (2-я группа), 31 год – 40 лет (3-я группа), 41 год и старше (4-я группа). Анализ показал, что 67,6% положительных проб ПЦР были получены от доноров 1-й группы. Кроме того, в основном у лиц этой группы были обнаружены образцы плазмы крови с высокой вирусной нагрузкой ( $10^4$ – $10^8$  копий/мл ДНК PV В19). Среди доноров 2-й группы (21 год – 30 лет) доля лиц с высокой вирусной нагрузкой в клиническом материале составила 28,4%, в 3-й и 4-й возрастных группах – по 2%.

Из образцов плазмы крови с вирусной нагрузкой  $10^6$ – $10^7$  копий/мл ДНК PV В19 были выделены два изолята PV В19 – RUS15.15 и RUS15.15.2, их нуклеотидные последовательности депонированы в международную базу данных GenBank: MG779501 и MG779500 соответственно. Полученные последовательности MG779501 и MG779500 оказались идентичными.

При сравнении с референсным изолятом NC000883 из базы GenBank в изолятах RUS 15.15 и RUS 15.15.2 были отмечены изменения качественного состава аминокислот, связанные с мутациями на генном уровне (VP1, VP1u). Выявлены уникальные значимые мутации в следующих последовательностях аминокислот: E14K, V30L, S98N, D107N. Здесь необходимо отметить, что в структурном белке PV В19 (VP1, VP1u) имеется уникальная область, которая является своеобразной антигенной мишенью, нейтрализуемой специфическими антителами. Поэтому происходящие в этой области мутации могут способствовать распространению новых генотипов PV В19 в популяции людей. Однако требуются дополнительные исследования, результаты которых позволят установить эпидемиологическую значимость таких мутаций.

IgG-маркеры ПВИ В19 у доноров по гендерным и возрастным признакам, на 100 человек (95% доверительный интервал)

Prevalence of IgG antibodies to parvovirus B19 in donors by gender and age, per 100 people (95% CI)

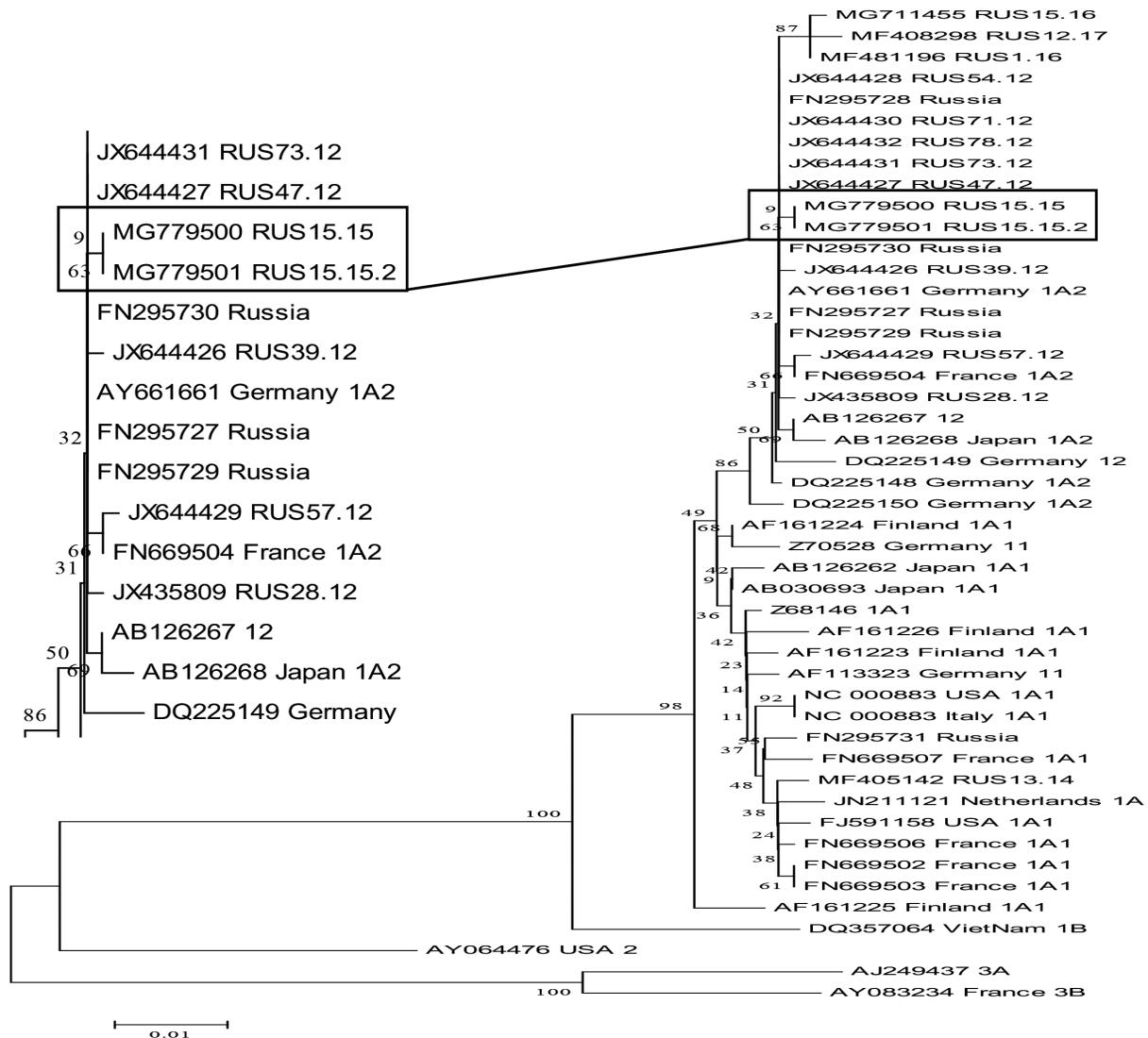
Возраст, годы Age group	Пол Sex		Итого Total
	мужчины Men	женщины Women	
18–20	37,0 (33,1–40,9)	1,0 (0,9–1,1)	38,0 (33,9–42,1)
21–30	27,2 (24,7–29,7)	1,8 (1,2–2,4)	29,0 (24,8–33,2)
31–40	10,8 (9,3–12,3)	1,2 (0,7–1,7)	12,0 (9,9–14,1)
41–50	3,2 (2,8–3,6)	1,4 (0,8–2,0)	4,6 (3,4–5,8)
51–60	1,2 (0,9–1,5)	0,4 (0,1–0,7)	1,6 (0,7–2,5)
Всего... Total...	79,4 (75,6–83,2)	5,8 (3,9–7,7)	85,2 (82,5–87,9)

Для филогенетического анализа полученные в данном исследовании нуклеотидные последовательности группировали с последовательностями наиболее широко распространённого в мире генотипа 1A. Генотип 1A включает два клады: 1A1 и 1A2. По результатам генотипирования обнаруженные изоляты отнесены к подтипу 1A2. Похожие на RUS15.15 и RUS15.15.2 последовательности PV B19 были выделены и депонированы в GenBank из Российской Федерации, из европейских (Франция, Германия) и азиатских стран (Япония), что подтверждает значительную распространённость инфекции, связанной с PV B19 (см. рисунок).

**Обсуждение**

К настоящему времени известно три генотипических варианта PV B19, которые на 10–15% различают-

ся по нуклеотидному составу [14–16]. При всём разнообразии на генетическом уровне существует только один серотип этого возбудителя [9, 17, 18]. Эпидемиологическую значимость представляет исследование, направленное на выявление распространённости PV B19 в группе доноров, так как возбудитель может передаваться посредством гемоконтактного механизма, в частности, при использовании препаратов крови и её продуктов. В ходе исследования проб плазмы крови в 85,2% случаев были обнаружены вирусспецифические IgG-антитела, что свидетельствует о перенесённой ПВИ B19. В 14,8% исследованных образцов обнаружена ДНК возбудителя. Нуклеотидная идентичность выделенных из образцов плазмы крови двух изолятов PV B19: RUS15.15 (MG779500) и RUS15.15.2 (MG779501) – составила 100%, что свидетельствует о циркуляции парвовируса среди обследованных до-



Результаты сравнительного филогенетического анализа выделенных и депонированных в GenBank изолятов парвовируса B19. Results of comparative phylogenetic analysis of isolated parvovirus B19 sequences deposited in the GenBank.

норов. Изоляты относятся к генотипу G1A2 и имеют уникальные мутации, не представленные ранее в коллекции GenBank.

Как следует из данных литературы, наиболее часто PV B19 инфицируются лица детского и подросткового возраста [19], но, как показывают проведенные исследования, актуальность ПВИ сохраняется и для взрослых лиц, особенно из организованных воинских коллективов.

### Заключение

Полученные в исследовании данные показывают необходимость дальнейшей разработки проблемы эпидемической безопасности, связанной с ПВИ B19, в гематологии и трансфузиологии. Одно из её направлений – мониторинг специфической ДНК и вирусной нагрузки ( $>10^4$  копий/мл) в образцах крови, полученной от доноров. Это позволит своевременно отбраковывать эпидемически опасные гемопродукты, что имеет важное практическое значение в профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. В связи с этим для предупреждения гемоконтактного заражения пациентов PV B19 целесообразно включить в существующие алгоритмы лабораторного обследования доноров тестирование проб крови на маркеры PV B19 (IgM- и IgG-антитела, ДНК PV B19 с вирусной нагрузкой).

### ЛИТЕРАТУРА

1. Попцов А.Л., Парамонов И.В., Фетищева Н.Ю. Верификация методики выявления и количественного определения ДНК парвовируса B19 методом ПЦР в плазме для фракционирования. *Вестник службы крови России*. 2014; (1): 48-53.
2. Элижбаева М.А., Февралева И.С., Глинщикова О.А., Сильвейстрова О.Ю., Шипулина О.Ю., Домонова Э.А. и др. Выявление парвовируса B19 в крови российских доноров. *Гематология и трансфузиология*. 2011; 56(2): 10-3.
3. Cossart Y.E., Field A.M., Cant B., Widdows D. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet*. 1975; 1(7898): 72-3. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0140-6736\(75\)91074-0](http://doi.org/10.1016/s0140-6736(75)91074-0)
4. Парамонов И.В., Попцов А.Л., Рылов А.В. Опыт внедрения системы утвреждения доноров плазмы для фракционирования. *Гематология и трансфузиология*. 2016; 61(2): 87-91. DOI: <http://doi.org/10.18821/0234-5730-2016-61-2-87-91>
5. Kleinman S.H., Glynn S.A., Lee T.H., Tobler L., Montalvo L., Todd D., et al. Prevalence and quantitation of parvovirus B19 DNA levels in blood donors with a sensitive polymerase chain reaction screening assay. *Transfusion*. 2007; 47(10): 1756-64. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01341.x>
6. Филатова Е.В., Новикова Н.А., Зубкова Н.В., Голицына Л.Н., Кузнецов К.В. Определение маркеров парвовируса B19 в образцах крови доноров. *Микробиология, эпидемиология и иммунология*. 2010; (5): 67-70.
7. Mossong J., Hens N., Friederichs V., Davidkin I., Broman M., Litwinska B., et al. Parvovirus B19 infection in the European countries: seroepidemiology, force of infection, and maternal risk of infection. *Epidemiol. Infect.* 2008; 136(8): 1059-68. DOI: <http://doi.org/10.1017/S0950268807009661>
8. Anderson L.J., Gillespie S.M., Torok T.J., Hurwitz E.S., Tsou C.J., Gary G.W. Risk of infection following exposures to human parvovirus B19. *Behring Inst. Mitt.* 1990; (85): 60-3.
9. Anderson L.J., Tsou C., Parker R.A., Chorba T.L., Wulff H., Tattersall P., et al. Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 24(4): 522-6.
10. Лаврентьева И.Н., Антипова А.Ю., Семенов А.В., Бичурина М.А. Генотипы изолятов парвовируса B19, циркулирующих на территории Северо-западного федерального округа России. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2013; 90(6): 36-43.

11. Хамитова И.В., Останкова Ю.В., Антипова А.Ю., Семёнов А.В., Лаврентьева И.Н. Молекулярно-генетическая характеристика изолятов парвовируса B19, циркулирующих на территории северо-западного федерального округа. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2018; 95(6): 55-61. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-6-55-61>
12. Candotti D., Etiz N., Parsyan A., Allain J.P. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *J. Virol.* 2004; 78(22): 12169-78. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.78.22.12169-12178.2004>
13. Ke L., He M., Li C., Liu Y., Gao L., Yao F., et al. The prevalence of human parvovirus B19 DNA and antibodies in blood donors from four Chinese blood centers. *Transfusion*. 2011; 51(9): 1909-18. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03067.x>
14. Лаврентьева И.Н., Антипова А.Ю. Парвовирус B19 человека: характеристика возбудителя, распространение и диагностика обусловленной им инфекции. *Инфекция и иммунитет*. 2013; 3(4): 311-22. DOI: <http://doi.org/10.15789/2220-7619-2013-4-311-322>
15. Baylis S.A. Standardization of nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays for different genotypes of parvovirus B19: a meeting summary. *Vox Sang.* 2008; 94(1): 74-80. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2007.00992.x>
16. Corcoran A., Doyle S. Advances in the biology, diagnosis and host-pathogen interactions of parvovirus B19. *J. Med. Microbiol.* 2004; 53(Pt. 6): 459-75. DOI: <http://doi.org/10.1099/jmm.0.05485-0>
17. Blümel J., Eis-Hübinger A.M., Stühler A., Bönsch C., Gessner M., Löwer J. Characterization of Parvovirus B19 genotypes 2 in KU812Ep6 cells. *J. Virol.* 2005; 79(22): 14197-206. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.79.22.14197-14206.2005>
18. Lou S., Xu B., Huang Q., Zhi N., Cheng F., Wong S., et al. Molecular characterization of the newly identified human parvovirus 4 in the family Parvoviridae. *Virology*. 2012; 422(1): 59-69. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virol.2011.09.033>
19. Смеликов Я.А. Парвовирусная (B19) инфекция у детей на современном этапе (обзор). *Вестник КГМА им. И.К. Ахунбаева*. 2011; (4): 20-4.

### REFERENCES

1. Poptsov A.L., Paramonov I.V., Fetishcheva N.Yu. Verification of the method of detection and quantitative determination of parvovirus B19 DNA by PCR in plasma for fractionation. *Vestnik sluzhby krovi Rossii*. 2014; (1): 48-53. (in Russian)
2. Elizhbaeva M.A., Fevrалева I.S., Glinshchikova O.A., Sil'veystrova O.Yu., Shipulina O.Yu., Domonova E.A., et al. Detection of B19 parvovirus in the blood of Russian donors. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2011; 56(2): 10-3. (in Russian)
3. Cossart Y.E., Field A.M., Cant B., Widdows D. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet*. 1975; 1(7898): 72-3. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0140-6736\(75\)91074-0](http://doi.org/10.1016/s0140-6736(75)91074-0)
4. Paramonov I.V., Poptsov A.L., Rylov A.V. Experience of implementation of the system of qualification of donors of plasma for fractionation. *Gematologiya i transfuziologiya*. 2016; 61(2): 87-91. DOI: <http://doi.org/10.18821/0234-5730-2016-61-2-87-91> (in Russian)
5. Kleinman S.H., Glynn S.A., Lee T.H., Tobler L., Montalvo L., Todd D., et al. Prevalence and quantitation of parvovirus B19 DNA levels in blood donors with a sensitive polymerase chain reaction screening assay. *Transfusion*. 2007; 47(10): 1756-64. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01341.x>
6. Filatova E.V., Novikova N.A., Zubkova N.V., Golitsyna L.N., Kuznetsov K.V. Determination of parvovirus B19 markers in blood samples from donors. *Mikrobiologiya, epidemiologiya i immunologiya*. 2010; (5): 67-70. (in Russian)
7. Mossong J., Hens N., Friederichs V., Davidkin I., Broman M., Litwinska B., et al. Parvovirus B19 infection in the European countries: seroepidemiology, force of infection, and maternal risk of infection. *Epidemiol. Infect.* 2008; 136(8): 1059-68. DOI: <http://doi.org/10.1017/S0950268807009661>
8. Anderson L.J., Gillespie S.M., Torok T.J., Hurwitz E.S., Tsou C.J., Gary G.W. Risk of infection following exposures to human parvovirus B19. *Behring Inst. Mitt.* 1990; (85): 60-3.
9. Anderson L.J., Tsou C., Parker R.A., Chorba T.L., Wulff H., Tattersall P., et al. Detection of antibodies and antigens of human parvovirus B19 by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 24(4): 522-6.

- rus B19 by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 24(4): 522-6.
10. Lavrent'eva I.N., Antipova A.Yu., Semenov A.V., Bichurina M.A. Genotyping of parvovirus B19 isolates circulating in Northwestern Federal District of Russia. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2013; 90(6): 36-43. (in Russian)
  11. Khamitova I.V., Ostankova Yu.V., Antipova A.Yu., Semenov A.V., Lavrent'eva I.N. Molecular-genetic characteristics of parvovirus B19 isolates circulating in the North-Western Federal District. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2018; 95(6): 55-61. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-6-55-61> (in Russian)
  12. Candotti D., Etiz N., Parsyan A., Allain J.P. Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. *J. Virol.* 2004; 78(22): 12169-78. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.78.22.12169-12178.2004>
  13. Ke L., He M., Li C., Liu Y., Gao L., Yao F., et al. The prevalence of human parvovirus B19 DNA and antibodies in blood donors from four Chinese blood centers. *Transfusion.* 2011; 51(9): 1909-18. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2011.03067.x>
  14. Lavrent'eva I.N., Antipova A.Yu. Human parvovirus B19: virus characteristics, distribution and diagnostics of parvovirus infection. *Infektsiya i immunitet.* 2013; 3(4): 311-22. DOI: <http://doi.org/10.15789/2220-7619-2013-4-311-322> (in Russian)
  15. Baylis S.A. Standardization of nucleic acid amplification technique (NAT)-based assays for different genotypes of parvovirus B19: a meeting summary. *Vox Sang.* 2008; 94(1): 74-80. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2007.00992.x>
  16. Corcoran A., Doyle S. Advances in the biology, diagnosis and host-pathogen interactions of parvovirus B19. *J. Med. Microbiol.* 2004; 53(Pt. 6): 459-75. DOI: <http://doi.org/10.1099/jmm.0.05485-0>
  17. Blümel J., Eis-Hübinger A.M., Stühler A., Bönsch C., Gessner M., Löwer J. Characterization of Parvovirus B19 genotypes 2 in KU812Ep6 cells. *J. Virol.* 2005; 79(22): 14197-206. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.79.22.14197-14206.2005>
  18. Lou S., Xu B., Huang Q., Zhi N., Cheng F., Wong S., et al. Molecular characterization of the newly identified human parvovirus 4 in the family Parvoviridae. *Virology.* 2012; 422(1): 59-69. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virol.2011.09.033>
  19. Smel'kov Ya.A. Parvovirus (B19) infection at children at present stage (review). *Vestnik KGMA im. I.K. Akhunbaeva.* 2011; (4): 20-4. (in Russian)



## Эффект вакцинации вирусоподобными частицами, экспрессирующими гемагглютинин, на развитие постгриппозной бактериальной пневмонии у мышей: патоморфологические, вирусологические, микробиологические и клинические данные

Фалынскова И.Н.<sup>1</sup>, Егоров А. Ю.<sup>1,2</sup>, Поддубиков А.В.<sup>1</sup>, Вартанова Н.О.<sup>1</sup>, Карташова Н.П.<sup>1</sup>, Глубокова Е.А.<sup>1</sup>, Мхитаров В.А.<sup>3</sup>, Джалилова Д.Ш.<sup>3</sup>, Макарова О.В.<sup>3</sup>, Ленева И.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия;

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева», 197022, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>3</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», 117418, Москва, Россия

**Введение.** Грипп – тяжёлое вирусное заболевание, его частым осложнением являются вторичные бактериальные пневмонии. Предотвратить вторичные бактериальные осложнения позволяют гриппозные вакцины. Одним из перспективных направлений создания новых вакцин является создание вирусоподобных частиц (ВПЧ), в том числе несущих отдельные вирусные белки.

**Цель** настоящей работы – изучение корреляции патоморфологической характеристики лёгких с клиническими, вирусологическими, микробиологическими маркерами заболевания при вакцинации ВПЧ, несущими гемагглютинин вируса гриппа (HA-Gag-ВПЧ), на модели вторичной бактериальной пневмонии мышей, вызванной *S. pneumoniae*, после гриппозной инфекции, индуцированной гомологичным и гетерологичным штаммами вируса гриппа.

**Материал и методы.** Самок мышей линии BALB/c массой тела 12–14 г вакцинировали HA-Gag-ВПЧ, через 21 день инфицировали двумя штаммами вирусами гриппа (гомологичным и гетерологичным), а ещё через 5 дней инфицировали *S. pneumoniae*. Эффект вакцинации оценивали по морфологическим, вирусологическим (титр вируса в лёгких) и микробиологическим (титр бактерий в лёгких) данным и подтверждали клиническими показателями (выживаемость, изменение массы тела).

**Результаты.** Иммунизация HA-Gag-ВПЧ с последующим инфицированием гомологичным вирусом гриппа и *S. pneumoniae* уменьшала площадь очагов воспаления в лёгких, ингибировала размножение вируса и бактерий в них, а также защищала животных от гибели и уменьшала снижение массы тела. Иммунизация HA-Gag-ВПЧ при заражении гетерологичным штаммом и *S. pneumoniae* не влияла на перечисленные признаки.

**Заключение.** В экспериментальной мышинной модели вторичной бактериальной пневмонии, вызванной *S. pneumoniae*, после гриппозной инфекции индукция иммунного ответа к HA вируса гриппа при парентеральной иммунизации мышей HA-Gag-ВПЧ способна предотвращать размножение вируса, обеспечивая снижение бактериальной нагрузки *S. pneumoniae* и степень поражения лёгких, защищая животных от заболевания при антигенном соответствии вакцины и штамма вируса гриппа, используемого для провокации бактериальной инфекции.

**Ключевые слова:** вирус гриппа; *Streptococcus pneumoniae*; вирусоподобные частицы; вторичные бактериальные пневмонии после гриппозной инфекции.

**Для цитирования:** Фалынскова И.Н., Егоров А. Ю., Поддубиков А.В., Вартанова Н.О., Карташова Н.П., Глубокова Е.А., Мхитаров В.А., Джалилова Д.Ш., Макарова О.В., Ленева И.А. Эффект вакцинации вирусоподобными частицами, экспрессирующими гемагглютинин, на развитие постгриппозной бактериальной пневмонии у мышей: патоморфологические, вирусологические, микробиологические и клинические данные. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(3): 150-158. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-150-158>

**Для корреспонденции:** Фалынскова Ирина Николаевна, науч. сотр. лаб. экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва. E-mail: [falynskova@mail.ru](mailto:falynskova@mail.ru)

**Участие авторов:** Ленева И. А., Егоров А. Ю. – концепция и дизайн исследования, руководство исследованием; Фалынскова И. Н. – написание текста; Карташова Н.П., Глубокова Е.А. вирусологическая часть исследования; Поддубиков А.В., Вартанова Н.О. – микробиологическая часть исследования; Мхитаров В.А., Джалилова Д.Ш., Макарова О.В. – морфологическая часть исследования.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 18-45-05002 «Вирусоподобные частицы для борьбы с постгриппозными бактериальными инфекциями», 2018–2020 гг.).

