

Свидетельство о регистрации  
ПИ № ФС77-77676 от 29 января 2020 г.  
ISSN 0507-4088 (Print)  
ISSN 2411-2097 (Online)  
DOI: 10.36233

**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 открытого доступа,  
не берущий плату за публикации.

Контент доступен под лицензией  
Commons Attribution International  
4.0 CC-BY.

Статьи иностранных авторов и отдельные статьи, рекомендованные Редакционной коллегией журнала, публикуются на русском и английском языках под единым DOI.

Полные тексты статей журнала  
доступны на сайтах:

<https://www.virusjour.elpub.ru;>  
<https://www.elibrary.ru;>  
<https://www.cyberleninka.ru;>  
<https://www.rucont.ru;>  
<https://www.ebsco.com>

#### ИЗДАТЕЛЬ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии  
Роспотребнадзора  
111123, Москва,  
ул. Новогиреевская, д. 3А.  
Phone/fax: +7(925) 011-87-79  
E-mail: [publisher@crie.ru](mailto:publisher@crie.ru)

#### РЕДАКЦИЯ:

Редакция расположена по адресу  
Издателя

Начальник редакционно-  
издательского отдела:  
*Осокина Ольга Владимировна*

Заведующая редакцией:  
*Неверова Анна Леонидовна*

Выпускающий редактор:  
*Архипова Елена Михайловна*

Редакция не несёт ответственности за  
содержание рекламных материалов.

К публикации принимаются только  
статьи, подготовленные в соответ-  
ствии с правилами для авторов  
(см. <https://www.virusjour.elpub.ru>).

Направляя статью в редакцию,  
авторы принимают условия договора  
публичной оферты  
(<https://www.virusjour.elpub.ru>).

Подписано в печать 25.02.2021.  
Формат 60×90/8.

Тираж 50 экз. Печ. л. .  
Отпечатано в типографии  
«Буки Веди», [www.bukivedi.com](http://www.bukivedi.com).  
E-mail: [info@bukivedi.com](mailto:info@bukivedi.com).

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии  
Роспотребнадзора, 2021

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

# ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

(VOPROSY VIRUSOLOGII)

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

1

Том 66 • 2021

## 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)

**Глузов 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)

**Негёсов 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)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

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

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

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

**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)

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media. Certificate of registration PI no. FS77-77676 ISSN 0507-4088 (Print) ISSN 2411-2097 (Online) DOI: 10.36233

The journal is presented in the following research databases:

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 (on the Web of Science platform)

The journal is a Platinum Open Access peer-reviewed scholarly journal, which does not charge author fees.

The content is licensed under Commons Attribution International 4.0 CC-BY.

Articles by foreign authors, as well as Russian-language articles specially recommended by the Editorial Board, are published in Russian and English under the same DOI.

Full texts of issues of the journal are available on:

<https://www.virusjour.elpub.ru;>

<https://www.elibrary.ru;>

<https://www.cyberleninka.ru;>

<https://www.rucont.ru;>

<https://www.ebsco.com>

**PUBLISHER:**

Central Research Institute for Epidemiology, 111123, 3A, Novogireevskaya St., Moscow, Russian Federation. Phone/fax: +7(925) 011-87-79. E-mail: [publisher@crie.ru](mailto:publisher@crie.ru)

Head of the Editorial and publishing department: *Olga V. Osokina*

**EDITORIAL OFFICE:**

111123, 3A, Novogireevskaya St., Moscow, Russian Federation. Phone/fax: +7(925) 011-87-79 E-mail: [vopr.virusol@crie.ru](mailto:vopr.virusol@crie.ru)

Head of Editorial Office:

*Anna L. Neverova*

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

The materials that do not meet the requirements of the journal (<https://www.virusjour.elpub.ru>;) are rejected without further consideration.

When the author submits an article to the Editorial Board, he/she accepts the terms and conditions of the public offer agreement

(<https://www.virusjour.elpub.ru>).

Signed to the press on December 25, 2021. Print format 60 × 90/1/8. Circulation 50 copies.