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

Поступила 08.06.2020

Принята в печать 22.06.2020

## Vaccination with virus-like particles containing hemagglutinin protects the lungs of mice with postinfluenza bacterial pneumonia: virological, microbiological and clinical data

Irina N. Falynskova<sup>1</sup>, Andrej Yu. Egorov<sup>1,2</sup>, Alexander V. Poddubikov A.<sup>1</sup>, Nune O. Vartanova<sup>1</sup>, Nadezhda P. Kartashova<sup>1</sup>, Ekaterina A. Glubokova<sup>1</sup>, Vladimir A. Mkhitarov<sup>3</sup>, Dzhuliya S. Dzhaliilova<sup>3</sup>, Olga V. Makarova<sup>3</sup>, Irina A. Leneva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia;

<sup>2</sup>Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, 197022, Russia;

<sup>3</sup>Research Institute of Human Morphology, Moscow, 117418, Russia

**Introduction.** Influenza is a severe viral disease, a frequent complication of which is a secondary bacterial pneumonia. Influenza vaccines prevent secondary bacterial complications. Virus-like particles are one of the promising areas for the development of new vaccines.

**The aim** of this work is to study the correlation of the pathomorphological characteristics of the lungs with clinical, virological, and microbiological markers of the disease at vaccination with virus-like particles (VLPs), containing hemagglutinin (HA) of influenza virus (HA-Gag-VLPs) in a murine model of secondary bacterial pneumonia induced by *S. pneumoniae* after influenza infection.

**Material and methods.** BALB/c mice were vaccinated with VLPs containing influenza HA. After 21 days, mice were infected with two strains of influenza viruses, homologous and non-homologous, and 5 days after viral infection, were infected with *S. pneumoniae*. The vaccination effect was evaluated by morphological, virological (titer of the virus in the lungs) and microbiological (titer of bacteria in the lungs) data, and was confirmed by clinical data (survival, change in body weight).

**Results.** Immunization with HA-Gag-VLPs, followed by infection with a homologous influenza virus and *S. pneumoniae*, reduced the area of foci of inflammation, inhibited the replication of the virus and bacteria in the lungs, and also protected animals from death and reduced their weight loss. Immunization with HA-Gag-VLPs upon infection with a heterologous strain and *S. pneumoniae* did not affect these criteria.

**Conclusion.** The immunization with HA-Gag-VLPs prevented the viral replication, providing a reduction of *S. pneumoniae* titer and the degree of lung damage, protecting animals from the disease in a murine model of secondary bacterial pneumonia, induced by *S. pneumoniae*, after influenza infection with homologous strain of the virus.

**Keywords:** influenza virus; *Streptococcus pneumoniae*, VLP; secondary bacterial pneumonia after influenza infection.

**For citation:** Falynskova I.N., Egorov A.Yu., Poddubikov A.V., Vartanova N. O., Kartashova N.P., Glubokova E.A., Mkhitarov V.A., Dzhaliilova D.S., Makarova O.V., Leneva I.A. Vaccination with virus-like particles containing hemagglutinin protects the lungs of mice with postinfluenza bacterial pneumonia: virological, microbiological and clinical data. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology)*. 2020; 65(3): 150-158. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-150-158>

**For correspondence:** Irina N. Falynskova, researcher of Laboratory experimental virology, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia. E-mail: [falynskova@mail.ru](mailto:falynskova@mail.ru)

### Information about the authors:

Falynskova I.N., <https://orcid.org/0000-0001-9836-9620>

Egorov A.Y., <https://orcid.org/0000-0003-2068-3745>

Poddubikov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>

Vartanova N.O., <https://orcid.org/0000-0002-6372-9910>

Kartashova N.P., <https://orcid.org/0000-0003-2096-5080>

Glubokova E.A., <https://orcid.org/0000-0002-5925-9733>

Mkhitarov V.A., <https://orcid.org/0000-0002-4427-1991>

Dzhaliilova D.S., <https://orcid.org/0000-0002-1337-7160>

Makarova O.V., <https://orcid.org/0000-0001-8581-107X>

Leneva I.A., <https://orcid.org/0000-0002-7755-2714>

**Contribution:** Leneva I. A., Egorov A. Yu. – research concept and design, research management; Falynskova I. N. – writing a text; Kartashova N.P., Glubokova E.A. – virological part of the study; Poddubikov A.V., Vartanova N.O. – microbiological part of the study; Mkhitarov V.A., Dzhaliilova D.Sh., Makarova O.V. – morphological part of the study.

**Acknowledgment.** This work was financially supported by the Russian Science Foundation (grant No. 18-45-05002 Virus-like particles for the control of post-influenza bacterial infections, 2018-2020).

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

Received 08 June 2020

Accepted 22 June 2020

## Введение

Вирус гриппа – один из возбудителей острых респираторных вирусных заболеваний, ежегодно наносящий ущерб здоровью людей. Основная причина

смертности, наблюдаемая во время как сезонных, так и пандемических вспышек гриппа, связана со вторичными бактериальными пневмониями, среди возбудителей которых наиболее распространён *Streptococcus*

*pneumoniae* [1]. Патогенез вирусно-бактериальной пневмонии и её тяжесть определяются комплексным сочетанием факторов, зависящих от патогенности возбудителей вирусной и бактериальных инфекций, существующего специфического иммунитета и реакций системы врождённого иммунитета [2, 3].

Вакцинация остаётся основной и наиболее экономически эффективной стратегией по профилактике и борьбе с инфекциями гриппа, при этом противогриппозный иммунитет может определять не только чувствительность организма к вирусу, но и вероятность развития вторичной бактериальной инфекции. На данный момент гриппозные вакцины – эффективное средство предотвращения вторичных бактериальных осложнений при условии использования вакцины, специфичной к вирусному штамму и вызывающей образование нейтрализующих антител [4–6]. Нейтрализующие антитела к гемагглютинуину (НА) узко специфичны [7], а постоянный антигенный дрейф вирусов гриппа приводит к тому, что штаммы, входящие в состав вакцин и циркулирующие среди населения, не совпадают, это снижает или нивелирует эффективность сезонных вакцин. Одним из перспективных подходов, используемых в современной вирусологии, представляется создание вирусоподобных частиц (ВПЧ), использующихся как платформа для разработки противогриппозных вакцин, некоторые из них уже находятся на стадии клинических испытаний.

Исследования, включая экспериментальные, посвящённые изучению эффекта вакцинации на развитие вторичных бактериальных пневмоний после гриппозной инфекции, ограничены. Особенно малочисленны патоморфологические исследования, отражающие состояние лёгких и патологический процесс в них, а также изучение их корреляции с остальными маркерами заболевания. Так в исследовании, проведённом Y. Desheva и соавт. [8], использование живой противогриппозной вакцины у животных, инфицированных вирусом гриппа с последующим заражением *S. pneumoniae*, позволило сохранить морфологическую структуру лёгких и уменьшило, хотя и не предотвращало полностью, их повреждение.

Ранее нами разработана экспериментальная мышечная модель вирусно-бактериальной пневмонии, индуцированной последовательным заражением вирусом гриппа и *S. pneumoniae*, в которой был выявлен летальный синергизм между патогенами [9]. Данная модель использована нами для изучения эффективности лекарственных препаратов, живой и инактивированной гриппозных вакцин, а также ВПЧ, содержащих НА вируса гриппа [10].

**Цель** работы – изучение корреляции патоморфологической характеристики лёгких с клиническими, вирусологическими, микробиологическими маркерами заболевания при вакцинации ВПЧ, несущими НА вируса гриппа, на модели вторичной бактериальной пневмонии мышшей, вызванной *S. pneumoniae*, после гриппозной инфекции, индуцированной гомологичным и гетерологичным штаммами вируса гриппа. Использование гомологичного и гетерологичного штаммов вируса гриппа

имитирует ситуацию совпадения и несовпадения вакцинного штамма с циркулирующими, что позволяет изучить неспецифические эффекты иммунизации.

### Материал и методы

**Вирусоподобные частицы.** М. Klausberger (Department of Biotechnology, University of Natural Resources and Life Sciences, Вена) были сконструированы, наработаны и охарактеризованы препараты ВПЧ двух видов: содержащие гемагглютинин (НА-Gag-ВПЧ) вируса гриппа А/PR/8/34 и не содержащие белков вируса гриппа (Gag-ВПЧ). Препараты ВПЧ, образованные комбинацией ретровирусного Gag белка с НА вируса гриппа, происходящего от штамма А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1), были получены с помощью конструирования бакуловирусного вектора, экспрессирующего вирусоподобные частицы при заражении клеток насекомых (Tnms42 клетки). Содержание антигена НА составило 2500 нг/мл.

**Патогены.** Для вирусного инфицирования мышшей были использованы и охарактеризованы вирусы гриппа: А/PR/8/34 (H1N1) и реассортант А/NIBRG-121хр (А/Калифорния/04/2009 (пндм H1N1 2009) ХА/PR/8/34 (H1N1) (2:6), содержащий поверхностные белки НА и нейраминидазу (NA) от вируса А/Калифорния/04/2009, а внутренние белки – от А/PR/8/34 (H1N1). Оба штамма получены из музея ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Вирусы для заражения выращивали в 9-дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) в течение 72 ч при 37 °С. После определения инфекционной активности вирусов, выраженной в Ig эмбриональной инфекционной дозы (ЭИД<sub>50</sub>/мл), их использовали для инфицирования животных.

Для бактериального заражения использовали штамм *S. pneumoniae* № 3405 из коллекции микроорганизмов ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» (Москва, Россия) в дозе 25·10<sup>6</sup> КОЕ/мл. Бактериальную культуру для заражения получали для каждого опыта непосредственно перед его проведением, однако процесс приготовления культуры был стандартизован в предварительных опытах. Для восстановления жизнеспособности культуры ампулу в стерильных условиях вскрывали, добавляли 2 мл сердечно-мозгового бульона и инкубировали 4 ч при температуре 37 °С. Затем осуществляли посев на ГРМ-агар (ФБУН «ГНЦ ПМБ», Россия) с добавлением 5% лошадиной крови (ЗАО «ЭКОлаб», Россия). Чашки инкубировали в течение 18 ч при температуре 37 °С и 5,5% CO<sub>2</sub> среде. В исследовании использовали второй пассаж бактерий после регенерации штамма. Рабочие разведения бактериальной суспензии готовили с использованием денситометра Densi-Lameter (PLIVA-Lachema Diagnostika, Словакия). За 1·10<sup>9</sup> бактерий в 1 мл объёма принимали 0,8 ЕД мутности по McFarland.

**Животные.** В исследованиях использовали мышшей линии BALB/c. Самки массой тела 12–14 г были получены из ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России, филиала «Андреевка» (Московская область, Россия). Содержание животных и манипуляции с ними соответствовали Правилам проведения работ с использованием экс-

периментальных животных (приказ Минздрава России от 23.08.2010 № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации»). Мышей распределяли по группам рандомизированно, каждая группа содержала 25 животных.

*Определение эффекта вакцинации в модели бактериальной пневмонии после гриппозной инфекции.* Животных иммунизировали, вводя HA-Gag-ВПЧ (две исследуемые группы), либо Gag-ВПЧ (две контрольные группы) внутривентрально в объеме 0,2 мл (концентрация антигена 0,05 мкг). Через 21 день после вакцинации мышей инфицировали интраназально под эфирным наркозом соответствующей (A/PR/8/34 (H1N1) или A/NIBRG-121xp) вирусосодержащей аллантоисной жидкостью (объем 0,03 мл, по 0,5 50% мышинной летальной дозы (МЛД<sub>50</sub>/мл)). На 4-е сутки после заражения 5 животных из каждой группы гуманно умерщвляли, у них забирали лёгкие для определения инфекционного титра вируса. На 5-й день после вирусного заражения оставшихся мышей инфицировали, вводя *S. pneumoniae* интраназально под эфирным наркозом (объем 0,03 мл). На 8-е сутки после вирусного и 3-и сутки после бактериального заражения у 5 животных из каждой группы брали лёгкие для оценки влияния вакцинации на морфологические изменения гистологическим методом, а также для определения инфекционного титра вируса путём титрования гомогенатов тканей лёгких на РКЭ и бактериальной обсеменённости. Наблюдали за животными в течение 14 дней после вирусного заражения. Защитную (протективную) активность HA-Gag-ВПЧ оценивали, учитывая количество выживших мышей и потерю животными массы тела. Изменение массы тела рассчитывали отдельно для каждой мыши в процентах, принимая за 100% массу тела животного перед инфицированием. Для мышей каждой группы определяли среднее значение изменения массы тела в процентах. Кроме клинических показателей, для оценки протективной активности вакцинации ВПЧ использовали вирусные (определение титра вируса в лёгких на 4-й и 8-й дни после вирусного заражения) и бактериальные (обсеменённость лёгких бактериями) характеристики.

*Определение инфекционного титра вируса в лёгких мышей.* РКЭ получали из ООО «Майские просторы» (Московская область, Россия). Готовили 10-кратные разведения суспензии лёгких мышей на среде Игла MEM и инокулировали по 100 мкл каждого разведения в аллантоисную полость 9-дневных РКЭ. Инфицированные РКЭ инкубировали во влажной среде при 37 °C в течение 48 ч, затем охлаждали при +4 °C в течение 4 ч. Отбирали 50 мкл аллантоисной жидкости, помещали в лунки круглодонного 96-луночного планшета и добавляли 50 мкл 0,5% суспензии куриных эритроцитов. Через 45 мин инкубации по реакции гемагглютинации определяли, в каких РКЭ размножился вирус, и рассчитывали ЭИД<sub>50/мл</sub>.

*Определение обсеменённости респираторных путей.* Для определения содержания *S. pneumoniae* образцы гомогенизированных лёгких разводили фосфатно-со-

левым буфером. Осуществляли посев на чашки Петри с плотной средой «Питательный агар» (ФБУН «ГНЦ ПМБ», Россия) с добавлением 5% лошадиной крови. Культуру инкубировали при 37 °C в 5,5% CO<sub>2</sub> среде в течение 18–24 ч. Чистоту выросшей культуры определяли визуально и микроскопически в мазках, окрашенных по Грамму. Обсеменённость лёгочной ткани рассчитывали, умножая число выросших колоний на степень разведения и коэффициент, обратный объёму посеянного материала, и выражали в lg КОЕ/мл.

*Морфологическое и морфометрическое исследование лёгких.* Полученные на 4-й день после вирусного заражения лёгкие сразу фиксировали в 10% растворе нейтрального забуференного формалина в течение 24 ч. Гистологическую проводку выполняли в аппарате Tissue-Tek VIP5Jr (Sakura, США), заключение образцов тканей в гистомикс проводили на аппарате Tissue-Tek TEC (Sakura, США). На микротоме Microm HM340E (Thermo Scientific, США) изготавливали по 6 сагитально ориентированных ступенчатых срезов с каждого лёгкого с шагом 200 мкм, окрашивали срезы гематоксилином и эозином. Визуальный анализ изменений ткани лёгких экспериментальных животных проводили на микроскопе Axioptan 2 Imaging Zeiss. На слайде тотального среза лёгкого в программе Photoshop CC 14 очаги воспаления обводили световым пером и маркировали красным цветом. В программе Image Pro Plus 6.0 измеряли площади выделенных участков и вычисляли их долю от общей площади срезов лёгкого.

*Статистическая обработка данных.* Выживаемость в группах мышей сравнивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) в программе Statistica 8.0, для графического представления данных использовали метод Каплана–Мейера.

Для сравнения изменения массы тела мышей применяли однофакторный дисперсионный анализ для нелинейных моделей, использовали четырёхпараметрическую log-логистическую модель. Анализ выполнен в приложении R-Studio (Version 1.0.136), пакет 'drc' (C. Ritz, 2016).

Статистическую обработку морфометрических данных проводили в программе StatSoft Statistica 8. Анализ характера распределения вариационных рядов методом Колмогорова–Смирнова показал необходимость применения непараметрических методов, были вычислены медианы и квартили: нижние (25%) и верхние (75%). Для сравнения экспериментальных групп был применён ANOVA, метод множественного сравнения Tukey HSD.

## Результаты

*Эффект вакцинации HA-Gag-ВПЧ на патоморфологическое состояние лёгких на модели вторичной бактериальной пневмонии после гомологичной и гетерологичной гриппозной инфекции.* Мыши были иммунизированы HA-Gag-ВПЧ, содержащими HA штамма A/PR/8/34 (H1N1), или Gag-ВПЧ. Для воссоздания ситуации совпадения и несовпадения вакцинного штамма с циркулирующими штаммами вируса гриппа инфицирование проводили гомо-

логичным A/PR/8/34 (H1N1) или гетерологичным A/NIBRG-121xp (H1N1) штаммами вируса гриппа с последующим заражением *S. pneumoniae*.

Морфологические изменения лёгких оценивали количественно по относительной площади очагов воспаления, которые представляли собой очаги бронхопневмонии и микроабсцессы.

При морфологическом исследовании лёгких неинфицированных интактных мышей патологических изменений не выявлено: просветы бронхов свободные, эпителиальная выстилка бронхов не нарушена; альвеолы различных размеров и форм; межальвеолярные перегородки тонкие, их сосуды и капилляры неравномерно полнокровные. При исследовании в лёгких всех инфицированных мышей были выявлены очаги бронхопневмонии (рис. 1). В просветах бронхов, локализованных в зонах пневмонических очагов, определялся экссудат из нейтрофилов и небольшого числа макрофагов; эпителиальная выстилка бронхов была очагово нарушена; в стенках бронхов и прилежащем к ним респираторном отделе наблюдали воспалительную инфильтрацию из нейтрофилов и небольшого количества макрофагов и лимфоцитов. Несмотря на перечисленные изменения у всех инфицированных животных уровень их был различен в зависимости от вируса, использованного для заражения и вакцинирования ВПЧ. Влияние двух штаммов вируса гриппа на морфологические изменения в лёгких различалось. У животных 1-й контрольной группы, вакцинированных Gag-ВПЧ при инфицировании вирусом A/NIBRG-121xp (H1N1) + *S. pneumoniae*, выявлены наиболее тяжёлые и распространённые воспалительные изменения, представляющие собой обширную очаговую пневмонию. Кроме того, у трёх из пяти животных были выявлены множественные микроабсцессы. Во 2-й контрольной группе мышей, вакцинированных Gag-ВПЧ, при последующем инфицировании A/PR/8/34 (H1N1) + *S. pneumoniae* относительная площадь воспалительных очагов была такой же, однако в отличие от вакцинированных Gag-ВПЧ с последующим инфицированием вирусом A/NIBRG-121xp (H1N1) + *S. pneumoniae* в группе животных, вакцинированных Gag-ВПЧ, при инфицировании вирусом A/PR/8/34 (H1N1) + *S. pneumoniae*

единичные микроабсцессы выявлены только у одного животного.

По данным морфометрического исследования, в группе мышей, вакцинированных HA-Gag-ВПЧ, содержащими HA A/PR/8/34 (H1N1), и инфицированных гомологичным вирусом A/PR/8/34 (H1N1) + *S. pneumoniae*, относительная площадь очагов воспаления была минимальной (табл. 1, см. рис. 1, 2), и статистически значимо меньше, чем в остальных группах. Тем не менее у части мышей в этой группе выявлены очаги бронхопневмонии, и у одного животного обнаружены микроабсцессы.

Напротив, в группе мышей, вакцинированных HA-Gag-ВПЧ, содержащими HA A/PR/8/34 (H1N1), и инфицированных гетерологичным вирусом A/NIBRG-121xp (H1N1) + *S. pneumoniae*, относительная площадь очагов воспаления статистически значимо не отличалась от такового в контрольных группах, вакцинированных Gag-ВПЧ без HA, при инфицировании вирусом A/NIBRG-121xp (H1N1) или вирусом A/PR/8/34 (H1N1) с последующим инфицированием *S. pneumoniae*. У всех мышей в лёгких выявлена очаговая бронхопневмония, а у части – множественные микроабсцессы. В этой группе относительная площадь очагов воспаления в лёгких была статистически значимо больше, чем у мышей, инфицированных A/PR/8/34 (H1N1) + *S. pneumoniae* с предварительной вакцинацией HA-Gag-ВПЧ, содержащими HA гомологичного A/PR/8/34 (H1N1) вируса (см. табл. 1).

Вирусологические и микробиологические характеристики. Патоморфологическое состояние органов дыхания мышей было подтверждено данными вирусологических и микробиологических исследований.

В контрольных группах животных, вакцинированных Gag-ВПЧ и инфицированных обоими штаммами вируса гриппа и *S. pneumoniae*, скорость размножения вируса и бактерий в лёгких была самой высокой. Иммунизация HA-Gag-ВПЧ, содержащими HA A/PR/8/34 (H1N1), полностью подавляла размножение вируса, статистически значимо снижала титр бактерий в лёгких при инфицировании гомологичным вирусом и не влияла на эти показатели при гетерологичном заражении (табл. 2).

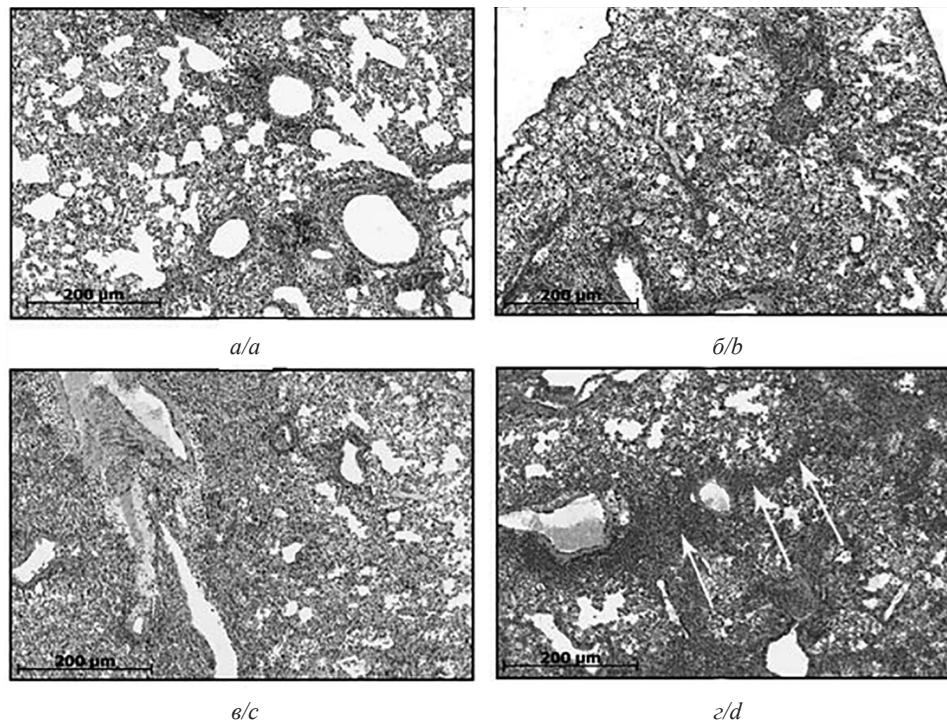
Таблица 1. Эффект вакцинации HA-Gag-ВПЧ на относительную площадь очагов воспаления в лёгких мышей

Table 1. The effect of HA-Gag-VLPs vaccination on the relative area of foci of inflammation in the lungs of mice

Экспериментальная группа Groups		Относительная площадь очага воспаления The relative area of the focus of inflammation				Сравнение площади очага воспаления Comparison of the area of the focus of inflammation			
инфицирование Infection	вакцинация Vaccination	Valid N	Медиана Median*	L 25%*	U 75%*	A/PR/8/34 (H1N1) + <i>S. pneumoniae</i>		A/NIBRG-121xp (H1N1) + <i>S. pneumoniae</i>	
						HA-Gag- VLPs	Gag- VLPs	HA-Gag- VLPs	Gag-VLPs
A/PR/8/34 (H1N1) + <i>S. pneumoniae</i>	HA-Gag-VLPs	22	33,79	19,94	46,91	–	0,005	0,017	0,004
	Gag-VLPs	14	59,34	50,86	73,86	0,005	–	0,911	–
A/NIBRG- 121xp (H1N1) + <i>S. pneumoniae</i>	HA-Gag-VLPs	19	47,55	19,62	89,82	0,017	0,911	–	0,986
	Gag-VLPs	20	70,56	23,56	89,58	0,004	0,986	0,984	–

Примечание. \* L 25% – нижний квартиль; \*\* U 75% – верхний квартиль.

Note. \* L 25% – lower quartile; \*\* U 75% – upper quartile.



**Рис. 1.** Морфологические изменения в лёгких мышей (ув.  $\times 200$ , окраска гематоксилином и эозином).

*a* – очаговая бронхопневмония, воспалительная инфильтрация стенки бронхов и респираторного отдела, единичные микроабсцессы; *б* – очаговая бронхопневмония, воспалительная инфильтрация стенки бронхов и паренхимы лёгких; *в* – обширная бронхопневмония, воспалительная инфильтрация стенки бронхов и паренхимы лёгких, микроабсцессы; *г* – обширная бронхопневмония, воспалительная инфильтрация стенки бронхов и респираторного отдела, множественные микроабсцессы (указаны стрелкой).

**Fig. 1.** Morphological changes in the lungs of mice (magnification  $\times 200$ , stained with hematoxylin and eosin).

*a* – focal bronchopneumonia, inflammatory infiltration of the wall of the bronchi and re-helication department, single microabscesses; *b* – focal bronchopneumonia, inflammatory infiltration of the wall of the bronchi and parenchyma of the lungs; *c* – extensive bronchopneumonia, inflammatory infiltration of the wall of the bronchi and lung parenchyma, microabscess; *d* – extensive bronchopneumonia, inflammatory infiltration of the wall of the bronchi and re-helication, multiple microabscesses (indicated by an arrow).

**Таблица 2.** Эффект вакцинации на выживаемость, вирусологические и микробиологические характеристики в экспериментальной модели вторичной пневмонии мышей, вызванной *S. pneumoniae*, после гриппозной инфекции

**Table 2.** The effect of vaccination on survival, virological and microbiological characteristics in an experimental murine model of secondary pneumonia caused by *S. pneumoniae* after influenza infection

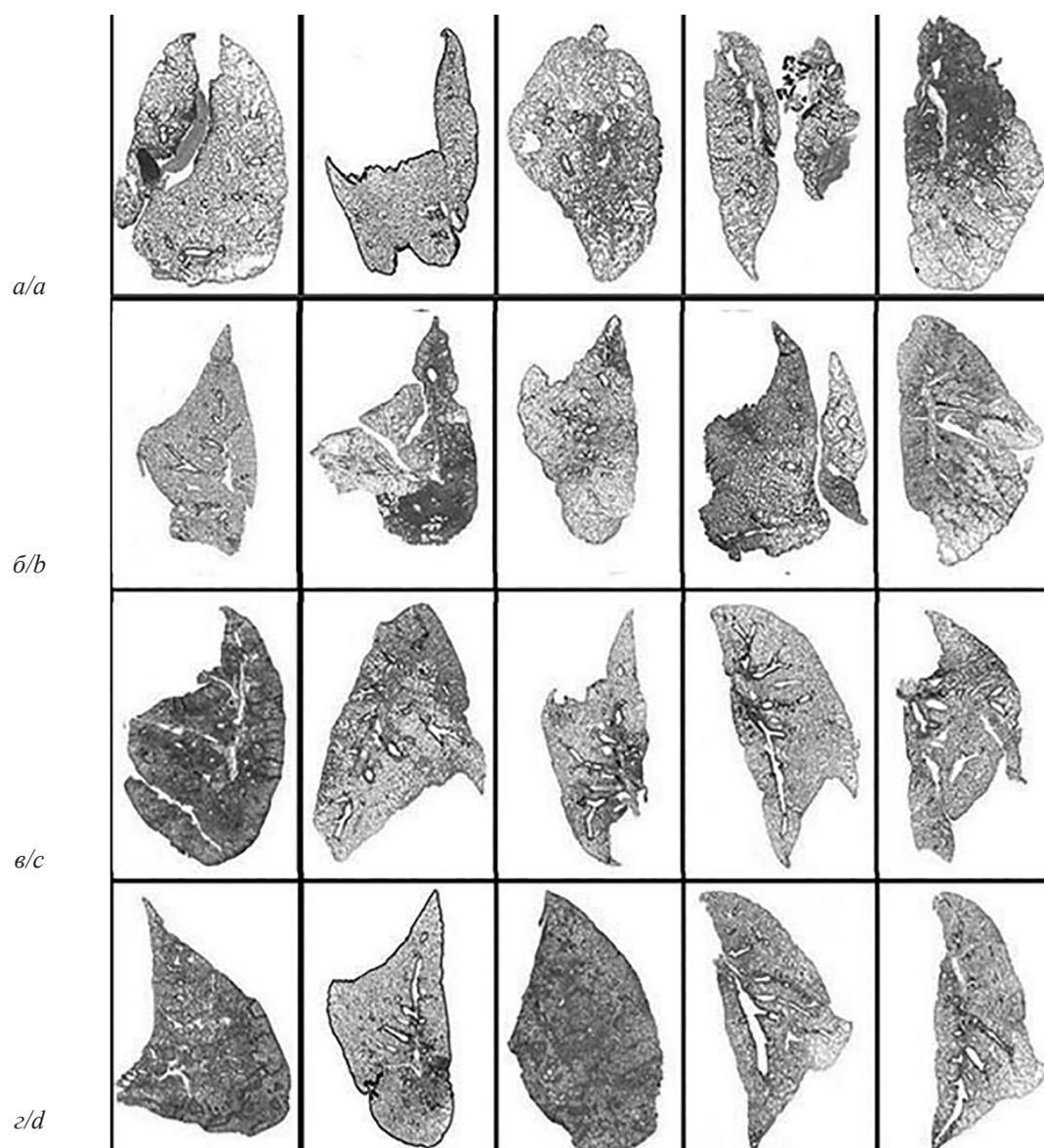
Экспериментальная группа Groups		Выживаемость, % Survival rate, %	Титр вируса в лёгких, lg ТЦИД <sub>50</sub> /мл Lung virus titer, lg TCID <sub>50</sub> /ml		Бактериальная обсеменённость, lg КОЕ/мл Bacterial density, lg CFU/ml
инфицирование Infection	вакцинация Vaccination		4 сут 4 day	8 сут 8 day	
Гомологичный вирус / Homologous virus A/PR/8/34 (H1N1) + <i>S. pneumoniae</i>	HA-Gag-VLPs	82	0	0	2,46 ± 3,01
	Gag-VLPs	27	5 ± 0,4	6 ± 0,7	7,53 ± 1,2
Гетерологичный вирус / Heterologous virus A/NIBRG-121xp (H1N1) + <i>S. pneumoniae</i>	HA-Gag-VLPs	27	5 ± 0,4	6,9 ± 0,5	7,14 ± 0,85
	Gag-VLPs	27	4,5 ± 1	7,2 ± 1	7,65 ± 1,01

*Исследование протективной активности препаратов ВПЧ.* Морфологические, вирусологические и микробиологические данные были подтверждены показателями протективной активности. В группах животных, вакцинированных контрольными Gag-ВПЧ, не содержащими вирусных белков, и инфицированных обоими штаммами вируса гриппа и *S. pneumoniae*, наблюдалась гибель 73% мышей при большом снижении массы тела. Иммунизация HA-Gag-ВПЧ, содержащими HAA/PR/8/34 (H1N1), при последующем заражении этим же вирусом и *S. pneumoniae* приводила

к значительному увеличению выживаемости мышей и уменьшению снижения массы тела. Иммунизация этими же частицами при заражении гетерологичным вирусом гриппа и *S. pneumoniae* не оказывала статистически значимого влияния на выживаемость и снижение массы тела мышей (см. табл. 2, рис. 3, 4).

### Обсуждение

Известно, что клинические случаи тяжёлого течения заболеваний, вызванных респираторными вирусными инфекциями, ассоциированы с развитием осложнений,



**Рис. 2.** Воспалительная инфильтрация в лёгких мышей.

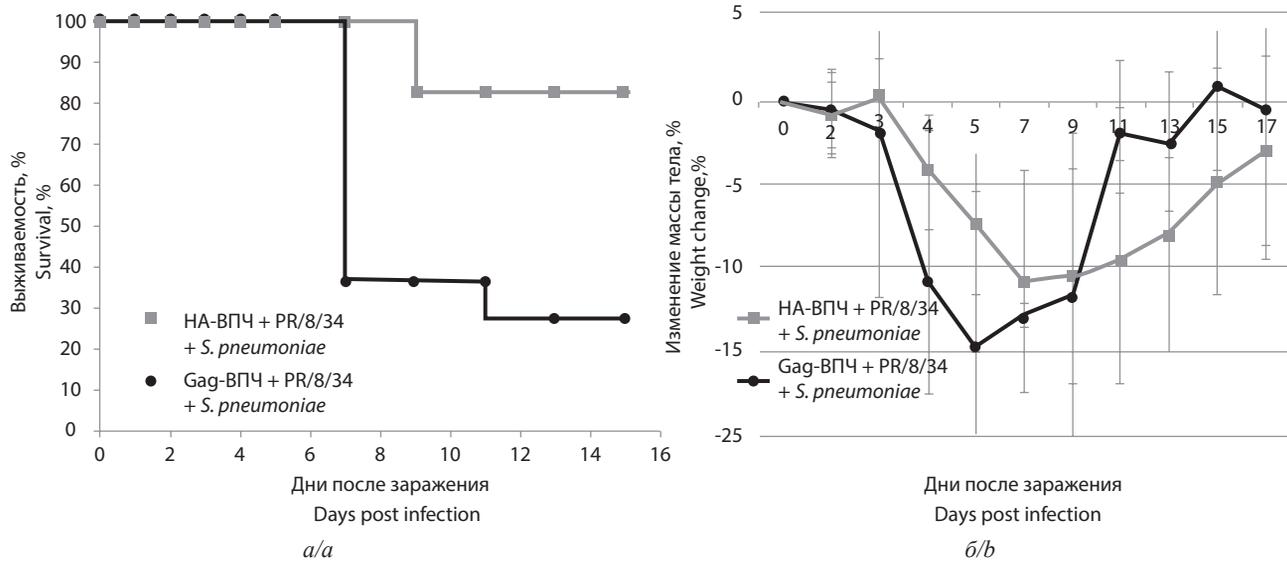
*a* – лёгкие мышей, вакцинированных HA-Gag-ВПЧ, инфицированных A/PR/8/34 (H1N1) + *S. pneumoniae*; *б* – лёгкие мышей, вакцинированных Gag-ВПЧ, инфицированных A/PR/8/34 (H1N1) + *S. pneumoniae*; *в* – лёгкие мышей, вакцинированных HA-Gag-ВПЧ, инфицированных A/NIBRG-121xp (H1N1) + *S. pneumoniae*; *г* – лёгкие мышей, вакцинированных Gag-ВПЧ, инфицированных A/NIBRG-121xp (H1N1) + *S. pneumoniae*.

**Fig. 2.** Inflammatory infiltration in the lungs of mice.

*a* – vaccination HA-Gag VLPs, infection A/PR/8/34 (H1N1) + *S. pneumoniae*; *b* – vaccination Gag VLPs, infection A/PR/8/34 (H1N1) + *S. pneumoniae*; *c* – vaccination HA-Gag VLPs, infection A/NIBRG-121xp (H1N1) + *S. pneumoniae*; *d* – vaccination Gag VLPs, infection A/NIBRG-121xp (H1N1) + *S. pneumoniae*.

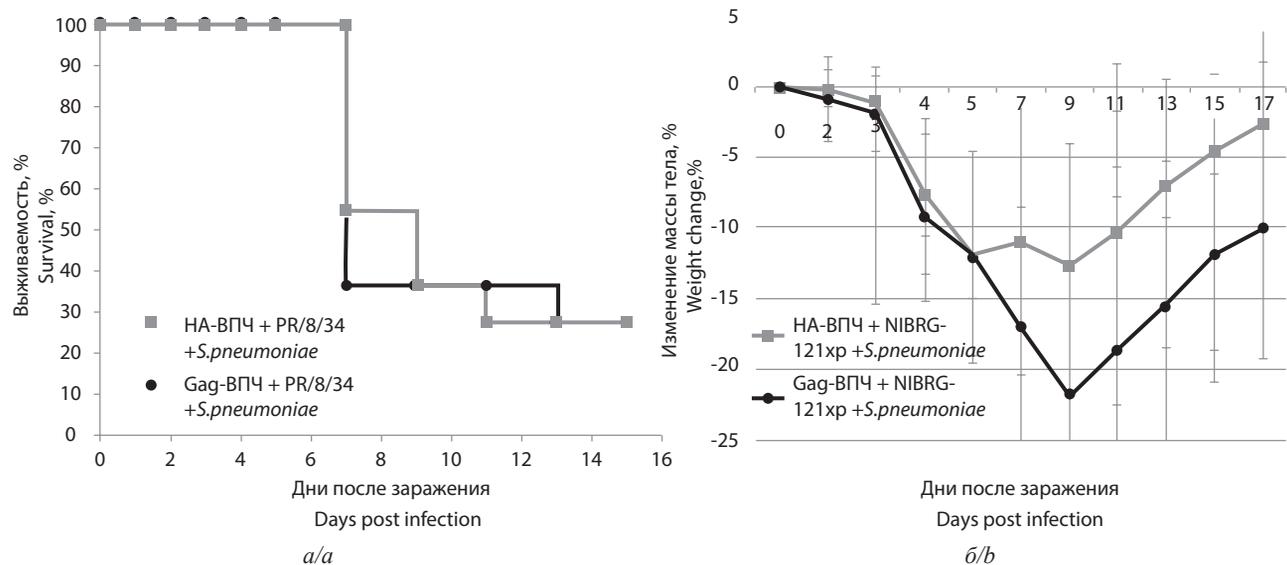
таких как острый респираторный дистресс-синдром, инфаркт миокарда и инсульт, однако чаще всего тяжёлый грипп ассоциируется с присоединением вторичных бактериальных инфекций. Как показали патоморфологические исследования материалов, собранных во время пандемии гриппа H1N1 1918 г., 90% смертельных случаев были связаны с бактериальной пневмонией. Даже в эпоху эффективных антибиотиков число вторичных бактериальных осложнений после гриппа достигает 50–60%, как это было показано в пандемию H1N1 2009 г. Иммунизация гриппозными инак-

тивированными вакцинами способна предотвращать бактериальные осложнения, однако остаётся малоизученной эффективность подобных вакцин при несопадении антигенной композиции вакцины с внезапно появившимся антигенно отличающимся штаммом вируса гриппа. В данном исследовании моделировали подобную ситуацию с помощью парентеральной иммунизации мышей HA-Gag-ВПЧ, экспрессирующими HA вируса гриппа A/PR/8/34, проводя провоцирующую гриппозную инфекцию гомологичным и гетерологичным вирусами гриппа подтипа H1N1. В отличие



**Рис. 3.** Эффект вакцинации HA-Gag-ВПЧ на выживаемость (а) и изменение массы тела (б) мышей в модели вторичной пневмонии, вызванной *S. pneumoniae*, после гриппозной инфекции гомологичным вирусом А/Пуэрто-Рико/8/34 (H1N1).

**Fig. 3.** Effect of vaccination with HA-Gag-VLPs on survival (a) and weight changes (b) in murine model of secondary pneumonia caused by *S. pneumoniae* after infection with homologous influenza virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1).



**Рис. 4.** Эффект вакцинации HA-Gag-ВПЧ на выживаемость (а) и изменение массы тела (б) мышей в модели вторичной пневмонии, вызванной *S. pneumoniae*, после гриппозной инфекции гетерологичным вирусом А/NIBRG-121xp(H1N1).

**Fig. 4.** Effect of vaccination with HA-Gag-VLPs on survival (a) and weight changes (b) in murine model of secondary pneumonia caused by *S. pneumoniae* after infection with heterologous influenza virus A / NIBRG-121xp (H1N1).

от инактивированных вирусов, ВПЧ – удобный инструмент для иммунизации избранным антигеном. Это позволило в настоящей работе оценить влияние иммунитета к HA вируса гриппа на развитие постгриппозной бактериальной пневмонии. Полученные в нашем исследовании патоморфологические данные подтверждены клиническими, вирусологическими, микробиологическими маркерами заболевания. Показано, что иммунизация HA-Gag-ВПЧ предотвращала репродукцию гомологичного вируса А/PR/8/34 (H1N1), и, как следствие, способствовала снижению бактериальной

нагрузки *S. pneumoniae*, статистически значимо уменьшила площади очагов воспаления и воспалительной инфильтрации в лёгких мышей после бактериального заражения. Патоморфологические исследования лёгких показали, что, хотя относительная площадь очагов воспаления в лёгких мышей после бактериального заражения в этой группе была наименьшей по сравнению с другими, тем не менее выявлялись очаги бронхопневмонии и микроабсцессы в количествах, сопоставимых с показателями контрольных групп животных. Данная патология развивалась при низких титрах бактериальной

ной нагрузки и, по-видимому, была связана с прямым повреждающим действием бактериальной инфекции. Иммунизация HA-Gag-ВПЧ не защищала мышей от репродукции вируса A/NIBRG-121xp (H1N1) и не предотвращала провоцирующее действие гетерологичной гриппозной инфекции на развитие бактериальной пневмонии с высокими показателями микробной нагрузки. Полученные результаты свидетельствуют о том, что индукция системного иммунного ответа только к HA вируса гриппа при парентеральной иммунизации недостаточна для обеспечения защиты от репродукции гетерологичного штамма вируса гриппа подтипа H1N1 и провоцируемой им вторичной бактериальной инфекции. Будущие исследования с применением ВПЧ, селективно экспрессирующих различные белки вируса гриппа, позволят выявить потенциал консервативных антигенов вируса гриппа и создать теоретическую базу для создания рекомбинантных гриппозных вакцин с широким спектром действия, эффективных в отношении дрейф-вариантов вируса гриппа.

### Заключение

В экспериментальной мышинной модели вторичной бактериальной пневмонии, индуцированной *S. pneumoniae*, после гриппозной инфекции, изучен эффект HA-Gag-ВПЧ, содержащих HA вируса гриппа, на состояние лёгких. Патоморфологические, клинические, вирусологические и микробиологические данные показывают, что индукция иммунного ответа к HA вируса гриппа при парентеральной иммунизации мышей HA-Gag-ВПЧ способна предотвращать размножение вируса, обеспечивая снижение бактериальной нагрузки *S. pneumoniae*, и степени поражения лёгких, защищая животных от заболевания при антигенном соответствии вакцины и штамма вируса гриппа, используемого для провокации бактериальной инфекции.

**Благодарность.** Авторы выражают признательность лаборантам ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова за проведение работ с животными – Г.А. Богачевой, Е.А. Потаповой и С.К. Кирьяновой.