Produced at the Buki Vedi Printing House. 115093, 1, 1st Party lane, Moscow, Russian Federation. E-mail: [info@bukivedi.com](mailto:info@bukivedi.com). [www.bukivedi.com](http://www.bukivedi.com)

© Central Research Institute for Epidemiology, 2021

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

# PROBLEMS OF VIROLOGY

(VOPROSY VIRUSOLOGII)

SCIENTIFIC THEORETICAL JOURNAL ISSUED  
ONCE IN TWO MONTHS

Published since 1956

1

Volume 66 • 2021

## 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. – Professor, Dr.Sci. (Medicine)

Belousova R.V. – Professor, Dr. Sci. (Veterinary)

Galegov G.A. – Professor, Dr. Sci. (Biology)

Gulyukin M.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Veterinary)

Gurtsevich V.E. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Ershov F.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Zhirnov O.P. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology)

Zverev V.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Biology)

Zuev V.A. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Ivanova O.E. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Karganova G.G. – Professor, Dr. Sci. (Biology)

Kolobukhina L.V. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Lobzin Yu.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Maleev V.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Onishchenko G.G. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Popova A. Yu. – Professor, Dr. Sci. (Medicine), Chief Sanitary Doctor of the Russian Federation;

Uryvaev L.V. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Yuminova N.V. – Professor, Dr. Sci. (Biology)

## EDITORIAL COUNCIL

Akimkin V.G. — RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), (Moscow, Russia)

Aliper T.I. — Professor, Dr. Sci. (Biology), (Moscow, Russia)

Antonov V.A. — Professor, Dr. Sci. (Medicine), (Volgograd, Russia)

Bovin N.V. — Professor, Dr. Sci. (Chemistry), (Moscow, Russia)

Borisevich S.V. — Corr. Member of RAS, Professor, Dr. Sci. (Biology) (Sergiev Posad, Russia)

Briko N.I. — RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Vasin A.V. — Dr. Sci. (Biology) (St. Petersburg, Russia)

Glotov A.G. — Professor, Dr. Sci. (Veterinary) (Krasnoobsk, Russia)

Glupov V.V. — Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Zasedatelev A.S. — Professor, Dr. Sci. (Physics and Mathematics) (Moscow, Russia)

Zlobin V.I. — RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Irkutsk, Russia)

Ivanov L.I. — MD (Khabarovsk, Russia)

Korzaya L.I. — Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Sochi, Russia)

Kuzin A.A. — Dr. Sci. (Medicine) (St. Petersburg, Russia)

Kutyrev V.V. — RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Saratov, Russia)

Leonova G.N. — Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Vladivostok, Russia)

Loktev V.B. — Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Lukashev A.N. — RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Makarov V.V. — Professor, Dr. Sci. (Biology) (Moscow, Russia)

Malyshev N.A. — Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Manapova E.R. — Dr. Sci. (Medicine) (Kazan', Russia)

Mikhailov M.I. — RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Netesov S.V. — RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Nikiforov V.V. — Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Panin A.N. — RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Veterinary) (Moscow, Russia)

Pokrovskiy A.G. — RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Novosibirsk, Russia)

Reznik V.I. — MD, PhD (Khabarovsk, Russia)

Romanenko V.V. — Dr. Sci. (Medicine) (Ekaterinburg, Russia)

Savel'ev S.I. — Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Lipetsk, Russia)

Smetanina S.V. — PhD (Moscow, Russia)

Stepanova T.F. — Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Tyumen', Russia)

Tutel'yan A.V. — RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Chvala I.A. — PhD (Vladimir, Russia)

Chumakov P.M. — RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology) (Moscow, Russia)

Chuchalin A.G. — RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Shestopalov A.M. — Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Shchelkanov M.Yu. — Professor, Dr. Sci. (Biology) (Vladivostok, Russia)

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

## INTERNATIONAL EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

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

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

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

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

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

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

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

Oxford J. (DSc; London, UK)

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

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

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

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

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

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

Webby R. (PhD; Memphis, USA)

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

## СОДЕРЖАНИЕ

## ОБЗОРЫ

**Должикова И.В., Щербинин Д.Н., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л.**

Вирус Эбола (*Filoviridae: Ebolavirus: Zaire ebolavirus*): фатальные адаптационные мутации\* ..... 7

**Хафизов К.Ф., Петров В.В., Красовитов К.В., Золкина М.В., Акимкин В.Г.**

Экспресс-диагностика новой коронавирусной инфекции с помощью реакции петлевой изотермической амплификации ..... 17