### ЛИТЕРАТУРА

- Morens D.M., Taubenberger J.K., Fauci A.S. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J. Infect. Dis.* 2008; 198(7): 962-70. DOI: <http://doi.org/10.1086/591708>
- Klausberger M., Leneva I.A., Egorov A., Strobl F., Ghorbanpour S.M., Falynskova I.N., et al. Off-target effects of an insect cell-expressed influenza HA-pseudotyped gag-VLP preparation in limiting postinfluenza *Staphylococcus Aureus* infections. *Vaccine*. 2019; 38(4): 859-67. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.083>
- Klausberger M., Leneva I.A., Falynskova I.N., Vasiliev K., Poddubikov A.V., Lindner C., et al. The potential of influenza HA-specific immunity in mitigating lethality of postinfluenza pneumococcal infections. *Vaccines (Basel)*. 2019; 7(4): 187. DOI: <http://doi.org/10.3390/vaccines7040187>
- Chaussee M.S., Sandbulte H.R., Schuneman M.J., DePaula F.P., Addengast L.A., Schlenker E.H., et al. Inactivated and live, attenuated influenza vaccines protect mice against influenza: *Streptococcus pyogenes* super-infections. *Vaccine*. 2011; 29(21): 3773-81. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.031>
- Okamoto S., Kawabata S., Fujitaka H., Uehira T., Okuno Y., Hamada S. Vaccination with formalin-inactivated influenza vaccine protects mice against lethal influenza *Streptococcus pyogenes* superinfection. *Vaccine*. 2004; 22(21-22): 2887-93. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.12.024>

- Mina M., Klugman K., McCullers J. Live attenuated influenza vaccine, but not pneumococcal conjugate vaccine, protects against increased density and duration of pneumococcal carriage after influenza infection in pneumococcal colonized mice. *J. Infect. Dis.* 2013; 208(8): 1281-5. DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jit317>
- Carrat F., Flahault A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine*. 2007; 25(39-40): 6852-62. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.07.027>
- Desheva Y., Leontieva G., Kramskaya T., Grabovskaya K.B., Karev V., Mamontov A., et al. Mucosal vaccine based on attenuated influenza virus and the group B *Streptococcus* recombinant peptides protected mice from influenza and *S. pneumoniae* infections. *PLoS One*. 2019; 14(6): e0218544. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0218544>
- Ленёва И.А., Егоров А.Ю., Фалынскова И.Н., Махмудова Н.Р., Карташова Н.П., Глубокова Е.А. и др. Индукция вторичной бактериальной пневмонии у мышей при заражении пандемическим и лабораторными штаммами вируса гриппа H1N1. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; 96(2): 68-74. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-68-74>
- Махмудова Н.Р., Ленёва И.А., Ларионова Н.В., Поддубиков А.В., Фалынскова И.Н., Карташова Н.П. и др. Безопасность аттенуированной и рекомбинантной интраназальных гриппозных вакцин в условиях развития вторичной бактериальной суперинфекции. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; 96(6): 30-9. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-30-39>

### REFERENCES

- Morens D.M., Taubenberger J.K., Fauci A.S. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *J. Infect. Dis.* 2008; 198(7): 962-70. DOI: <http://doi.org/10.1086/591708>
- Klausberger M., Leneva I.A., Egorov A., Strobl F., Ghorbanpour S.M., Falynskova I.N., et al. Off-target effects of an insect cell-expressed influenza HA-pseudotyped gag-VLP preparation in limiting postinfluenza *Staphylococcus Aureus* infections. *Vaccine*. 2019; 38(4): 859-67. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.10.083>
- Klausberger M., Leneva I.A., Falynskova I.N., Vasiliev K., Poddubikov A.V., Lindner C., et al. The potential of influenza HA-specific immunity in mitigating lethality of postinfluenza pneumococcal infections. *Vaccines (Basel)*. 2019; 7(4): 187. DOI: <http://doi.org/10.3390/vaccines7040187>
- Chaussee M.S., Sandbulte H.R., Schuneman M.J., DePaula F.P., Addengast L.A., Schlenker E.H., et al. Inactivated and live, attenuated influenza vaccines protect mice against influenza: *Streptococcus pyogenes* super-infections. *Vaccine*. 2011; 29(21): 3773-81. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.03.031>
- Okamoto S., Kawabata S., Fujitaka H., Uehira T., Okuno Y., Hamada S. Vaccination with formalin-inactivated influenza vaccine protects mice against lethal influenza *Streptococcus pyogenes* superinfection. *Vaccine*. 2004; 22(21-22): 2887-93. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2003.12.024>
- Mina M., Klugman K., McCullers J. Live attenuated influenza vaccine, but not pneumococcal conjugate vaccine, protects against increased density and duration of pneumococcal carriage after influenza infection in pneumococcal colonized mice. *J. Infect. Dis.* 2013; 208(8): 1281-5. DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jit317>
- Carrat F., Flahault A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine*. 2007; 25(39-40): 6852-62. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.07.027>
- Desheva Y., Leontieva G., Kramskaya T., Grabovskaya K.B., Karev V., Mamontov A., et al. Mucosal vaccine based on attenuated influenza virus and the group B *Streptococcus* recombinant peptides protected mice from influenza and *S. pneumoniae* infections. *PLoS One*. 2019; 14(6): e0218544. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0218544>
- Leneva I.A., Egorov A.Yu., Falynskova I.N., Makhmudova N.R., Kartashova N.P., Glubokova E.A., et al. Induction of secondary bacterial pneumonia in mice infected with pandemic and laboratory strains of the H1N1 influenza virus. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2019; 96(2): 68-74. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-68-74> (in Russian)
- Makhmudova N.R., Leneva I.A., Lariionova N.V., Poddubikov A.V., Falynskova I.N., Kartashova N.P., et al. The safety of attenuated and recombinant nasal influenza vaccines in terms of the development of secondary bacterial superinfection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2019; 96(6): 30-9. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-30-39> (in Russian)



## Моделирование гриппозной инфекции у половозрелых крыс стока Wistar

Марченко В.А.<sup>1</sup>, Барашкова С.В.<sup>2</sup>, Зелинская И.А.<sup>2</sup>, Торопова Я.Г.<sup>2</sup>, Сорокин Е.В.<sup>1</sup>, Жилинская И.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова» Минздрава России, 197341, Санкт-Петербург, Россия

В настоящее время установлено, что кровеносные сосуды являются мишенью для вируса гриппа, однако механизм его воздействия на сердечно-сосудистую систему неизвестен.

**Цель** исследования – адаптация штамма вируса гриппа А/Санкт-Петербург/48/16 H1N1(pdm09) к половозрелым крысам стока Wistar, так как эти животные являются основной экспериментальной моделью при изучении патологии сердечно-сосудистой системы.

**Материал и методы.** Для исследования использовали 33 крысы стока Wistar, составивших 11 групп, включая контрольную. В каждой группе было по 3 животных. Вирус гриппа А (ВГА) пассировали в 10–12-дневных куриных эмбрионах. Инокуляцию вирусосодержащего материала проводили интраназально в объеме 0,2 мл. Через 24 ч после инфицирования животных подвергали наркотизации и некропии с целью получения лёгочного гомогената. Титр ВГА в гомогенатах лёгких крыс определяли в куриных эмбрионах. На последних пассажах выявляли гистологические изменения в тканях и сосудах лёгких, а также проводили иммуногистохимическое исследование для идентификации ВГА.

**Результаты.** Инфекционный титр вируса гриппа А/Санкт-Петербург/48/16 H1N1(pdm09) в гомогенатах лёгких инфицированных крыс стока Wistar на последнем этапе адаптации составил 7,0 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл. Гистологические исследования выявили выраженные изменения со стороны респираторного тракта (спазм бронхиол, отёк подслизистого слоя, слушивание реснитчатых эпителиальных клеток бронхиол) и лёгочных сосудов (спазм, десквамацию и набухание эндотелиоцитов, разволокнение и набухание эластической мембраны и меди). С целью идентификации ВГА в кровеносных сосудах и тканях лёгких выполняли иммуногистохимическое исследование с использованием моноклональных антител к NP-антигену ВГА.

**Заключение.** Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что штамм вируса гриппа А/Санкт-Петербург/48/16 H1N1(pdm09) был адаптирован к половозрелым крысам стока Wistar с сохранением вирулентных свойств. Инфекционный титр вируса на последнем этапе адаптации составил 7,0 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл. Идентификация ВГА подтверждена иммуногистохимическим исследованием.

**Ключевые слова:** вирус гриппа; крысы; кровеносные сосуды; лёгкие; иммуногистохимия; гистология.

**Для цитирования:** Марченко В.А., Барашкова С.В., Зелинская И.А., Торопова Я.Г., Сорокин Е.В., Жилинская И.Н. Моделирование гриппозной инфекции у половозрелых крыс стока Wistar. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(3): 159-166. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-159-166>

**Для корреспонденции:** Марченко Владимир Александрович, аспирант очной формы обучения, лаборант-исследователь лаборатории системной вирусологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России, 197376, Санкт-Петербург. E-mail: [vmarcenco@mail.ru](mailto:vmarcenco@mail.ru)

**Участие авторов:** Марченко В.А. – культивирование вируса гриппа, адаптация вируса на крысах, статистическая обработка данных, подбор данных литературы; Барашкова С.В. – иммуногистохимическое и морфометрические исследования; Зелинская И.А. – проводка материала для последующего иммуногистохимического исследования; Торопова Я.Г. – фиксация материала для последующего иммуногистохимического исследования; Сорокин Е.В. – получение моноклональных антител к NP-антигену вируса гриппа А; Жилинская И.Н. – написание научной статьи.

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

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

Поступила 05.05.2020

Принята в печать 16.05.2020

### Modeling influenza virus infection in mature Wistar rats

Vladimir A. Marchenko<sup>1</sup>, Svetlana V. Barashkova<sup>2</sup>, Irina A. Zelinskaya<sup>2</sup>, Yana G. Toropova<sup>2</sup>, Evgeniy V. Sorokin<sup>1</sup>, Irina N. Zhilinskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, 197376, Russia;

<sup>2</sup>Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, 197341, Russia

It has now been established that blood vessels are target for influenza, but the mechanism by which the influenza virus affects the cardiovascular system is unknown.

**The aim** – adaptation of influenza virus A/St. Petersburg/48/16 H1N1(pdm09) to mature Wistar rats, as these animals are the main experimental model for studying the pathology of the cardiovascular system.

**Material and methods.** Passage of influenza A virus (IAV) in embryonated chicken eggs, intranasal inoculation of rats with virus-containing material s, production of pulmonary homogenate, determination of IAV titer in embryonated chicken eggs, detection of histological changes in lung and pulmonary vessels.

**Results.** The article presents the results of the adaptation of influenza virus A/St. Petersburg/48/16 H1N1(pdm09) to mature Wistar rats. The infectious titer of the virus in the homogenates of infected rats lungs at the last stage of adaptation was 7.0 lg EID<sub>50</sub>/ml. Histological studies revealed pronounced changes in the respiratory tract (spasm of bronchioles, submucosal edema, desquamation of ciliated epithelium of bronchioles) and pulmonary vessels (spasm, desquamation and swelling of endotheliocytes, dissociation and swelling of the elastic membrane and media). In order to identify IAV in blood vessels and lung tissues, an immunohistochemical study was performed using monoclonal antibodies to NP antigen of IAV.

**Conclusion.** The data obtained allow us to conclude that the strain of influenza virus A/St. Petersburg/48/16 H1N1(pdm09) was adapted to mature Wistar rats maintaining virulent properties. The infectious titer of the virus at the last stage of adaptation was 7.0 lg EID<sub>50</sub>/ml. IAV identification is confirmed by immunohistochemical examination.

**Keywords:** influenza virus; rats; blood vessels; lungs; immunohistochemistry; histology.

**For citation:** Marchenko V.A., Barashkova S.V., Zelinskaya I.A., Toropova Ya.G., Sorokin E.V., Zhilinskaya I.N. Modeling influenza virus infection in mature Wistar rats. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology)*. 2020; 65(3): 159-166. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-159-166>

**For correspondence:** Vladimir A. Marchenko, graduate student, research assistant of Laboratory of systemic virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russia. E-mail: vmarcenco@mail.ru

**Information about the authors:**

Marchenko V.A., <https://orcid.org/0000-0001-6870-3157>  
Barashkova S.V., <https://orcid.org/0000-0002-5618-4510>  
Zelinskaya I.A., <https://orcid.org/0000-0002-1971-3444>  
Toropova Ya.G., <https://orcid.org/0000-0003-1629-7868>  
Sorokin E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1732-1727>  
Zhilinskaya I.N., <https://orcid.org/0000-0002-0084-1323>

**Contribution:** Marchenko V.A. – cultivation of influenza virus, virus adaptation in Wistar rats, statistical data analysis, literature search; Barashkova S.V. – immunohistochemistry assay, morphometric assay; Zelinskaya I.A. – tissue preparation for IHC assay; Toropova Ya.G. – fixation of material for IHC assay; Sorokin E.V. – production of monoclonal antibodies for NP antigen of influenza virus A; Zhilinskaya I.N. – writing of the scientific article.

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

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

Received 05 May 2020  
Accepted 16 May 2020

## Введение

В настоящее время установлено, что система гемостаза и эндотелий кровеносных сосудов являются новыми мишенями для гриппа. Это открывает новые аспекты патогенеза вирусной инфекции и, соответственно, новые подходы к лечению. Особенно тяжёлая клиническая картина наблюдалась у больных гриппом во время эпидемий 1918–1920, 2009 и 2015–2016 гг.: носовые кровотечения, геморрагии на коже и слизистых, микрогематурия, острый респираторный дистресс-синдром и синдром диссеминированного внутрисосудистого свёртывания [1–4]. Кроме того, для гриппа характерна высокая частота осложнений со стороны сердечно-сосудистой системы, прежде всего у больных с сопутствующими сердечно-сосудистыми заболеваниями [5–8]. Все эти данные указывают на необходимость выяснения механизмов воздействия вируса гриппа на сердечно-сосудистую систему. Для решения проблемы следует смоделировать гриппозную инфекцию на крысах, так как эти животные являются основной экспериментальной моделью при изучении механизмов патологии сердечно-сосудистой системы [9–11]. Крысы в качестве модели для экспериментальной гриппозной инфекции

не так широко используются как мыши, хорьки и другие лабораторные животные, поскольку у них грипп не вызывает летального исхода. Кроме того, наиболее чувствительны к гриппу новорождённые и 60-дневные крысы (линии F-344 и Sprague-Dawley) [12].

**Цель** исследования – моделирование гриппозной инфекции на половозрелых самцах крыс стока Wistar, так как именно на них разработаны релевантные модели сердечно-сосудистой патологии.

## Материал и методы

**Лабораторные животные.** Для исследований использовали 33 самцов крыс стока Wistar в возрасте от 3 до 5 мес, массой тела 230–250 г. Животных поделили случайным отбором по массе тела так, чтобы индивидуальный показатель входил в диапазон вариации  $\pm 10\%$  от среднего значения. Поскольку для процесса адаптации требуется в среднем 10–12 пассажей вируса, в исследовании было использовано 10 групп, в каждой по 3 животных (на каждый пассаж вируса приходилось по одной группе). В качестве контроля использовали группу, состоящую также из 3 животных. Крыс держали в отдельном боксе (с целью исключения контакта с другими лабо-

раторными животными), на полном пищевом рационе, соответствующем суточным нормативам питания для данного вида животных, при стандартном суточном свето-темновом режиме. Опыты проводили, соблюдая принципы гуманного обращения с животными, регламентированные требованиями Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента и последующей утилизации. Массу тела животных определяли непосредственно перед инокуляцией вирусосодержащего материала, когда животное находилось под глубокой анестезией, а также перед некропсией (через 24 ч после инфицирования).

*Вирус.* Для адаптации вируса гриппа к крысам был выбран штамм А/Санкт-Петербург/48/16 H1N1(pdm09), полученный из лаборатории эволюционной изменчивости вирусов гриппа ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Выбор данного изолята был основан на клинических исследованиях вируса H1N1(pdm09), вызывавшего вирусные геморрагические пневмонии [13]. Перед адаптацией вирус был трижды пассирован через куриные эмбрионы для повышения титра инфекционной активности (до  $9 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$ ). Инфекционную активность вируса гриппа во время адаптации определяли на куриных эмбрионах, начиная с 4-го пассажа. Для этого готовили 10-кратные разведения вируса в 4,5 мл фосфатно-солевого буфера, а затем вводили по 0,2 мл вирусосодержащей жидкости из разведений от  $10^{-3}$  до  $10^{-8}$ , используя на каждое разведение по 5 эмбрионов. Куриные эмбрионы инкубировали при  $35^\circ\text{C}$  в течение 48 ч. По истечении срока инкубации отдельно из каждого эмбриона отбирали по 100 мкл аллантоисной жидкости, которую помещали в лунки планшета для иммунологических реакций. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл 0,5% суспензии куриных эритроцитов. Через 30–40 мин контакта при комнатной температуре, после оседания эритроцитов в контроле, проводили учёт геммагглютинации.

*Адаптация вируса гриппа в лёгких крыс.* Адаптацию вируса гриппа проводили путём серии из 10 пассажей через лёгкие животных. Крысам 1-й группы ( $n = 3$ ) интраназально инокулировали 0,2 мл вирусосодержащей аллантоисной жидкости. Спустя 24 ч после инфицирования проводили эвтаназию изофлураном. В стерильных условиях крыс вскрывали и выделяли лёгкие, после чего делали 10% гомогенат лёгких в культуральной среде alpha-MEM. Гомогенат центрифугировали при относительном центробежном ускорении  $1000g$  в течение 10 мин для осаждения клеточного дебриса, затем супернатант аликвотировали и хранили при  $-80^\circ\text{C}$ . Аликвоты с гомогенатами, которые имели наибольшие титры инфекционной активности вируса, были выбраны для следующих пассажей.

*Гистологическое исследование.* Для исследования гистопатологических изменений в тканях и кровеносных сосудах лёгких были выбраны 9-й и 10-й пас-

сажи. Материал фиксировали в 10% забуференном формалине в течение 24 ч при комнатной температуре. Гистологическую проводку выполняли с использованием автоматического процессора замкнутого типа Shandon Excelsior ES (Thermo, Великобритания) в изопропиловом спирте. С готовых гистологических блоков, залитых в гомогенизированный парафин, изготавливали срезы толщиной 4–5 мкм на ротационном микротоме. Срезы депарафинизировали в ксилоле, дегидратировали в спиртах и окрашивали гематоксилином и эозином. При просмотре материала на световом микроскопе Nikon Eclipse E200 при увеличении  $\times 40$ ,  $\times 100$ ,  $\times 400$  (окуляр Nikon CFI  $10\times/20$ , объективы Nikon E Plan  $4\times/0,10 \text{ WD } 30$ , Nikon E Plan  $10\times/0,25 \text{ WD } 7,0$ , Nikon E Plan  $40\times/0,65 \text{ WD } 0,65$ ) определяли качество гистологической проводки и пригодность материала для дальнейшего исследования. Крысам контрольной группы за 24 ч до вскрытия интраназально инокулировали 0,2 мл культуральной среды alpha-MEM.

*Иммуногистохимическое исследование.* С парафиновых блоков лёгких крыс, инфицированных исследуемым вирусом 9-го и 10-го пассажей, изготавливали срезы толщиной 4–5 мкм и помещали их на предметные стёкла с поли-L-лизинным покрытием (Thermo Scientific, США). Для обнаружения вируса гриппа А в тканях и кровеносных сосудах лёгких инфицированных крыс использовали первичные мышинные моноклональные антитела (Clone 6D11), полученные из отдела биотехнологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Предварительную температурную демаскировку не выполняли. Инкубацию срезов с первичными антителами в разведении 1 : 1000 проводили на протяжении 1 ч при комнатной температуре во влажной камере. Для детекции NP-антигена в аутопсийном материале использовали систему визуализации фирмы Novocastra (Германия), включающую реакцию с DAB-хромогеном.

Для количественной оценки интенсивности экспрессии NP-антигена вируса гриппа проводили морфометрические исследования, в ходе которых выполняли микрофотографирование микропрепаратов, обработанных моноклональными антителами к NP-антигену и выявленных с помощью иммуногистохимического метода, на микроскопе Nikon Eclipse E200 с цифровой камерой Nikon DS-Fi1 и программным обеспечением Nis-Elements F3.2 с постоянными параметрами: разрешение Fast (Focus) –  $1280 \times 960$  пикселей, Quality (Capture) –  $2560 \times 1920$  пикселей; Exposure 30 мс (объектив  $\times 40$ ); Gain  $1,70\times$ ; Contrast Enhanced; Advanced – Hemotoxilin, Red 1,05, Green 0,82, Blue 1,90 [14]. Предварительно калибровали объектив Nikon E Plan  $40\times/0,65 \text{ WD } 0,65$  с использованием объект-микрометра 0–1 мм / 100 (Nikon).

Фотосъёмку кровеносных сосудов лёгких крыс проводили на шести произвольно выбранных полях зрения с увеличением  $\times 40$ . Поля зрения с артериальными изменениями и дефектами окрашивания исключали при фотосъёмке. Морфоме-

трическую обработку полученных снимков осуществляли в программе Nis-Elements BR 4,40 (Nikon) при постоянных настройках с использованием бинаризации по синему каналу в автоматическом режиме с постоянными значениями порога (11–100), затем вручную удаляли ненужные объекты [14]. Среднюю интенсивность сигнала вычисляли как среднюю арифметическую интенсивности каждого пикселя (I) в RGB-модели (кодировка цвета с помощью трёх основных цветов: красного (R), зеленого (G) и синего (B)) по формуле:

$$I = 1/3 (R + G + B).$$

Статистическую обработку данных проводили с помощью параметрического теста Стьюдента, непараметрического критерия Фридмана (ANOVA) и Манна–Уитни с использованием программного обеспечения MS Office Excel 2016 и Statistica 8.0. Различия считали статистически значимыми для значений  $p < 0,05$ . Для представления полученных данных использовали показатели описательной статистики: среднеарифметическое значение и стандартное отклонение.

### Результаты

**Клинические симптомы, изменение массы тела.** В периоде адаптации у инфицированных крыс стока Wistar клинических симптомов не наблюдалось. Изменение массы тела крыс через 1 сут после инфицирования представлено на **рис. 1**.

**Инфекционная активность вируса.** Полученные результаты указывают на активную репродукцию вируса гриппа в лёгких половозрелых крыс стока Wistar (см. **таблицу**). Для дальнейшего исследования бы-

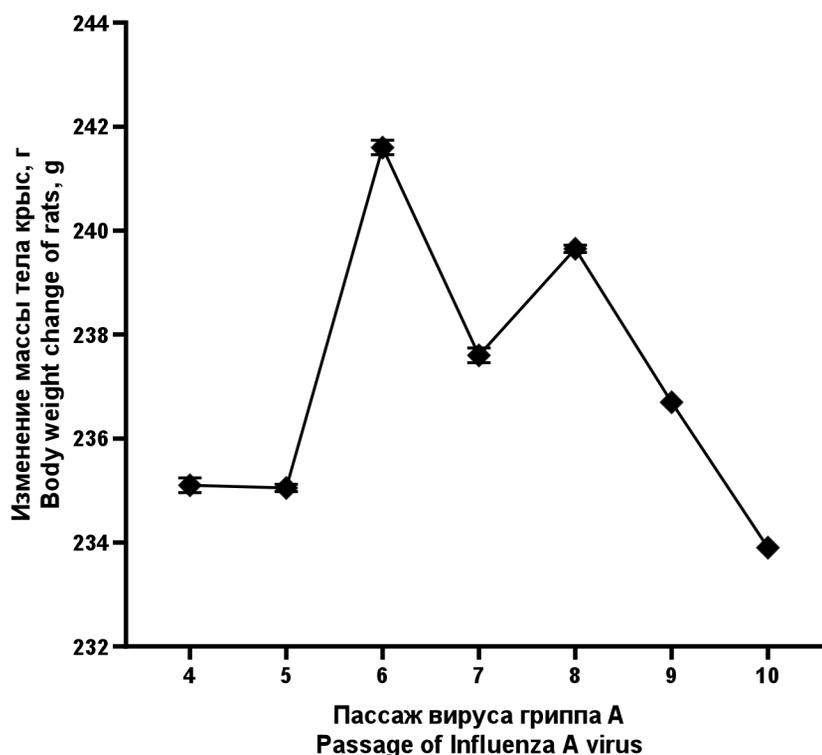
Результаты титрования вируса гриппа А/Санкт-Петербург/48/16 H1N1(pdm09) на куриных эмбрионах\*

The results of titration of the influenza virus A/St. Petersburg/48/16 H1N1(pdm09) in embryonated chicken eggs\*

Пассаж, № Number of passage	Инфекционная активность вируса гриппа, lg ЭИД <sub>50</sub> /мл Virus titer, lg EID <sub>50</sub> /ml
4	6,0 ± 0
5	5,2 ± 0,3
6	6,2 ± 0,3
7	6,2 ± 0,3
8	6,2 ± 0,3
9	6,6 ± 0,2
10	7,0 ± 0

**Примечание.** \* Данные представлены как lg ЭИД<sub>50</sub>/мл. Показаны стандартные отклонения по пяти повторам ( $p < 0,05$ ).

**Note.** \* Data expressed as lg EID<sub>50</sub>/ml. A standard deviation for 5 repetitions is shown ( $p < 0.05$ ).

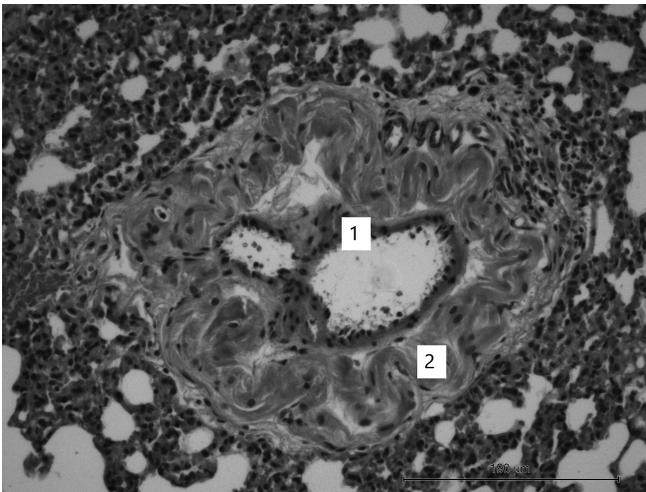


**Рис. 1.** Изменение массы тела крыс на разных пассажах вируса А/Санкт-Петербург/48/16 H1N1(pdm09) через 24 ч после инфицирования. Показаны стандартные отклонения по трём повторам ( $p < 0,05$ ). Статистически значимых отличий не выявлено.

**Fig. 1.** Comparison of the change in body weight of rats at different passages of the influenza virus A/St. Petersburg/48/16 H1N1(pdm09) after 24 hours post infection. A standard deviation for 3 repetitions is shown ( $p < 0.05$ ). No statistically significant differences were found.

ли выбраны вирусы, прошедшие 9-й и 10-й пассажи в лёгких крыс. Выбор этих пассажей согласовывался с данными об инфекционной активности вирусов гриппа у новорождённых и 60-дневных крыс [12, 15].

**Гистологическое исследование.** Для гистопатологических исследований были выбраны кровеносные сосуды и ткани лёгких крыс, инфицированных вирусом гриппа на 9-м и 10-м пассажах. На **рис. 2** показано, как в артериоле среднего калибра в 9-м пассаже по сравнению с контролем наблюдали выраженное разволокнение и набухание меди артериолы, десквамацию эндотелия (по типу «частокола»), нити фибрина в просвете артериолы. На **рис. 3** представлены гистопатологические изменения со стороны артериолы мелкого калибра в 9-м пассаже: выраженный спазм, набухшие эндотелиоциты, местами набухание ядер, эластической мембраны и меди. На **рис. 4** представлены гистопатологические изменения со стороны мерцательного эпителия респираторного тракта в 9-м пассаже: слущивание мерцательного эпителия бронхиол и отёк подслизистого слоя бронхиол. В лёгких крыс контрольной группы патологических изменений не отмечено (**рис. 5**). На **рис. 6** и **7** показаны гистопатологические изменения со стороны сосудов и лёгочной паренхимы в 10-м пассаже: невыраженный спазм артериолы

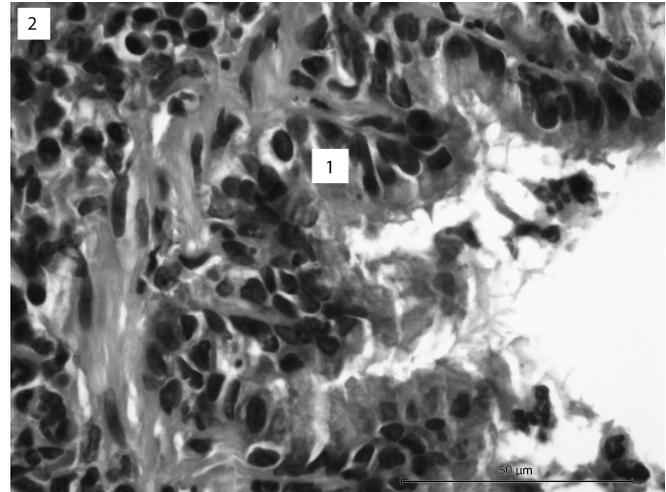


**Рис. 2.** Гистопатологические изменения в артериоле среднего калибра в 9-м пассаже вируса гриппа (ув.  $\times 100$ ; окрашивание гематоксилином и эозином).

1 – эндотелий; 2 – мышечная оболочка сосуда.

**Fig. 2.** Histopathological changes in medium caliber arteriole; 9<sup>th</sup> passage of influenza virus (Magnification  $\times 100$ ; haematoxylin and eosin staining).

1 – endothelium; 2 – tunica media.

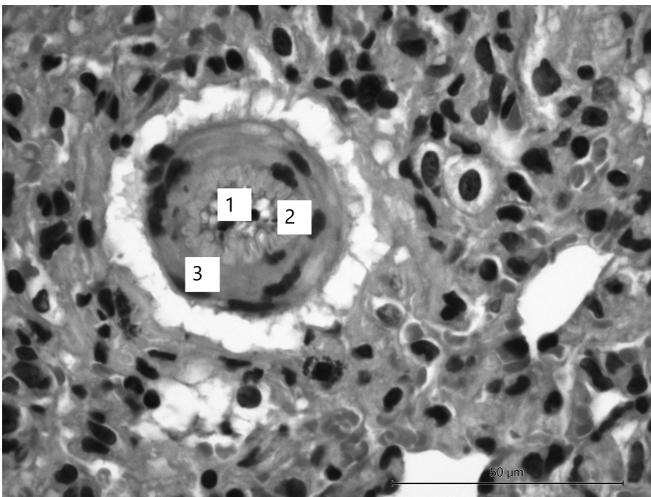


**Рис. 4.** Гистопатологические изменения в мерцательном эпителии в 9-м пассаже вируса гриппа (ув.  $\times 40$ ; окрашивание гематоксилином и эозином).

1 – мерцательный эпителий; 2 – подслизистый слой бронхиол.

**Fig. 4.** Histopathological changes in ciliated epithelium; 9<sup>th</sup> passage of influenza virus (Magnification  $\times 40$ ; haematoxylin and eosin staining).

1 – ciliated epithelium; 2 – submucosa of bronchioles.

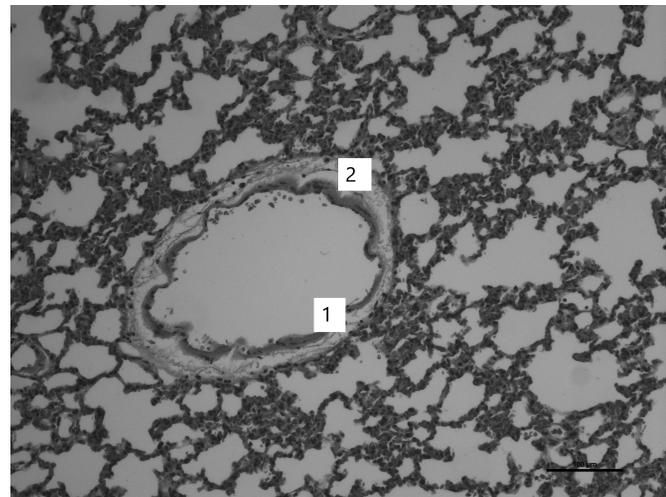


**Рис. 3.** Гистопатологические изменения в артериоле малого калибра в 9-м пассаже вируса гриппа (ув.  $\times 40$ ; окрашивание гематоксилином и эозином).

1 – эндотелий; 2 – мышечная оболочка сосуда, 3 – мерцательный эпителий.

**Fig. 3.** Histopathological changes in small caliber arteriole; 9<sup>th</sup> passage of influenza virus (Magnification  $\times 40$ ; haematoxylin and eosin staining).

1 – endothelium; 2 – tunica media, 3 – ciliated epithelium.



**Рис. 5.** Контрольный срез ткани и кровеносного сосуда лёгких у неинфицированной крысы (ув.  $\times 100$ ; окрашивание гематоксилином и эозином).

1 – эндотелий; 2 – мышечная оболочка сосуда.

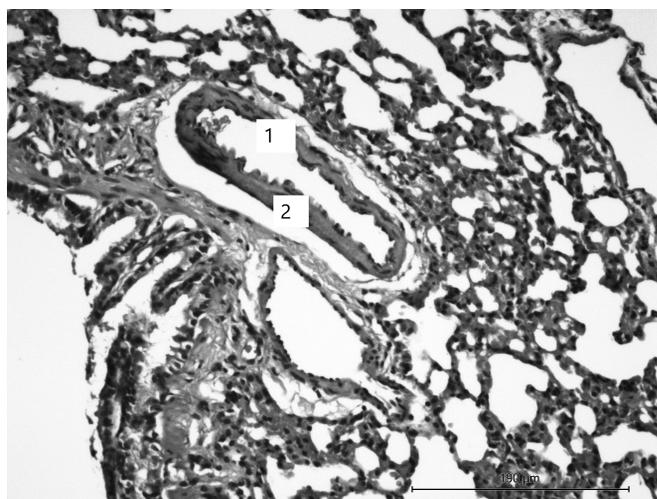
**Fig. 5.** Control of tissue section of lungs and pulmonary blood vessel in uninfected rat (Magnification  $\times 100$ ; haematoxylin and eosin staining).

1 – endothelium; 2 – tunica media.

и дистрофические явления в мерцательном эпителии респираторного тракта, слушивание мерцательного эпителии бронхиол, отёк и спазм.

**Иммуногистохимическое исследование.** Иммуногистохимическим методом определяли NP-белок вируса гриппа в 9-м и 10-м пассажах. На **рис. 8** по-

казана умеренная экспрессия NP-антигена в гладкомышечном слое и незначительная – в интерстиции и эндотелии сосуда. На **рис. 9** в том же пассаже удалось выявить умеренную экспрессию антигена в мерцательном эпителии и выраженную – в антиген-презентирующих клетках. В 10-м пас-

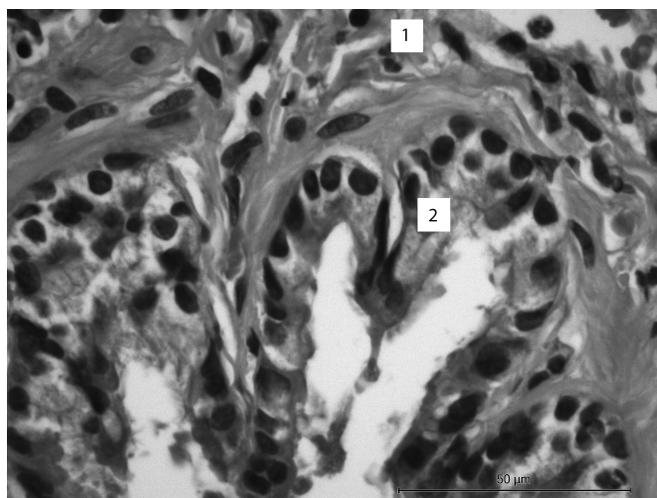


**Рис. 6.** Гистопатологические изменения в артериоле среднего калибра в 10-м пассаже вируса гриппа (ув.  $\times 100$ ; окрашивание гематоксилином и эозином).

1 – эндотелий; 2 – мышечная оболочка сосуда.

**Fig. 6.** Histopathological changes in medium caliber arteriole; 10<sup>th</sup> passage of influenza virus (Magnification  $\times 100$ ; haemotoxylin and eosin staining).

1 – endothelium; 2 – tunica media.



**Рис. 7.** Гистопатологические изменения в мерцательном эпителии в 10-м пассаже вируса гриппа (ув.  $\times 40$ ; окрашивание гематоксилином и эозином).

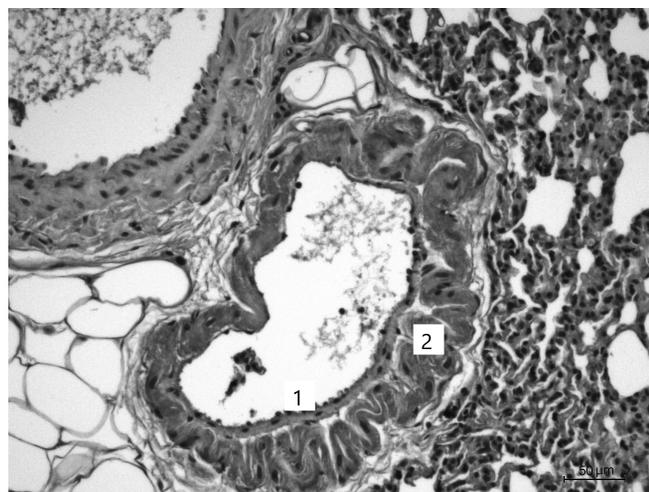
1 – мерцательный эпителий; 2 – подслизистый слой бронхиол.

**Fig. 7.** Histopathological changes in ciliated epithelium; 10<sup>th</sup> passage of influenza virus (Magnification  $\times 40$ ; haemotoxylin and eosin staining).

1 – ciliated epithelium; 2 – submucosa of bronchioles.

саже обнаруживалась незначительная экспрессия NP-антигена в эндотелии и слабая в меди сосуда (рис. 10). Иммуногистохимическое исследование не выявило присутствия NP-антигена вируса гриппа А в контрольных срезах сосудов и тканях лёгких крыс (рис. 11).

Средняя интенсивность экспрессии NP-антигена

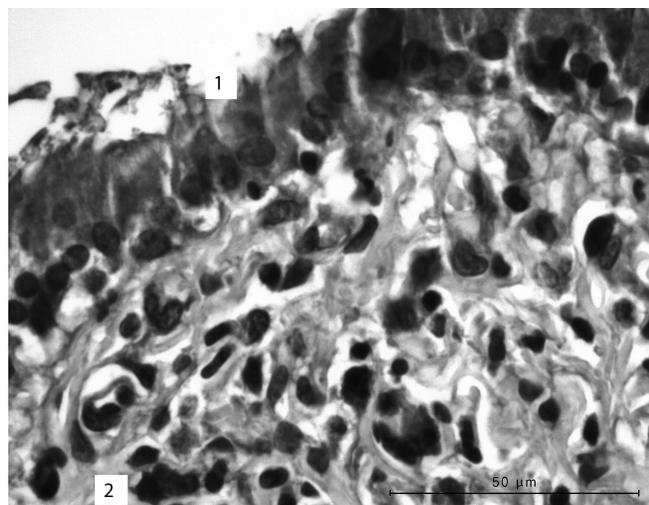


**Рис. 8.** Иммуногистохимический анализ локализации NP-антигена вируса гриппа в артериоле крупного калибра в 9-м пассаже вируса гриппа (ув.  $\times 40$ ; окрашивание DAB-хромогеном).

1 – эндотелий; 2 – мышечная оболочка сосуда.

**Fig. 8.** Immunohistochemical analysis of localization of the NP-antigen of influenza virus in large caliber arteriole; 9<sup>th</sup> passage of the influenza virus (magnification  $\times 40$ ; DAB chromogen staining).

1 – endothelium; 2 – tunica media.



**Рис. 9.** Иммуногистохимический анализ локализации NP антигена вируса гриппа в мерцательном эпителии в 9-м пассаже вируса гриппа (ув.  $\times 40$ ; окрашивание тканей DAB-хромогеном).

1 – мерцательный эпителий; 2 – тканевой макрофаг.

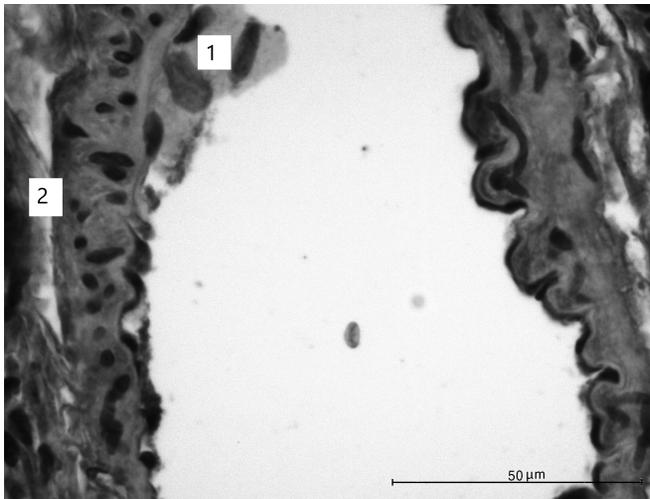
**Fig. 9.** Immunohistochemical analysis of localization of the NP antigen of influenza virus in ciliated epithelium; 9<sup>th</sup> passage of the influenza virus (magnification  $\times 40$ ; DAB chromogen staining).

1 – ciliated epithelium; 2 – tissue-resident macrophage.

в кровеносных сосудах в 9-м и 10-м пассажах варьировала в пределах 101,24–126,61.

### Обсуждение

Проведённые исследования показали, что уже через 1 сут после инфицирования половозрелых самцов крыс стока Wistar вирусом гриппа развивалась грип-

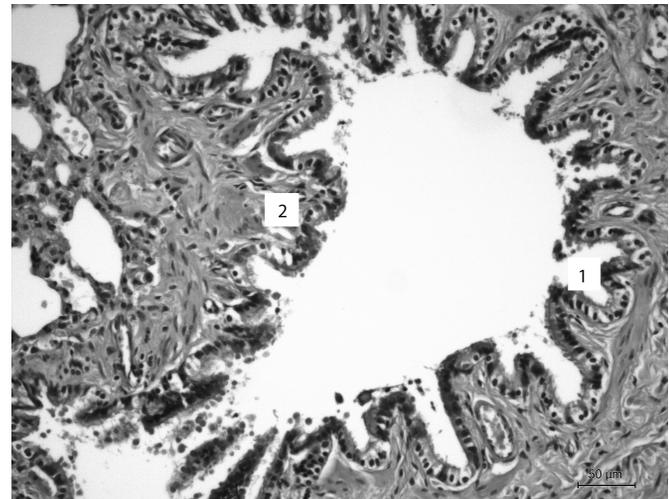


**Рис. 10.** Иммуногистохимический анализ локализации NP-антигена вируса гриппа в артериоле крупного калибра в 10-м пассаже (ув.  $\times 40$ ; окрашивание DAB-хромогеном).

1 – эндотелий; 2 – мышечная оболочка сосуда.

**Fig. 10.** Immunohistochemical analysis of localization of the NP antigen of influenza virus in large caliber arteriole; 10<sup>th</sup> passage of the influenza virus (magnification  $\times 40$ ; DAB chromogen staining).

1 – endothelium; 2 – tunica media.



**Рис. 11.** Иммуногистохимический анализ локализации NP-антигена вируса гриппа в ткани лёгких у крыс, не заражённых вирусом гриппа (ув.  $\times 100$ ; окрашивание тканей DAB-хромогеном).

1 – мерцательный эпителий; 2 – подслизистый слой бронхиол.

**Fig. 11.** Immunohistochemical analysis of localization of the NP antigen of influenza virus in lung tissue of uninfected rats (magnification  $\times 100$ ; DAB chromogen staining).

1 – ciliated epithelium; 2 – submucosa of bronchioles.

позная нелетальная инфекция, как и в случае инфицирования новорождённых и 60-дневных крыс линий Sprague-Dawley и Fischer-344. При этом в процессе адаптации вируса гриппа масса тела заражённых крыс не снижалась. Это согласуется с данными, полученными на крысах Sprague-Dawley и Fischer-344 [8]. Кроме того, инфекционная активность вируса гриппа с 4-го до 10-го пассажа включительно (от 6,0 до 7,0 lg ЭИД<sub>50</sub>/мл) указывает на интенсивную репродукцию вируса в лёгких. Репродукция вируса гриппа была также подтверждена детекцией NP-антигена вируса гриппа А в тканях и кровеносных сосудах (артериях и венах) лёгких. В процессе репродукции исследуемого вируса были выявлены гистопатологические изменения как в кровеносных сосудах, так и в тканях лёгких крыс (геморрагический экссудат в просвете бронхов, спазм и отёк бронхиол, слущивание мерцательного эпителия бронхиол, неравномерная воздушность и мелкие очаги с экссудатом в лёгочной ткани, инфильтрация мононуклеарных клеток, присутствие апоптотных телец), что соответствует гистопатологическим изменениям, которые были зарегистрированы в аутопсийном материале у взрослых пациентов, умерших в 2009 г. от вируса гриппа А/(H1N1)pdm09 [13]. На основании полученных гистопатологических и иммуногистохимических данных был сделан вывод о том, что для дальнейших исследований целесообразно использовать вирус гриппа, прошедший 9 пассажей через лёгкие крыс стока Wistar.