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Поволяева О.С., Юрков С.Г., Лаптева О.Г., Колбасова О.Л., Чадаева А.А., Кольцов А.Ю.,**

**Синдрякова И.П., Власов М.Е., Живодёров С.П., Луницин А.В.**

Биологическая характеристика и перmissивность к вирусам штамма диплоидных клеток почки летучей мыши нетопыря Натузиуса (*Pipistrellus nathusii* Keyserling & Blasius, 1839; *Chiroptera: Microchiroptera: Vespertilionidae*) ..... 29

**Руженцова Т.А., Хавкина Д.А., Чухляев П.В., Гарбузов А.А., Плоскирева А.А.**

Влияние антикоагулянтной терапии на течение COVID-19 у коморбидных пациентов ..... 40

**Мясников А.Л., Бернс С.А., Талызин П.А., Ершов Ф.И.**

Интерферон гамма в терапии пациентов с COVID-19 среднетяжёлого течения ..... 47

**Черепушкин С.А., Цибезов В.В., Южаков А.Г., Латышев О.Е., Алексеев К.П., Алтаева Э.Г.,**

**Хаметова К.М., Воркунова Г.К., Южакова К.А., Гребенникова Т.В.**

Синтез и характеристика вирусоподобных частиц ротавируса А (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*) человека ..... 55

**Егорова М.С., Курашова С.С., Ишмухаметов А.А., Баловнева М.В., Девяткин А.А., Сафонова М.В.,**

**Ожерелков С.В., Хапчаев Ю.Х., Балкина А.С., Белякова А.В., Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А.**

Разработка метода количественного определения вирусной РНК для контроля специфической активности вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом ..... 65

**Исаева О.В., Ильченко Л.Ю., Сарыглар А.А., Карлсен А.А., Кюрегян К.К., Михайлов М.И.**

Течение и исходы хронического вирусного гепатита D у жителей Республики Тыва как эндемичного региона ..... 74

## РЕЦЕНЗИИ

**Малеев В.В.**

Рецензия на монографию «Генетические технологии» под общей редакцией академика РАН, д.м.н., проф. В.Г. Акимкина ..... 84

## CONTENTS

## REVIEWS

## ОБЗОРЫ

**Dolzhiyeva I.V., Shcherbinin D.N., Logunov D.Yu., Gintsburg A.L.**

Ebola virus (*Filoviridae: Ebolavirus: Zaire ebolavirus*): fatal adaptation mutations\* . . . . . 7

**Khafizov K.F., Petrov V.V., Krasovitsov K.V., Zolkina M.V., Akimkin V.G.**

Rapid diagnostics of novel coronavirus infection by loop-mediated isothermal amplification . . . . . 17

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Povolyaeva O.S., Yurkov S.G., Lapteva O.G., Kolbasova O.L., Chadaeva A.A., Kol'tsov A.Yu., Sindryakova I.P., Vlasov M.E., Zhivoderov S.P., Lunitsin A.V.**

Biological characteristics and permissiveness to viruses of diploid kidney cells strain from the bat *Nathusius' pipistrelle* (*Pipistrellus nathusii* Keyserling & Blasius, 1839; *Chiroptera: Microchiroptera: Vespertilionidae*) . . . . . 29

**Ruzhentsova T.A., Khavkina D.A., Chukhlaev P.V., Garbuzov A.A., Ploskireva A.A.**

Effect of anticoagulant therapy on the course of COVID-19 in comorbid patients . . . . . 40

**Myasnikov A.L., Berns S.A., Talyzin P.A., Ershov F.I.**

Interferon gamma in the treatment of patients with moderate COVID-19 . . . . . 47

**Cherepushkin S.A., Tsibezov V.V., Yuzhakov A.G., Latyshev O.E., Alekseev K.P., Altayeva E.G., Khametova K.M., Vorkunova G.K., Yuzhakova K.A., Grebennikova T.V.**

Synthesis and characterization of human rotavirus A (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*) virus-like particles . . . . . 55

**Egorova M.S., Kurashova S.S., Ishmukhametov A.A., Balovneva M.V., Deviatkin A.A., Safonova M.V., Ozherelkov S.V., Khapchaev Yu.Kh., Balkina A.S., Belyakova A.V., Dzagurova T.K., Tkachenko E.A.**