#### Заключение

В ходе данного исследования установлено, что штамм вируса гриппа А/Санкт-Петербург/48/16 (H1N1)pdm09 способен вызывать продуктивную

инфекцию у половозрелых крыс стока Wistar. Это подтверждено относительно высокой инфекционной активностью вируса в гомогенатах лёгких инфицированных крыс на последних пассажах (6,6–7,0 lg ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл). Репродукция вируса гриппа подтверждена детекцией NP-антигена вируса гриппа А в тканях и кровеносных сосудах лёгких иммуногистохимическим методом. Кроме того, в процессе адаптации исследуемого вируса были выявлены гистопатологические изменения как в кровеносных сосудах, так и в тканях лёгких крыс. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что половозрелые крысы стока Wistar могут служить экспериментальной моделью при изучении воздействия гриппозной инфекции на сердечно-сосудистую систему.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Opie E.L. The pathologic anatomy of influenza based chiefly on American and British sources. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1928; 5(2): 285-303.
- Lobo S.M., Watanabe A.S.A., Salomão M.L.M., Queiroz F., Gandolfi J.V., de Oliveira N.E., et al. Excess mortality is associated with influenza A (H1N1) in patients with severe acute respiratory illness. *J. Clin. Virol.* 2019; 116: 62-8. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.05.003>
- Fukunaga S., Ishida C., Nakaoka A., Ito T. A case of acute kidney injury and disseminated intravascular coagulation associated with influenza B viral infection. *CEN Case Rep.* 2014; 4(1): 95-100. DOI: <http://doi.org/10.1007/s13730-014-0147-9>
- Watanabe T., Yoshikawa H., Abe Y., Yamazaki S., Uehara Y., Abe T. Renal involvement in children with influenza A virus infection. *Pediatr. Nephrol.* 2003; 18(6): 541-4. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00467-003-1143-z>
- Sellers S.A., Hagan R.S., Hayden F.G., Fischer W.A. The hidden burden of influenza: A review of the extra-pulmonary complications of influenza infection. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2017; 11(5): 372-93. DOI: <http://doi.org/10.1111/irv.12470>

6. Vardeny O., Solomon S.D. Influenza and hearth failure: a catchy co-morbid combination. *JACC: Hearth Fail.* 2018; 7(2): 118-20. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jchf.2018.11.008>
7. Pearce D.C., McCaw J.M., McVernon J., Mathews J.D. Influenza as a trigger for cardiovascular disease: An investigation of serotype, subtype and geographic location. *Environ. Res.* 2017; 156: 688-96. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.envres.2017.04.024>
8. Mamas M.A., Fraser D., Neyses L. Cardiovascular manifestations associated with influenza virus infection. *Int. J. Cardiol.* 2008; 130(3): 304-9.
9. Vivaldi M.T., Kloner R.A., Schoen F.J. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am. J. Pathol.* 1985; 121(3): 522-30.
10. Bianchi G., Fox U., Imbaschiati E. Development of a strain of spontaneously hypertensive rat. *Life Sciences.* 1974; 14(2): 339-47.
11. Doggrel S.A., Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular Research.* 1998; 39(1): 89-105. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0008-6363\(98\)00076-5](http://doi.org/10.1016/s0008-6363(98)00076-5)
12. Daniels M.J., Selgrade M.K., Doerfler D., Gilmour M.I. Kinetic profile of influenza virus infection in three rat strains. *Comp. Med.* 2003; 53(3): 293-8.
13. Цинзерлинг В.А., Воробьев С.Л., Зарубаев В.В., Дедов В.А., Беляевская С.В., Эсауленко Е.В. и др. Патогенетические аспекты гриппа в период эпидемии, вызванной вирусом А/Н1N1v в 2009-2010 гг., по аутопсии. *Архив патологии.* 2011; 73(6): 21-5.
14. Taylor C.R., Levenson R.M. Quantification of immunohistochemistry – issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopathology.* 2006; 49(4): 411-24. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02513.x>
15. Ibanes J.D., Morgan K.T., Burlison G.R. Histopathological changes in the upper respiratory tract of F344 rats following infection with a rat-adapted influenza virus. *Vet. Pathol.* 1996; 33(4): 412-8. DOI: <http://doi.org/10.1177/030098589603300407>
3. Fukunaga S., Ishida C., Nakaoka A., Ito T. A case of acute kidney injury and disseminated intravascular coagulation associated with influenza B viral infection. *CEN Case Rep.* 2014; 4(1): 95-100. DOI: <http://doi.org/10.1007/s13730-014-0147-9>
4. Watanabe T., Yoshikawa H., Abe Y., Yamazaki S., Uehara Y., Abe T. Renal involvement in children with influenza A virus infection. *Pediatr. Nephrol.* 2003; 18(6): 541-4. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00467-003-1143-z>
5. Sellers S.A., Hagan R.S., Hayden F.G., Fischer W.A. The hidden burden of influenza: A review of the extra-pulmonary complications of influenza infection. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2017; 11(5): 372-93. DOI: <http://doi.org/10.1111/irv.12470>
6. Vardeny O., Solomon S.D. Influenza and hearth failure: a catchy co-morbid combination. *JACC: Hearth Fail.* 2018; 7(2): 118-20. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jchf.2018.11.008>
7. Pearce D.C., McCaw J.M., McVernon J., Mathews J.D. Influenza as a trigger for cardiovascular disease: An investigation of serotype, subtype and geographic location. *Environ. Res.* 2017; 156: 688-96. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.envres.2017.04.024>
8. Mamas M.A., Fraser D., Neyses L. Cardiovascular manifestations associated with influenza virus infection. *Int. J. Cardiol.* 2008; 130(3): 304-9.
9. Vivaldi M.T., Kloner R.A., Schoen F.J. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am. J. Pathol.* 1985; 121(3): 522-30.
10. Bianchi G., Fox U., Imbaschiati E. Development of a strain of spontaneously hypertensive rat. *Life Sciences.* 1974; 14(2): 339-47.
11. Doggrel S.A., Brown L. Rat models of hypertension, cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovascular Research.* 1998; 39(1): 89-105. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0008-6363\(98\)00076-5](http://doi.org/10.1016/s0008-6363(98)00076-5)
12. Daniels M.J., Selgrade M.K., Doerfler D., Gilmour M.I. Kinetic profile of influenza virus infection in three rat strains. *Comp. Med.* 2003; 53(3): 293-8.
13. Tsinzerling V.A., Vorob'ev S.L., Zarubaev V.V., Dedov V.A., Belyaevskaya S.V., Esaulenko E.V., et al. Pathogenic aspects of influenza during the epidemics caused by H1N1v virus in 2009-2010. *Архив патологии.* 2011; 73(6): 21-5. (in Russian)
14. Taylor C.R., Levenson R.M. Quantification of immunohistochemistry – issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopathology.* 2006; 49(4): 411-24. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02513.x>
15. Ibanes J.D., Morgan K.T., Burlison G.R. Histopathological changes in the upper respiratory tract of F344 rats following infection with a rat-adapted influenza virus. *Vet. Pathol.* 1996; 33(4): 412-8. DOI: <http://doi.org/10.1177/030098589603300407>

#### REFERENCES

1. Opie E.L. The pathologic anatomy of influenza based chiefly on American and British sources. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1928; 5(2): 285-303.
2. Lobo S.M., Watanabe A.S.A., Salomão M.L.M., Queiroz F., Gandolfi J.V., de Oliveira N.E., et al. Excess mortality is associated with influenza A (H1N1) in patients with severe acute respiratory illness. *J. Clin. Virol.* 2019; 116: 62-8. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jcv.2019.05.003>

---

## ДИСКУССИЯ

---

© ГАЙСЁНОК О.В., 2020



### Применение ингибиторов вирусных РНК-полимераз в сочетании с ингибитором фузии в лечении пациентов с COVID-19: гипотеза

Гайсёнок О.В.

ФГБУ «Объединённая больница с поликлиникой» Управления делами Президента РФ, 119285, Москва, Россия

В статье рассматриваются возможности комбинированной противовирусной терапии пациентов с COVID-19 на основании анализа механизма действия известных противовирусных препаратов в рамках медицинской гипотезы. Обсуждается потенциальная эффективность совместного применения ингибиторов вирусных РНК-полимераз (рибавирина, риамиловира, фавипиравира) и ингибитора фузии при данной патологии (умифеновира). Проанализирован профиль эффективности и безопасности данных препаратов, в том числе опыт их применения в клинических исследованиях, проведённых в период пандемии COVID-19, а также во время эпидемий SARS и MERS.

**Ключевые слова:** COVID-19; противовирусные препараты; ингибиторы вирусных РНК-полимераз; ингибитор фузии; рибавирин; риамиловир; фавипиравир; умифеновир.

**Для цитирования:** Гайсёнок О.В. Применение ингибиторов вирусных РНК-полимераз в сочетании с ингибитором фузии в лечении пациентов с COVID-19: гипотеза. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(3): 167-175. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-167-175>

**Для корреспонденции:** Гайсёнок Олег Владимирович, канд. мед. наук, зав. отделением общей кардиологии ФГБУ «Объединённая больница с поликлиникой» Управления делами Президента РФ, 119285, Москва. E-mail: [ovgaisenok@fgu-obp.ru](mailto:ovgaisenok@fgu-obp.ru)

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

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 21.05.2020

Принята в печать 09.06.2020

### The use of viral RNA polymerase inhibitors in combination with a fusion inhibitor in the treatment of patients with COVID-19: hypothesis

Oleg V. Gaisenok

United Hospital with Outpatient Department Managing Affairs of the President of the Russian Federation, Moscow, 119285, Russia

This review article considers the possibilities of combined antiviral therapy in the treatment of patients with COVID-19, based on the analysis of the mechanism of action of known antiviral drugs in the framework of the medical hypothesis. The potential effectiveness of the joint use of viral RNA polymerase inhibitors and a fusion inhibitor in this pathology is discussed. The review discusses the main representatives of these groups of drugs – ribavirin, riamilovir, umifenovir, favipiravir. The efficacy and safety profile of these drugs was analyzed, including the experience of their use in clinical trials conducted during the COVID-19 pandemic, as well as earlier work performed during the SARS and MERS epidemics.

**Keywords:** COVID-19; antiviral drugs; inhibitors of viral RNA polymerases; fusion inhibitor; ribavirin; riamilovir; favipiravir; umifenovir.

**For citation:** Gaisenok O.V. The use of viral RNA polymerase inhibitors in combination with a fusion inhibitor in the treatment of patients with COVID-19: hypothesis. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology)*. 2020; 65(3): 167-175. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-167-175>

**For correspondence:** Oleg V. Gaisenok, PhD (Med.), Head of the Department of General Cardiology «United Hospital with Outpatient Department» Managing Affairs of the President of the Russian Federation, Moscow, 119285, Russia. E-mail: [ovgaisenok@fgu-obp.ru](mailto:ovgaisenok@fgu-obp.ru)

**Information about the authors:**

Gaisenok O.V., <https://orcid.org/0000-0002-2379-0450>

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

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

Received 21 May 2020

Accepted 09 June 2020

## Введение

Поиск эффективных методов терапии новой корона-вирусной инфекции SARS-CoV-2, вызывающей COVID-19, привёл к внедрению в схемы лечения противовирусных препаратов, применяемых при других заболеваниях, заставил представителей медицинского сообщества во всём мире вспомнить о давно известных препаратах и приступить к изучению новых лекарственных средств [1–4].

SARS-CoV-2, как представитель семейства *Coronaviridae*, обладает самым большим РНК-геномом среди РНК-содержащих вирусов. Исходя из взаимоотношений вируса и хозяина, основные задачи для вируса заключаются в проникновении в клетку хозяина и активном размножении в ней, что, в свою очередь, является патогенетически обоснованными направлениями воздействия на вирус и развитие заболевания. Первое направление – препятствие слиянию оболочки вируса и клеточной мембраны клетки хозяина – может быть реализовано применением препаратов, относящихся по механизму действия к ингибиторам слияния (фузии). Второе направление – воздействие на репликацию вируса и торможение синтеза вирусных РНК – может быть реализовано с использованием препаратов, относящихся по механизму действия к ингибиторам РНК-полимераз вирусов. Можно предположить, что оптимальной стратегией должна стать комбинированная терапия препаратами первой и второй группы. В настоящем обзоре проанализированы данные об относящихся к этим группам препаратах российского производства, широко доступных для клинического применения; их можно рассматривать в качестве средств, обладающих потенциалом для комбинированной терапии пациентов с COVID-19.

## Рибавирин

Противовирусный препарат рибавирин был синтезирован в 1972 г. Механизм его действия обусловлен влиянием на репликацию вируса путём ингибирования дегидрогеназы инозинмонофосфата и торможения синтеза вирусных ДНК и РНК [5]. Показана эффективность рибавирина против вирусов гриппа, инфекций, вызванных респираторным синцитиальным вирусом, вирусом лихорадки Ласса, а также многих вирусных геморрагических лихорадок [6], но в официальной инструкции к препарату основными нозологиями являются хронический гепатит С и геморрагическая лихорадка с почечным синдромом [7]. В последних исследованиях была подтверждена роль рибавирина в ингибировании репликации вируса парагриппа [8]. Синтезированы новые изостерические аналоги рибавирина, эффективность некоторых из них в отношении вируса гепатита С, простого герпеса и вируса гриппа А сопоставима с рибавирином [9].

В инструкции указаны ограничения к применению препарата: заболевания сердца, тяжёлые заболевания лёгких (в частности, хроническая обструктивная болезнь лёгких), сахарный диабет с приступами

кетацидоза, нарушения свёртываемости крови, значительное угнетение кроветворной функции костного мозга. Препарат противопоказан при гиперчувствительности, тяжёлых заболеваниях сердца (включая нестабильные формы), неконтролируемых медикаментозно заболеваниях щитовидной железы, гемоглобинопатиях (в том числе талассемии, серповидно-клеточной анемии), выраженной депрессии, суицидальных мыслях, аутоиммунных заболеваниях, почечной и тяжёлой печёночной недостаточности, декомпенсированном циррозе печени, беременности, кормлении грудью, а также для лиц в возрасте до 18 лет [7].

В разгар эпидемии COVID-19 представители медицинского научного сообщества предлагали более широко использовать рибавирин в карантинных зонах (зонах самоизоляции) для инфицированных и неинфицированных людей по следующим причинам: доказанная эффективность в отношении традиционных и новых вирусов; известные механизмы противовирусного действия; ясный и прогнозируемый профиль побочных эффектов; большой клинический опыт применения у разных слоёв населения; доступность и низкая стоимость [10].

В исследовании А. Omrani и соавт. было подтверждено, что терапия рибавирином и интерфероном альфа-2а ассоциирована со значительно лучшей выживаемостью пациентов с тяжёлой формой MERS-CoV-инфекции через 14 дней лечения. В это ретроспективное когортное исследование были включены пациенты (в возрасте  $\geq 16$  лет), госпитализированные в период с 23 октября 2012 г. по 1 мая 2014 г. в военно-медицинский госпиталь (Эр-Рияд, Саудовская Аравия) с лабораторно подтверждённой инфекцией MERS-CoV и пневмонией и нуждающиеся в искусственной вентиляции лёгких ( $n = 44$ ). Все пациенты получали поддерживающую терапию. Но пациенты, госпитализированные по данным показаниям ( $n = 20$ ) после 16 сентября 2013 г., также получали перорально рибавирин (дозу, основанную на расчётном клиренсе креатинина, в течение 8–10 дней) и подкожно пегилированный интерферон альфа-2а (180 мкг/нед в течение 2 нед). Поздняя инициация терапии (в среднем через 3 дня после постановки диагноза) не приводила к существенным различиям в долгосрочном прогнозе между группами лечения (рибавирин и интерферон альфа-2а) и сравнения (только поддерживающая терапия) [11].

В исследовании D. Falzarano и соавт. оценивали влияние интерферона альфа-2b и рибавирина на репликацию вируса nCoV hCoV-EMC/2012. Вирус nCoV-EMC/2012 был чувствителен как к интерферону альфа-2b, так и к рибавирину, но только в относительно высоких концентрациях. При комбинированном применении препаратов более низкие концентрации интерферона альфа-2b и рибавирина достигали сопоставимых конечных точек. Авторы отметили, что комбинация интерферона альфа-2b и рибавирина может рассматриваться как эффективная лекарственная стратегия в случае будущих эпидемических рецидивов коронавирусных инфекций [12].

Недавно проведённый систематический обзор/метаанализ исследований в период эпидемий SARS и MERS посвящён эффективности и безопасности разных вариантов лекарственной терапии COVID-19 [13]. Он был проведён в основных международных базах данных и системах цитирования научной информации: PubMed, EMBASE, Cochrane Library, China National Knowledge Infrastructure, China Science and Technology Journal Database (VIP), and WANFANG DATA. В него включены результаты рандомизированных контролируемых исследований (РКИ), проспективных и ретроспективных когортных исследований, которые оценивали разные методы лечения (гидроксихлорохин, лопинавир/ритонавир, рибавирин и др.) при SARS, MERS и COVID-19. Первичными конечными точками в этом исследовании были смертность, эрадикация вируса и клиническое улучшение; вторичными – положительная динамика общего состояния пациента и результатов контрольной томографии/рентгенографии грудной клетки, разрешение симптомов тяжёлого острого респираторного синдрома (ТОРС) и применение искусственной вентиляции лёгких, анализ нежелательных явлений. Анализ в подгруппах показал, что комбинация рибавирина и кортикостероидов значительно снижала смертность (относительный риск 0,43, 95% доверительный интервал 0,27–0,68). В то же время отмечен недостаточный профиль безопасности рибавирина: он часто вызывал брадикардию, анемию и повышение уровня печёночных трансаминаз. Вероятно, именно из-за неоднозначных данных об эффективности и безопасности рибавирина его стали реже применять в клинической практике. Стоит отметить, что рибавирин входил в список возможных к назначению лекарственных средств для лечения коронавирусной инфекции у взрослых в первых версиях Временных рекомендаций Минздрава России (1–3), но из последующих версий рекомендаций препарат был исключён [1].

### Триазавирин

Триазавирин – противовирусный препарат, который относится к азолоазинам, и, исходя из механизма действия, может также рассматриваться как препарат для лечения коронавирусной инфекции. Активное вещество препарата – метилтионитрооксодигидротриазолотриазинид натрия – представляет собой синтетический аналог оснований пуриновых нуклеозидов (гуанина) с выраженным противовирусным действием. Препарат обладает широким спектром противовирусной активности в отношении РНК-содержащих вирусов. Основным механизмом действия триазавирина является ингибирование синтеза вирусных РНК и репликации геномных фрагментов. Противовирусный эффект триазавирина основан, с одной стороны, на конкуренции с «нормальными» нуклеотидами за встраивание в вирусную РНК, а с другой – на иммуноотропном действии, опосредуемом модуляцией цитокинового спектра (через регуляцию синтеза пуриновых нуклеотидов) [14, 15]. В экспериментальном

исследовании на основании компьютерного моделирования и применения метода плазменного резонанса было установлено, что вероятными мишенями действия триазавирина являются вирусный белок гемагглютинин и фермент протеиндисульфидизомеразы, воздействующий на жизненный цикл вирусных белков, содержащих SH-фрагменты цистеина [15].

В исследовании, основанном на модели молекулярной динамики противовирусного эффекта триазавирина, было показано, что он также влияет на образование амилоидоподобных фибрилл модельного пептида, способен образовывать линейные супрамолекулярные структуры, которые могут действовать как «экраны» и предотвращать взаимодействие мономеров модельного пептида [16]. Препарат был выпущен на российский рынок в 2014 г., а в 2018 г. фармацевтическая субстанция была перерегистрирована под названием «Риамиловир». В настоящее время данные о РКИ по применению данного препарата отсутствуют.

Терапевтическую активность триазавирина в отношении экспериментального гриппа А изучали на мышах-альбиносах, интраназально инфицированных вирусом гриппа А/Chicken/Kurgan/Russia/02/05 (H5N1). Исследование показало, что в терапевтической дозе 1 мг/кг триазавирин эффективно защищал опытных животных от смерти при вирусной инфекции. Его защитная терапевтическая эффективность ( $36,7 \pm 1,7\%$ ) была близка к показателям осельтамивира ( $50,0 \pm 0,0\%$ ), сравнима с римантадином ( $38,3 \pm 1,7\%$ ) и выше, чем у арбидола ( $11,7 \pm 1,7\%$ ). В течение всего периода наблюдения (вплоть до терминальной фазы) триазавирин ингибировал накопление вируса гриппа А в лёгких инфицированных мышей-альбиносов более чем на 3 мкг [17].

Триазавирин показал себя как эффективный новый ингибитор вирусов гриппа А и В человека, который подавлял репликацию вируса гриппа в клеточной культуре, в хорион-аллантаисных мембранах кур и защищал мышей от гибели, вызванной вирусами гриппа А и В. Триазавирин эффективен против штамма вируса гриппа, устойчивого к римантадину, и против штаммов вируса птичьего гриппа А (H5N1) [14], а также в отношении экспериментального клещевого энцефалита у мышей [18].

В сравнительном исследовании оценивали влияние противовирусных препаратов (римантадин, рибавирин и триазавирин) на репликацию вируса гриппа в клеточных культурах человека. Все противовирусные препараты ингибировали синтез вирусных нуклеопротеинов, но наиболее сильный эффект оказал рибавирин в клетках карциномы лёгкого А-549 и эндотелиальных клетках ECV-304 [19].

Клиническое испытание эффективности триазавирина как противогриппозного препарата было проведено во время эпидемического сезона гриппа 2010 г. Лечение пероральным триазавирином значительно уменьшило продолжительность основных клинических проявлений гриппа (интоксикация, лихорадка, респираторные симптомы), снизило частоту ослож-

нений, связанных с гриппом, и использования симптоматических препаратов. Частота повторного выделения вирусов гриппа А и В была значительно ниже у пациентов, принимавших триазамирин. Анализ клинических данных показал, что оптимальная дозировка препарата составляла 250 мг 3 раза в день [20].

### Умифеновир

Умифеновир – российский противовирусный препарат, созданный в 1974 г. и зарегистрированный под названием «Арбидол». Промышленный выпуск арбидола в России был начат в 1992 г. В 2011 г. Всемирная организация здравоохранения присвоила этому препарату международное непатентованное наименование «умифеновир» [21]. В настоящее время он производится в России, Белоруссии, Украине, Китае и Нидерландах.

В официальной инструкции к применению указано, что умифеновир эффективен в отношении вируса гриппа А и В, включая высокопатогенные подтипы, риновируса, аденовируса, респираторно-синцитиального вируса, вируса парагриппа, а также коронавируса, ассоциированного с ТОРС [22]. Именно поэтому его активно использовали китайские врачи в период эпидемии COVID-19 в Ухане на основании рекомендаций, указанных в справочнике по профилактике и лечению COVID-19, выпущенном Медицинским факультетом университета Чжэцзян [23].

По механизму противовирусного действия умифеновир относится к ингибиторам слияния (фузии), взаимодействуя с гемагглютинином вируса и препятствуя таким образом слиянию липидной оболочки вируса и клеточных мембран [22]. Побочные действия вещества умифеновир в инструкции к применению препарата не описаны, за исключением редко встречающихся аллергических реакций.

Истинная клиническая эффективность данного препарата всегда подвергалась сомнению международным медицинским сообществом в связи с отсутствием данных РКИ. Но в 2019 г. были опубликованы результаты рандомизированного двойного слепого многоцентрового исследования ARBITR (A Study of Arbidol (Umifenovir) for Treatment and Prophylaxis of Influenza and Common Cold (ARBITR)) IV фазы, проведенного с ноября 2011 г. по апрель 2016 г. на базе 15 исследовательских центров.

Пациентов рандомизировали в две группы: пациенты 1-й группы ( $n = 181$ ) получали умифеновир 200 мг 4 раза в сутки в течение 5 дней, пациенты группы сравнения ( $n = 178$ ) получали плацебо 4 раза в сутки в течение 5 дней. Первичными (основными) конечными точками исследования были общая продолжительность заболевания гриппом/острой респираторной вирусной инфекцией (ОРВИ), продолжительность и выраженность основных симптомов гриппа/ОРВИ. Вторичной конечной точкой была частота развития осложнений при гриппе/ОРВИ. Результаты исследования показали безопасность умифеновира и подтвердили его эффективность по сравнению с плацебо в терапии гриппа и других ОРВИ

у взрослых пациентов. Установлено, что противовирусный эффект наиболее выражен в остром периоде заболевания и проявляется в сокращении сроков разрешения всех симптомов болезни и снижении тяжести заболевания [24].

В исследовании J. Naviernik и соавт. приведены данные о том, что умифеновир оказывает микромолярное противовирусное действие. Его полумаксимальная эффективная концентрация ( $EC_{50}$ ) варьирует от  $10,57 \pm 0,74$  до  $19,16 \pm 0,29$  мкм в клетках Vero, инфицированных вирусами Зика, лихорадки Западного Нила и клещевого энцефалита, относящимися к семейству *Flaviviridae*. Интересно, что противовирусные эффекты умифеновира не наблюдались в инфицированных вирусом стабильных клетках почек свиней, клетках нейробластомы и гепатомы человека. Это указывает на то, что противовирусный эффект умифеновира сильно зависит от клеточного типа. Противовирусная активность и приемлемые профили цитотоксичности позволили предположить, что умифеновир может быть перспективным кандидатом для дальнейшего изучения в качестве потенциального терапевтического агента при селективном лечении флавивирусных инфекций [25].

Что касается воздействия на интерлейкины как основные элементы «цитокинового шторма» в развитии повреждения лёгких при ТОРС, то определённый интерес представляют результаты исследования воздействия умифеновира на вирус Коксаки, опубликованные китайскими учеными [26]. Интерлейкин-10 (IL-10) играет решающую роль в течении персистирующей вирусной инфекции. Умифеновир является противовирусным препаратом широкого спектра действия на вирусную инфекцию Коксаки. Ранее было показано, что в дополнение к ингибированию инфекции Коксаки умифеновир также снижает уровень IL-10, индуцированный персистирующей вирусной инфекцией *in vitro* и *in vivo*. В этом исследовании клетки селезёнки мыши, инфицированные вирусом Коксаки, были использованы в качестве модели для изучения механизма влияния умифеновира на экспрессию IL-10. Установлено, что субклеточная локализация р38 и MAPK-активированной протеинкиназы играет очень важную роль в секреции IL-10, а умифеновир значительно препятствует выходу комплекса р38-МК2 из ядра клетки. Это, в свою очередь, блокирует биологические функции последнего пути и ингибирует высокую экспрессию IL-10, индуцированную вирусом Коксаки.

В другом китайском исследовании оценили противовирусные эффекты и безопасность лопинавира/ритонавира и умифеновира у пациентов с COVID-19 [27]. 50 пациентов с лабораторно подтверждённым COVID-19 были разделены на две группы: группу лопинавира/ритонавира ( $n = 34$ ) и группу умифеновира ( $n = 16$ ). Пациенты группы лопинавира/ритонавира получали 400 мг / 100 мг препарата 2 раза в день в течение 1 нед, а группы умифеновира – по 200 мг препарата 3 раза в день. При проведении противовирусной терапии контролировали циклические пороговые зна-

чения целевых генов: открытой рамки считывания 1ab (ORF1ab) и нуклеокапсидного белка (N) – методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-qPCR). Ни у одного пациента не развились тяжёлая пневмония или ТОРС. Между двумя группами не выявлено различий по продолжительности лихорадки ( $p = 0,61$ ). На 14-е сутки после начала терапии в группе умифеновира вирусная нагрузка не установлена, в то же время она обнаружена у 15 (44,1%) пациентов, получавших лопинавир/ритонавир. В группе умифеновира отмечена более короткая продолжительность положительного РНК-теста по сравнению с пациентами в группе лопинавира/ритонавира ( $p < 0,01$ ). Никаких явных побочных эффектов в обеих группах не обнаружено. В заключение исследования авторы указывают на то, что результаты монотерапии умифеновиром (арбидолом) могут превосходить таковые с применением лопинавира/ритонавира в лечении COVID-19.

Вероятно, совокупность полученных данных способствовала включению умифеновира во временные клинические рекомендации по лекарственной терапии как самой новой коронавирусной инфекции, так и острых респираторных инфекций в амбулаторной практике в период эпидемии COVID-19 [1, 28].

### Фавипиравир

Фавипиравир – противовирусный препарат, обладающий широким спектром действия против РНК-содержащих вирусов, включая респираторно-синцитиальный вирус, риновирус, вирусы гриппа А и В, резистентные к адамантану, осельтамивиру или занамивиру [29–32].

Первая информация об этом экспериментальном противовирусном препарате, который первоначально обозначали индексом T-705, появилась в 2002 г. [32]. Фавипиравир – производное противотуберкулёзного препарата пипразинкарбоксамид, который был разработан в Японии для лечения гриппа [29] и зарегистрирован под торговым наименованием «Авиган».

Фавипиравир не эффективен против ДНК-содержащих вирусов [32] и не оказывает ингибирующего действия на ДНК человека. Принцип действия основан на избирательном ингибировании РНК-зависимой РНК-полимеразы, участвующей в репликации вируса путём терминирования удлинения формирующейся цепи РНК [33]. В клетках фавипиравир метаболизируется до активной субстанции рибозилтрифосфат фавипиравира [30]. Ещё один механизм действия фавипиравира основан на том, что он индуцирует летальные мутации РНК-трансверсии, что приводит к гибели вируса [34, 35].

Фавипиравир изучали как потенциальное средство для лечения ряда опасных вирусных инфекций, таких как лихорадка Западного Нила, лихорадка Ласса и геморрагическая лихорадка Эбола [35–38]. Однако к проведённому в Гвинее клиническому исследованию применения фавипиравира при лечении пациентов с вирусом Эбола у медицинского сообщества возникло много вопросов, как в отношении дизайна исследования, так и в интерпретации полученных результатов [38–40].

В последующем были получены данные о том, что фавипиравир ингибирует вирус SARS-CoV-2, вызывающий новую коронавирусную инфекцию (COVID-19):  $EC_{50}$  в клетках Vero E6 составляет 61,88 мкмоль, что соответствует 9,72 мкг/мл [41]. Эти результаты заставили рассматривать фавипиравир как реальный препарат в борьбе с COVID-19 наряду с другими лекарственными средствами [42].

Q. Cai и соавт. исследовали влияние фавипиравира по сравнению с лопинавиром/ритонавиром для лечения пациентов с COVID-19 в Китае [43]. В исследование были включены 35 пациентов с лабораторно подтверждённым COVID-19, которые получали перорально фавипиравир (1-й день: 1600 мг 2 раза в сутки; 2–14-й дни: 600 мг 2 раза в сутки) и интерферон- $\alpha$  (5 МЕ 2 раза в сутки). Группу сравнения составили 45 пациентов, которые получали лопинавир/ритонавир (1–14-й дни: 400 мг/100 мг 2 раза в сутки) и интерферон- $\alpha$  (5 МЕ 2 раза в сутки). Базовые характеристики обеих групп были сопоставимы. Группы сравнивали по динамике изменений при компьютерной томографии органов грудной клетки, клиренсу вируса и безопасности лекарственного средства. Более короткое время вирусного клиренса было в группе фавипиравира по сравнению с контрольной группой (медиана 4 дня (межквартильный диапазон 2,5–9) против 11 дней (8–13),  $p < 0,001$ ). В группе фавипиравира также отмечена существенно большая положительная динамика при компьютерной томографии органов грудной клетки на фоне лечения по сравнению с контрольной группой (положительная динамика в 91,43% случаев против 62,22% ( $p = 0,004$ )). Анализ, проведённый методом многовариантной регрессии Кокса, показал, что применение фавипиравира было независимо связано с более быстрой элиминацией вируса. Кроме того, в группе фавипиравира отмечено меньше нежелательных явлений, чем в группе контроля [43].

Поскольку не было информации о фармакокинетике фавипиравира у пациентов с COVID-19, находящихся в критическом состоянии, японские учёные провели клиническое исследование [44]. У пациентов с тяжёлой формой COVID-19, госпитализированных в отделение интенсивной терапии и находившихся на искусственной вентиляции лёгких, определяли концентрацию фавипиравира в сыворотке крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Пациенты получали фавипиравир в дозе 1600 мг 2 раза в сутки в 1-й день исследования, 600 мг 2 раза в сутки со 2-го по 5-й день и далее в той же дозе, если это было необходимо. Суспензию фавипиравира вводили пациентам через назогастральный зонд. В это исследование были включены всего 7 пациентов, от которых получено 49 образцов крови для последующей оценки концентраций фавипиравира. Концентрация препарата (через 8–12 ч) в большинстве случаев была ниже, чем нижний предел количественного определения (1 мкг/мл) и  $EC_{50}$  (9,7 мкг/мл), который ранее был определён для SARS-CoV-2 в исследовании *in vitro*. Концентрация фавипиравира у пациентов с COVID-19 в крити-

ческом состоянии была намного ниже, чем у здоровых людей в предыдущем клиническом исследовании. Это вызвало серьёзную обеспокоенность у авторов настоящего исследования. В заключение они отметили, что необходимы дальнейшие исследования для определения оптимальной стратегии лечения пациентов с тяжёлой формой COVID-19 [44].

Действие патентной защиты для оригинального японского препарата фавипиравира «Авиган» истекло в конце 2019 г. В марте 2020 г. наблюдательный совет Российского фонда прямых инвестиций (РФПИ) одобрил создание совместного предприятия с группой компаний «ХимРар» для производства лекарственного препарата фавипиравир в Российской Федерации. В мае 2020 г. компания «ПромоМед» на базе АО «Биохимик» (Россия) начала производство лекарственного средства, содержащего действующее вещество фавипиравир, под торговым наименованием «Арепливир». Другой дженерик фавипиравира, зарегистрированный ООО «Кромис» в Российской Федерации 29.05.2020, получил название «Авифавир» (регистрационное удостоверение № ЛП-006225, производитель АО «Исследовательский институт химического разнообразия» (Россия)) [31].

Противопоказания к применению отражены в официальной инструкции препарата: повышенная чувствительность к фавипиравиру или любому компоненту препарата; печёночная и почечная недостаточность тяжёлой степени (скорость клубочковой фильтрации < 30 мл/мин); беременность или планирование беременности; период грудного вскармливания; возраст до 18 лет.

В настоящее время фавипиравир активно изучают как препарат для лечения COVID-19, в том числе в России, где проводятся 3 клинических исследования III фазы [45].

Для оценки безопасности фавипиравира как потенциального средства для лечения COVID-19 был проведён систематический обзор и анализ данных выполненных к настоящему моменту клинических исследований, размещённых в основных международных научных базах цитирования медицинской информации [46]. 29 исследований были определены как потенциальные источники для получения информации о доказательствах клинической безопасности фавипиравира; шесть из них – исследования II и III фазы, в которых представлены соответствующие данные по профилю безопасности для статистического сравнения. В общей сложности проанализированы данные 4299 пациентов. Препаратами группы сравнения (контроля) были осельтамивир, умифеновир, лопинавир/ритонавир или плацебо. Продолжительность исследований варьировала от 5 до 21 дня. В результате фавипиравир продемонстрировал благоприятный профиль безопасности в отношении всех нежелательных реакций. Однако основные вопросы, связанные с безопасностью применения препарата (гиперурикемия, тератогенность и пролонгация интервала QT), ещё не изучены должным образом. Фавипиравир может быть безопасным препаратом с хорошей переносимостью при кратковременном применении, но для оценки отдалённых последствий лечения необходимы дополнительные доказательства. Их можно получить при проведении специально спланированных РКИ. В заключение данного исследования авторы отметили, что, учитывая ограниченность фактических данных и нерешённые проблемы безопасности, следует проявлять осторожность при широком использовании фавипиравира для лечения пациентов во время пандемии COVID-19 [46].

симостью при кратковременном применении, но для оценки отдалённых последствий лечения необходимы дополнительные доказательства. Их можно получить при проведении специально спланированных РКИ. В заключение данного исследования авторы отметили, что, учитывая ограниченность фактических данных и нерешённые проблемы безопасности, следует проявлять осторожность при широком использовании фавипиравира для лечения пациентов во время пандемии COVID-19 [46].

### Заключение

В качестве патогенетически оправданного подхода к лечению пациентов с новой коронавирусной инфекцией стоит рассматривать этиотропную лекарственную терапию. Она препятствует проникновению вируса в клетку и блокирует его репликацию, что может быть реализовано через прямое противовирусное действие препаратов из группы ингибиторов вирусных РНК-полимераз и ингибитора слияния (фузии), взаимодействующего с гемагглютинином вируса. Акцент должен быть сделан именно на комбинированной терапии, обладающей преимуществами над монотерапией препаратом одного механизма действия. Усилить данную терапию позволит добавление препаратов интерферона [3, 12].

При этом эффективность противовирусной терапии зависит от своевременности её начала: как можно раньше, с момента появления первых симптомов (желательно в первые 24 ч заболевания, не позднее 48 ч от его начала). Позднее начало противовирусной терапии, особенно у пациентов в критическом состоянии, не оставляет шансов на положительный прогноз [47].

Перспективными для изучения представляются комбинации умифеновира с рибавирином, триазавирином (риапиловиром) или фавипиравиром в лечении пациентов с COVID-19, поскольку эти препараты реализуют патогенетически обоснованный механизм действия, производятся в России и доступны для российской клинической практики, однако данная медицинская гипотеза требует уточнения и проведения РКИ.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Временные методические рекомендации профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 6 (28.04.2020). Available at: [https://static-1.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/050/116/original/28042020\\_%D0%9CR\\_COVID-19\\_v6.pdf](https://static-1.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/050/116/original/28042020_%D0%9CR_COVID-19_v6.pdf)
2. Fan H.H., Wang L.Q., Liu W.L., An X.P., Liu Z.D., He X.Q., et al. Repurposing of clinically approved drugs for treatment of coronavirus disease 2019 in a 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) related coronavirus model. *Chin. Med. J. (Engl.)*. 2020; 133(9): 1051-6. DOI: <http://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000797>
3. Hung I.F., Lung K.C., Tso E.Y., Liu R., Chung T.W., Chu M.Y., et al. Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir-ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet*. 2020; 395(10238): 1695-704. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31042-4](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31042-4)
4. Grein J., Ohmagari N., Shin D., Diaz G., Asperges E., Castagna A., et al. Compassionate use of Remdesivir for patients with severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(24): 2327-36. DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa2007016>

5. Leyssen P., De Clercq E., Neyts J. The anti-yellow fever virus activity of ribavirin is independent of error-prone replication. *Mol. Pharmacol.* 2006; 69(4): 1461-7. DOI: <http://doi.org/10.1124/mol.105.020057>
6. Crotty S., Cameron C., Andino R. Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? *J. Mol. Med. (Berl)*. 2002; 80(2): 86-95. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00109-001-0308-0>
7. Рибавирин (Ribavirinum): инструкция, применение, противопоказания и формула. Available at: [http://www.rlsnet.ru/mnn\\_index\\_id\\_288.htm](http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_288.htm) (Дата обращения: 15.05.2020)
8. Zhurilo N.I., Chudinov M.V., Matveev A.V., Smirnova O.S., Konstantinova I.D., Mirosnikov A.I., et al. Isosteric ribavirin analogues: Synthesis and antiviral activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2018; 28(1): 11-4. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.11.029>
9. Uematsu J., Sakai-Sugino K., Kihira-Nakanishi S., Yamamoto H., Hirai K., Kawano M., et al. Inhibitions of human parainfluenza virus type 2 replication by ribavirin and mycophenolate mofetil are restored by guanosine and S-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosine. *Drug Discov. Ther.* 2019; 13(6): 314-21. DOI: <http://doi.org/10.5582/dtd.2019.01084>
10. Khalili J.S., Zhu H., Mak N.S.A., Yan Y., Zhu Y. Novel coronavirus treatment with ribavirin: Groundwork for an evaluation concerning COVID-19. *J. Med. Virol.* 2020; 92(7): 740-6. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.25798>
11. Omrani A.S., Saad M.M., Baig K., Bahloul A., Abdul-Matin M., Alaidaroos A.Y., et al. Ribavirin and interferon alfa-2a for severe Middle East respiratory syndrome coronavirus infection: a retrospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 2014; 14(11): 1090-5. DOI: [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70920-X](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70920-X)
12. Falzarano D., de Wit E., Martellaro C., Callison J., Munster V.J., Feldmann H. Inhibition of novel  $\beta$  coronavirus replication by a combination of interferon- $\alpha$ 2b and ribavirin. *Sci. Rep.* 2013; 3: 1686. DOI: <http://doi.org/10.1038/srep01686>
13. Zhong H., Wang Y., Zhang Z.L., Liu Y.X., Le K.J., Cui M., et al. Efficacy and safety of current therapeutic options for COVID-19 – lessons to be learnt from SARS and MERS epidemic: A systematic review and meta-analysis. *Pharmacol. Res.* 2020; 157: 104872. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104872>
14. Karpenko I., Deev S., Kiselev O., Charushin V., Rusinov V., Ulomsky E., et al. Antiviral properties, metabolism, and pharmacokinetics of a novel azolo-1,2,4-triazine-derived inhibitor of influenza A and B virus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54(5): 2017-22. DOI: <http://doi.org/10.1128/AAC.01186-09>
15. Чупахин О.Н., Киселёв О.И., ред. *Триазавирин – противовирусный препарат нового поколения*. Екатеринбург; 2016.
16. Shvetsov A.V., Zbrodskaya Y.A., Nekrasov P.A., Egorov V.V. Triazavirine supramolecular complexes as modifiers of the peptide oligomeric structure. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2018; 36(10): 2694-8. DOI: <http://doi.org/10.1080/07391102.2017.1367329>
17. Логинова С.Я., Борисевич С.В., Максимов В.А., Бондарев В.П., Котовская С.К., Русинов В.Л. и др. Лечебная эффективность нового отечественного химиопрепарата Триазавирин в отношении возбудителя гриппа А (H5N1). *Антибиотики и химиотерапия*. 2011; 56(1-2): 10-2.
18. Логинова С.Я., Борисевич С.В., Русинов В.Л., Уломский Е.Н., Чарушин В.Н., Чупахин О.Н. и др. Изучение лечебной эффективности триазавирина в отношении экспериментальной формы клещевого энцефалита у белых мышей. *Антибиотики и химиотерапия*. 2015; 60(7-8): 11-3.
19. Смирнова Т.Д., Даниленко Д.М., Еропкин М.Ю., Деева Е.Г., Киселев О.И. Изучение влияния ремантадина, рибавирина и триазавирина на репродукцию вирусов гриппа А в монослойных и лимфобластоидных линиях человеческого происхождения. *Антибиотики и химиотерапия*. 2011; 56(11-12): 11-6.
20. Киселев О.И., Деева Е.Г., Мельников Т.И., Козелетская К.Н., Киселев А.С., Русинов В.Л. и др. Новый отечественный препарат триазавирин. Результаты II фазы клинического испытания. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(6): 9-12.
21. International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (INN). *WHO Drug Information*. 2011; 25(1). Available at: [https://www.who.int/medicines/publications/druginformation/innlists/ReclList65\\_final.pdf](https://www.who.int/medicines/publications/druginformation/innlists/ReclList65_final.pdf) (Accessed 15.04.2020)
22. Умифеновир (Umifenovirum): инструкция, применение, противопоказания и формула. Available at: [https://www.rlsnet.ru/mnn\\_index\\_id\\_6264.htm](https://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_6264.htm) (Дата обращения: 15.04.2020)
23. Ligen Y. Handbook of COVID-19 Prevention and Treatment; 2020. Available at: [https://www.researchgate.net/publication/339998871\\_Handbook\\_of\\_COVID-19\\_Prevention\\_and\\_Treatment](https://www.researchgate.net/publication/339998871_Handbook_of_COVID-19_Prevention_and_Treatment) (Accessed 15.04.2020)
24. Пшеничная Н.Ю., Булгакова В.А., Львов Н.И., Поромов А.А., Селелкова Е.П., Грекова А.И. и др. Клиническая эффективность умифеновира при гриппе и ОРВИ (исследование АРБИТР). *Терапевтический архив*. 2019; 91(3): 56-63. DOI: <http://doi.org/10.26442/00403660.2019.03.000127>
25. Naviernik J., Štefáňik M., Fojtková M., Kali S., Tordo N., Rudolf I., et al. Arbidol (Umifenovir): A broad-spectrum antiviral drug that inhibits medically important arthropod-borne flaviviruses. *Viruses*. 2018; 10(4): 184. DOI: <http://doi.org/10.3390/v10040184>
26. Zhang S., Zhi C., Li H., Huang D., Fan Q., Cui J., Umifenovir effectively inhibits IL-10 dependent persistent Coxsackie B4 virus infection. *Antiviral. Res.* 2017; 141: 165-73. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.02.018>
27. Zhu Z., Lu Z., Xu T., Chen C., Yang G., Zha T., et al. Arbidol monotherapy is superior to Lopinavir/ritonavir in treating COVID-19. *J. Infect.* 2020; 81(1): e21-3. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.060>
28. Временные методические рекомендации. Лекарственная терапия острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) в амбулаторной практике в период эпидемии COVID-19. Версия 1 (12.04.2020). М.; 2020. Available at: [https://static-3.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/049/991/original/RESP\\_REC\\_VI.pdf](https://static-3.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/049/991/original/RESP_REC_VI.pdf) (Дата обращения: 15.04.2020)
29. Du Y.X., Chen X.P. Favipiravir: pharmacokinetics and concerns about clinical trials for 2019-nCoV infection. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2020. DOI: <http://doi.org/10.1002/cpt.1844>
30. Jin Z., Smith L.K., Rajwanshi V.K., Kim B., Deval J. The ambiguous base-pairing and high substrate efficiency of T-705 (Favipiravir) Ribofuranosyl 5'-Triphosphate towards influenza A virus polymerase. *PLoS One*. 2013; 8(7): e68347. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0068347>
31. Справочник лекарств Medum.ru. АВИФАВИР – инструкция по применению. Available at: <http://medum.ru/avifavir> (Дата обращения: 06.06.2020)
32. Furuta Y., Takahashi K., Fukuda Y., Kuno M., Kamiyama T., Kozaki K., et al. In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46(4): 977-81. DOI: <http://doi.org/10.1128/aac.46.4.977-981.2002>
33. Shiraki K., Daikoku T. Favipiravir, an anti-influenza drug against life-threatening RNA virus infections. *Pharmacol. Ther.* 2020; 209: 107512. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107512>
34. Baranovich T., Wong S.S., Armstrong J., Marjuki H., Webby R.J., Webster R.G., et al. T-705 (favipiravir) induces lethal mutagenesis in influenza A H1N1 viruses in vitro. *J. Virol.* 2013; 87(7): 3741-51. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.02346-12>
35. Escribano-Romero E., Jiménez de Oya N., Domingo E., Saiz J.C. Extinction of West Nile virus by favipiravir through lethal mutagenesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017; 61(11): e01400-17. DOI: <http://doi.org/10.1128/AAC.01400-17>
36. Rosenke K., Feldmann H., Westover J.B., Hanley P.W., Martellaro C., Feldmann F., et al. Use of favipiravir to treat Lassa virus infection in macaques. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(9): 1696-9. DOI: <http://doi.org/10.3201/eid2409.180233>
37. Mendenhall M., Russell A., Smeed D.F., Hall J.O., Skirpstunas R., Furuta Y., et al. Effective oral favipiravir (T-705) therapy initiated after the onset of clinical disease in a model of arenavirus hemorrhagic fever. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011; 5(10): e1342. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001342>
38. Kerber R., Lorenz E., Duraffour S., Sissoko D., Rudolf M., Jaeger A., et al. Laboratory findings, compassionate use of favipiravir, and outcome in patients with Ebola virus disease, Guinea, 2015-A retrospective observational study. *J. Infect. Dis.* 2019; 220(2): 195-202. DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jiz078>
39. Cohen J. Results from encouraging Ebola trial scrutinized. *Science*. 2015. DOI: <http://doi.org/10.1126/science.aaa7912> Available at: <https://www.sciencemag.org/news/2015/02/results-encouraging-ebola-trial-scrutinized> (Accessed 06.06.2020)
40. Nguyen T.H., Guedj J., Anglaret X., Laouénan C., Madelain V., Taburet A.M., et al. JIKI study group. Favipiravir pharmacokinetics in Ebola-Infected patients of the JIKI trial reveals concentrations lower than targeted. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(2): e0005389. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005389>

41. Wang M., Cao R., Zhang L., Yang X., Liu J., Xu M., et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.* 2020; 30(3): 269-271. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>
42. Li G., De Clercq E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *Nat. Rev. Drug Discov.* 2020; 19(3): 149-50. DOI: <http://doi.org/10.1038/d41573-020-00016-0>
43. Cai Q., Yang M., Liu D., Chen J., Shu D., Xia J., et al. Experimental treatment with favipiravir for COVID-19: an open-label control study. *Engineering (Beijing)*. 2020. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.eng.2020.03.007>
44. Irie K., Nakagawa A., Fujita H., Tamura R., Eto M., Ikesue H., et al. Pharmacokinetics of favipiravir in critically ill patients with COVID-19. *Clin. Transl. Sci.* 2020. DOI: <http://doi.org/10.1111/cts.12827>
45. Реестр разрешений на проведение клинических исследований: ЛП Favипиравир. Available at: [https://grls.rosminzdrav.ru/CiPermitReg.aspx?PermYear=0&DateInc=&NumInc=&DateBeg=&DateEnd=&Protocol=&RegNm=&Statement=&ProtoNum=&id-CIStatementCh=&Qualifier=&CiPhase=&RangeOfApp=&T-org=%d0%a4%d0%b0%d0%b2%d0%b8%d0%bf%d0%b8%d1%80%d0%b0%d0%b2%d0%b8%d1%80&LFDos=&Producer=&Researcher=&sponsorCountry=&MedBaseCount=&CiType=&PatientCount=&OrgDocOut=2&Status=&NotInReg=0&All=0&PageSize=8&order=date\\_perm&orderType=desc&pagenum=1](https://grls.rosminzdrav.ru/CiPermitReg.aspx?PermYear=0&DateInc=&NumInc=&DateBeg=&DateEnd=&Protocol=&RegNm=&Statement=&ProtoNum=&id-CIStatementCh=&Qualifier=&CiPhase=&RangeOfApp=&T-org=%d0%a4%d0%b0%d0%b2%d0%b8%d0%bf%d0%b8%d1%80%d0%b0%d0%b2%d0%b8%d1%80&LFDos=&Producer=&Researcher=&sponsorCountry=&MedBaseCount=&CiType=&PatientCount=&OrgDocOut=2&Status=&NotInReg=0&All=0&PageSize=8&order=date_perm&orderType=desc&pagenum=1) (Дата обращения: 06.06.2020)
46. Pilkington V., Pepperrell T., Hill A. A review of the safety of favipiravir – a potential treatment in the COVID-19 pandemic? *J. Virus. Erad.* 2020; 6(2): 45-51.
47. Al-Tawfiq J.A., Momattin H., Dib J., Memish Z.A. Ribavirin and interferon therapy in patients infected with the Middle East respiratory syndrome coronavirus: an observational study. *Int. J. Infect. Dis.* 2014; 20: 42-6. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.12.003>

## REFERENCES

1. Temporary methodical recommendations prevention, diagnostics and treatment of new coronaviral infection (COVID-19). Version 6 (28.04.2020). [http://static-1.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/050/116/original/28042020\\_%D0%9CR\\_COVID-19\\_v6.pdf](http://static-1.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/050/116/original/28042020_%D0%9CR_COVID-19_v6.pdf) (in Russian)
2. Fan H.H., Wang L.Q., Liu W.L., An X.P., Liu Z.D., He X.Q., et al. Repurposing of clinically approved drugs for treatment of coronavirus disease 2019 in a 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) related coronavirus model. *Chin. Med. J. (Engl.)*. 2020; 133(9): 1051-6. DOI: <http://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000797>
3. Hung I.F., Lung K.C., Tso E.Y., Liu R., Chung T.W., Chu M.Y., et al. Triple combination of interferon beta-1b, lopinavir-ritonavir, and ribavirin in the treatment of patients admitted to hospital with COVID-19: an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet*. 2020; 395(10238): 1695-704. DOI: [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31042-4](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31042-4)
4. Grein J., Ohmagari N., Shin D., Diaz G., Asperges E., Castagna A., et al. Compassionate use of Remdesivir for patients with severe Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(24): 2327-36. DOI: <http://doi.org/10.1056/NEJMoa2007016>
5. Leyssen P., De Clercq E., Neyts J. The anti-yellow fever virus activity of ribavirin is independent of error-prone replication. *Mol. Pharmacol.* 2006; 69(4): 1461-7. DOI: <http://doi.org/10.1124/mol.105.020057>
6. Crotty S., Cameron C., Andino R. Ribavirin's antiviral mechanism of action: lethal mutagenesis? *J. Mol. Med. (Berl)*. 2002; 80(2): 86-95. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00109-001-0308-0>
7. Ribavirin (Ribavirinum): instruction, use, contraindications, and formula. Available at: [http://www.rlsnet.ru/mnn\\_index\\_id\\_288.htm](http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_288.htm) (Accessed 15.05.2020) (in Russian)
8. Zhurilo N.I., Chudinov M.V., Matveev A.V., Smirnova O.S., Konstantinova I.D., Miroshnikov A.I., et al. Isosteric ribavirin analogues: Synthesis and antiviral activities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2018; 28(1): 11-4. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.11.029>
9. Uematsu J., Sakai-Sugino K., Kihira-Nakanishi S., Yamamoto H., Hirai K., Kawano M., et al. Inhibitions of human parainfluenza virus type 2 replication by ribavirin and mycophenolate mofetil are restored by guanosine and S-(4-nitrobenzyl)-6-thioinosine. *Drug Discov. Ther.* 2019; 13(6): 314-21. DOI: <http://doi.org/10.5582/dtd.2019.01084>
10. Khalili J.S., Zhu H., Mak N.S.A., Yan Y., Zhu Y. Novel coronavirus treatment with ribavirin: Groundwork for an evaluation concerning COVID-19. *J. Med. Virol.* 2020; 92(7): 740-6. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.25798>
11. Omrani A.S., Saad M.M., Baig K., Bahloul A., Abdul-Matin M., Alaidaroos A.Y., et al. Ribavirin and interferon alfa-2a for severe Middle East respiratory syndrome coronavirus infection: a retrospective cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 2014; 14(11): 1090-5. DOI: [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70920-X](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70920-X)
12. Falzarano D., de Wit E., Martellaro C., Callison J., Munster V.J., Feldmann H. Inhibition of novel  $\beta$  coronavirus replication by a combination of interferon- $\alpha$ 2b and ribavirin. *Sci. Rep.* 2013; 3: 1686. DOI: <http://doi.org/10.1038/srep01686>
13. Zhong H., Wang Y., Zhang Z.L., Liu Y.X., Le K.J., Cui M., et al. Efficacy and safety of current therapeutic options for COVID-19 – lessons to be learnt from SARS and MERS epidemic: A systematic review and meta-analysis. *Pharmacol. Res.* 2020; 157: 104872. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104872>
14. Karpenko I., Deev S., Kiselev O., Charushin V., Rusinov V., Ulomskiy E., et al. Antiviral properties, metabolism, and pharmacokinetics of a novel azolo-1,2,4-triazine-derived inhibitor of influenza A and B virus replication. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54(5): 2017-22. DOI: <http://doi.org/10.1128/AAC.01186-09>
15. Chupakhin O.N., Kiselev O.I., eds. *Triazavirin – a New Generation Antiviral Drug [Triazavirin – protivovirusnyy preparat novogo pokoleniya]*. Ekaterinburg; 2016. (in Russian)
16. Shvetsov A.V., Zabrodskaya Y.A., Nekrasov P.A., Egorov V.V. Triazavirine supramolecular complexes as modifiers of the peptide oligomeric structure. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2018; 36(10): 2694-8. DOI: <http://doi.org/10.1080/07391102.2017.1367329>
17. Loginova S.Ya., Borisevich S.V., Maksimov V.A., Bondarev V.P., Kotovskaya S.K., Rusinov V.L., et al. Therapeutic efficacy of Triazavirin, a novel Russian chemotherapeutic, against influenza virus A (H5N1). *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2011; 56(1-2): 10-2. (in Russian)
18. Loginova S.Ya., Borisevich S.V., Rusinov V.L., Ulomskiy E.N., Charushin V.N., Chupakin O.N., et al. Investigation of therapeutic efficacy of Triazavirin against experimental forest-spring encephalitis on albino mice. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2015; 60(7-8): 11-3. (in Russian)
19. Smirnova T.D., Danilenko D.M., Eroпкиn M.Yu., Deeva E.G., Kisilev O.I. Influence of Rimantadine, Ribavirin and Triazavirine on influenza A virus replication in human monolayer and lymphoblastoid cell lines. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2011; 56(11-12): 11-6. (in Russian)
20. Kiselev O.I., Deeva E.G., Mel'nikova T.I., Kozeletskaya K.N., Kiselev A.S., Rusinov V.L., et al. A new antiviral drug Triazavirin: results of phase II clinical trial. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(6): 9-12. (in Russian)
21. International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (INN). *WHO Drug Information*. 2011; 25(1). Available at: [https://www.who.int/medicines/publications/druginformation/innlists/ReclList65\\_final.pdf](https://www.who.int/medicines/publications/druginformation/innlists/ReclList65_final.pdf) (Accessed 15.04.2020)
22. Umifenovir (Umifenovirum): instruction, use, contraindications and formula. Available at: [http://www.rlsnet.ru/mnn\\_index\\_id\\_6264.htm](http://www.rlsnet.ru/mnn_index_id_6264.htm) (Accessed 15.04.2020) (in Russian)
23. Ligen Y. Handbook of COVID-19 Prevention and Treatment; 2020. Available at: [https://www.researchgate.net/publication/339998871\\_Handbook\\_of\\_COVID-19\\_Prevention\\_and\\_Treatment](https://www.researchgate.net/publication/339998871_Handbook_of_COVID-19_Prevention_and_Treatment) (Accessed 15.04.2020)
24. Pshenichnaya N.Yu., Bulgakova V.A., L'vov N.I., Poromov A.A., Selekova E.P., Grekova A.I., et al. Clinical efficacy of Umifenovir in influenza and ARVI (study ARBITR). *Terapevticheskiy arkhiv*. 2019; 91(3): 56-63. DOI: <http://doi.org/10.26442/00403660.2019.03.000127> (in Russian)
25. Haviernik J., Štefánik M., Fojtíková M., Kali S., Tordo N., Rudolf I., et al. Arbidol (Umifenovir): A broad-spectrum antiviral drug that inhibits medically important arthropod-borne flaviviruses. *Viruses*. 2018; 10(4): 184. DOI: <http://doi.org/10.3390/v10040184>
26. Zhang S., Zhi C., Li H., Huang D., Fan Q., Cui J., Umifenovir effectively inhibits IL-10 dependent persistent Coxsackie B4 virus infection. *Antiviral. Res.* 2017; 141: 165-73. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.02.018>
27. Zhu Z., Lu Z., Xu T., Chen C., Yang G., Zha T., et al. Arbidol monotherapy is superior to Lopinavir/ritonavir in treating COVID-19. *J. Infect.* 2020; 81(1): e21-3. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.060>

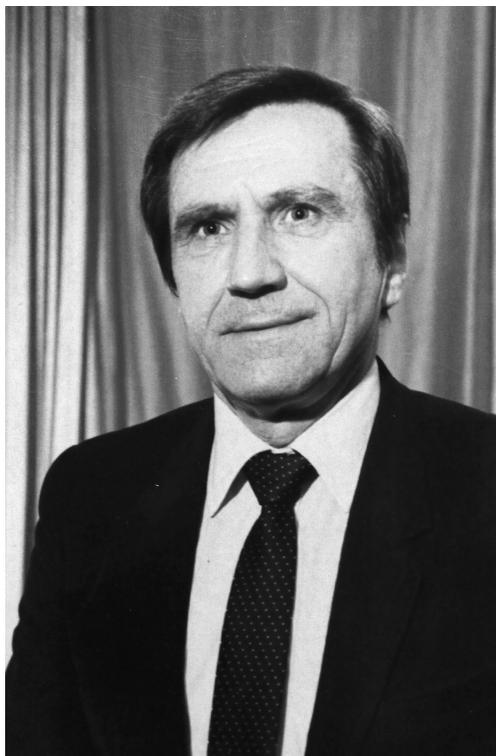
28. Temporary methodical recommendations. Drug therapy of acute respiratory viral infections in out-patient practice during COVID-19 epidemic. Version 1 (12.04.2020). Moscow; 2020. Available at: [https://static-3.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/049/991/original/RESP\\_REC\\_V1.pdf](https://static-3.rosminzdrav.ru/system/attachments/attaches/000/049/991/original/RESP_REC_V1.pdf) (Accessed 15.04.2020) (in Russian)
29. Du Y.X., Chen X.P. Favipiravir: pharmacokinetics and concerns about clinical trials for 2019-nCoV infection. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2020. DOI: <http://doi.org/10.1002/cpt.1844>
30. Jin Z., Smith L.K., Rajwanshi V.K., Kim B., Deval J. The ambiguous base-pairing and high substrate efficiency of T-705 (Favipiravir) Ribofuranosyl 5'-Triphosphate towards influenza A virus polymerase. *PLoS One.* 2013; 8(7): e68347. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0068347>
31. Handbook of drugs Medum.ru. AVIFAVIR – instructions for use. Available at: <https://medum.ru/avifavir> (Accessed 06.06.2020) (in Russian)
32. Furuta Y., Takahashi K., Fukuda Y., Kuno M., Kamiyama T., Kozaki K., et al. In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46(4): 977-81. DOI: <http://doi.org/10.1128/aac.46.4.977-981.2002>
33. Shiraki K., Daikoku T. Favipiravir, an anti-influenza drug against life-threatening RNA virus infections. *Pharmacol. Ther.* 2020; 209: 107512. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107512>
34. Baranovich T., Wong S.S., Armstrong J., Marjuki H., Webby R.J., Webster R.G., et al. T-705 (favipiravir) induces lethal mutagenesis in influenza A H1N1 viruses in vitro. *J. Virol.* 2013; 87(7): 3741-51. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.02346-12>
35. Escribano-Romero E., Jiménez de Oya N., Domingo E., Saiz J.C. Extinction of West Nile virus by favipiravir through lethal mutagenesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017; 61(11): e01400-17. DOI: <http://doi.org/10.1128/AAC.01400-17>
36. Rosenke K., Feldmann H., Westover J.B., Hanley P.W., Martellaro C., Feldmann F., et al. Use of favipiravir to treat Lassa virus infection in macaques. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(9): 1696-9. DOI: <http://doi.org/10.3201/eid2409.180233>
37. Mendenhall M., Russell A., Smee D.F., Hall J.O., Skirpstunas R., Furuta Y., et al. Effective oral favipiravir (T-705) therapy initiated after the onset of clinical disease in a model of arenavirus hemorrhagic fever. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011; 5(10): e1342. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001342>
38. Kerber R., Lorenz E., Duraffour S., Sissoko D., Rudolf M., Jaeger A., et al. Laboratory findings, compassionate use of favipiravir, and outcome in patients with Ebola virus disease, Guinea, 2015-A retrospective observational study. *J. Infect. Dis.* 2019; 220(2): 195-202. DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jiz078>
39. Cohen J. Results from encouraging Ebola trial scrutinized. *Science.* 2015. DOI: <http://doi.org/doi:10.1126/science.aaa7912> Available at: <https://www.sciencemag.org/news/2015/02/results-encouraging-ebola-trial-scrutinized> (Accessed 06.06.2020)
40. Nguyen T.H., Guedj J., Anglaret X., Laouénan C., Madelain V., Taburet A.M., et al. JIKI study group. Favipiravir pharmacokinetics in Ebola-Infected patients of the JIKI trial reveals concentrations lower than targeted. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(2): e0005389. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005389>
41. Wang M., Cao R., Zhang L., Yang X., Liu J., Xu M., et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro. *Cell Res.* 2020; 30(3): 269-271. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41422-020-0282-0>
42. Li G., De Clercq E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *Nat. Rev. Drug Discov.* 2020; 19(3): 149-50. DOI: <http://doi.org/10.1038/d41573-020-00016-0>
43. Cai Q., Yang M., Liu D., Chen J., Shu D., Xia J., et al. Experimental treatment with favipiravir for COVID-19: an open-label control study. *Engineering (Beijing).* 2020. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.eng.2020.03.007>
44. Irie K., Nakagawa A., Fujita H., Tamura R., Eto M., Ikesue H., et al. Pharmacokinetics of favipiravir in critically ill patients with COVID-19. *Clin. Transl. Sci.* 2020. DOI: <http://doi.org/10.1111/cts.12827>
45. Register of approvals for clinical trials: Favipiravir. Available at: [https://grls.rosminzdrav.ru/CiPermissionReg.aspx?PermYear=0&DateInc=&NumInc=&DateBeg=&DateEnd=&Protocol=&RegNm=&Statement=&ProtoNum=&idCISatementCh=&Qualifier=&CiPhase=&RangeOfApp=&Torg=%d0%a4%d0%b0%d0%b2%d0%b8%d0%bf%d0%b8%d1%80%d0%b0%d0%b2%d0%b8%d1%80&LFDos=&Producer=&Researcher=&sponsorCountry=&MedBaseCount=&CiType=&PatientCount=&OrgDocOut=2&Status=&NotInReg=0&All=0&PageSize=8&order=date\\_perm&orderType=desc&pagenum=1](https://grls.rosminzdrav.ru/CiPermissionReg.aspx?PermYear=0&DateInc=&NumInc=&DateBeg=&DateEnd=&Protocol=&RegNm=&Statement=&ProtoNum=&idCISatementCh=&Qualifier=&CiPhase=&RangeOfApp=&Torg=%d0%a4%d0%b0%d0%b2%d0%b8%d0%bf%d0%b8%d1%80%d0%b0%d0%b2%d0%b8%d1%80&LFDos=&Producer=&Researcher=&sponsorCountry=&MedBaseCount=&CiType=&PatientCount=&OrgDocOut=2&Status=&NotInReg=0&All=0&PageSize=8&order=date_perm&orderType=desc&pagenum=1) (Accessed 06.06.2020) (in Russian)
46. Pilkington V., Pepperrell T., Hill A. A review of the safety of favipiravir – a potential treatment in the COVID-19 pandemic? *J. Virus. Erad.* 2020; 6(2): 45-51.
47. Al-Tawfiq J.A., Momattin H., Dib J., Memish Z.A. Ribavirin and interferon therapy in patients infected with the Middle East respiratory syndrome coronavirus: an observational study. *Int. J. Infect. Dis.* 2014; 20: 42-6. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.12.003>

---

## НЕКРОЛОГ

---

### Памяти Виталия Александровича Сергеева (01.05.1927–14.06.2020)



14 июня 2020 г. ушёл из жизни заслуженный деятель науки РФ, доктор биологических наук, профессор Виталий Александрович Сергеев.

В.А. Сергеев родился 1 мая 1927 г. в селе Буераки Сенгилеевского района Ульяновской области. Окончил с отличием Московскую ветеринарную академию (1945–1949 гг.), где начал свою научную деятельность, ещё будучи студентом.

С 1949 по 1956 г. В.А. Сергеев работал в области микробиологии во Всесоюзном институте экспериментальной ветеринарии (ВИЭВ, Москва), с 1956 г. – в области вирусологии. С 1960 г. Виталий Александрович возглавлял лаборатории во Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной вирусологии и микробиологии Российской академии сельскохозяйственных наук (ВНИИВВиМ) (1960–1979 гг.), Институте медико-биологических проблем Минздрава СССР (1980–1981 гг.), ВИЭВ (1982–1989 гг.), Институте ветеринарной медицины Киева (1990–1993 гг.). С 1994 г. он был научным консультантом НПО НАРВАК (Москва).

Профессор В.А. Сергеев – крупный учёный в области общей и ветеринарной вирусологии и специфической профилактики вирусных болезней животных, его труды широко известны специалистам в нашей стране и за рубежом. Он внёс большой вклад в теорию и практику нового научного направления – биотехнологию изготовления противовирусных препаратов и заслуженно являлся признанным авторитетом в этой области науки. В процессе этих разработок предложен ряд оригинальных и ценных решений, защищённых 35 авторскими свидетельствами, отмеченными четырьмя золотыми, тремя серебряными и одной бронзовой медалями ВДНХ СССР. Кроме того, В.А. Сергеев был награждён медалями «За победу над Германией в Великой Отечественной войне 1941–1945 гг.» и «За трудовую доблесть».

Виталий Александрович Сергеев – автор более 350 научных работ. Итоги многолетних исследований по культивированию клеток и вирусов, структуре и биологии вирусов обобщены в пяти монографиях: «Размножение вирусов животных в культуре ткани», «Репродукция и выращивание вирусов животных», «Структура и биология вирусов животных», «Культура клеток в ветеринарии и биотехнологии», «Вирусные вакцины».

Под руководством профессора В.А. Сергеева выполнено 60 кандидатских и докторских диссертаций, создана научная школа высококвалифицированных специалистов в области общей и ветеринарной вирусологии. Характерными чертами его научной деятельности были высокий научно-методический и организационный уровень, целеустремлённость, тесная связь с практикой, внедрение результатов научных исследований в народное хозяйство.

Он был ярким примером учёного с неисчерпаемой энергией, грандиозными идеями, пропагандистом профессиональных достижений, базирующихся на обширных знаниях в сочетании с уникальными аналитическими способностями, стратегом в области теории и практики иммунопрофилактики инфекционных болезней животных, авторитетным наставником молодых специалистов, образцом взаимопомощи и взаимопонимания в среде коллег и соратников.

Виталий Александрович Сергеев навсегда останется в нашей памяти как великий учёный в области биотехнологии, разработки средств специфической профилактики и методов диагностики болезней животных.

*Вечная память талантливому учёному, уважаемому коллеге, светлomu и доброму человеку!*