Real-time PCR assay development for the control of vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome . . . 65

**Isaeva O.V., Il'chenko L.Yu., Saryglar A.A., Karlson A.A., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I.**

Clinical course and outcomes of chronic viral hepatitis D in patients from Republic of Tuva as endemic region . . . . . 74

## BOOK REVIEW

**Maleev V.V.**

Review of the monograph «Genetic Technologies» by V.G. Akimkin (ed.) . . . . . 84

\* The article is published in Russian and English on the journal's website: <https://virusjour.elpub.ru/jour>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

## Вирус Эбола (*Filoviridae: Ebolavirus: Zaire ebolavirus*): фатальные адаптационные мутации

Должикова И.В., Щербинин Д.Н., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л.

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

Болезнь, вызванная вирусом Эбола (БВВЭ) (прежнее название – геморрагическая лихорадка Эбола), – одно из самых опасных инфекционных заболеваний, поражающих человека и приматов. С момента идентификации первой вспышки в 1976 г. в мире зарегистрировано более 25 аналогичных эпизодов, самый крупный из которых в 2014–2016 гг. перерос в эпидемию и унёс жизни свыше 11 тыс. человек. В настоящее время одновременно в восточной и западной частях Демократической Республики Конго (ДРК) протекают 2 независимые вспышки БВВЭ. Считается, что естественным резервуаром её возбудителей являются летучие мыши (*Microchiroptera*), однако инфекционный агент из них до сих пор не выделен. Известно, что большинство вирусов животных не способно реплицироваться в человеческом организме. Для того чтобы произошло заражение человека, необходимо наличие адаптационных мутаций (АМ). В данном обзоре на основании результатов ряда исследований сформулирована гипотеза о том, что формирование мутационных изменений подобного рода происходит непосредственно в популяциях людей и приматов, приводя в дальнейшем к развитию вспышек БВВЭ.

**Ключевые слова:** вирус Эбола; адаптационные мутации

**Для цитирования:** Должикова И.В., Щербинин Д.Н., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Вирус Эбола (*Filoviridae: Ebolavirus: Zaire ebolavirus*): фатальные адаптационные мутации. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(1): 7-16. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-23>

**Для корреспонденции:** Должикова Инна Вадимовна, канд. биол. наук, заведующая лабораторией Государственной коллекции вирусов, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия. <https://orcid.org/0000-0003-2548-6142>. E-mail: [dolzhikova@gamaleya.org](mailto:dolzhikova@gamaleya.org)

**Участие авторов:** Должикова И.В. – сбор, обработка материала, написание текста; Щербинин Д.Н. – сбор, обработка материала, написание текста; Логунов Д.Ю. – научное редактирование текста, резюме, общая редакция; Гинцбург А.Л. – научное редактирование текста, резюме, общая редакция.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансировании Государственного задания Минздрава России № 056-00034-20-02.

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

Поступила 07.10.2020  
Принята в печать 12.11.2020

## **Ebola virus (*Filoviridae: Ebolavirus: Zaire ebolavirus*): fatal adaptation mutations**

Inna V. Dolzhikova, Dmitrii N. Shcherbinin, Denis Yu. Logunov, Aleksandr L. Gintsburg

FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia

Ebola virus disease (EVD) (former Ebola hemorrhagic fever) is one of the most dangerous infectious diseases affecting humans and primates. Since the identification of the first outbreak in 1976, there have been more than 25 outbreaks worldwide, the largest of which escalated into an epidemic in 2014–2016 and caused the death of more than 11,000 people. There are currently 2 independent outbreaks of this disease in the eastern and western parts of the Democratic Republic of the Congo (DRC) at the same time. Bats (*Microchiroptera*) are supposed to be the natural reservoir of EVD, but the infectious agent has not yet been isolated from them. Most animal viruses are unable to replicate in humans. They have to develop adaptive mutations (AM) to become infectious for humans. In this review based on the results of a number of studies, we hypothesize that the formation of AM occurs directly in the human and primate population and subsequently leads to the development of EVD outbreaks.

**Key words:** Ebola virus; adaptation mutations

**For citation:** Dolzhikova I.V., Shcherbinin D.N., Logunov D.Yu., Gintsburg A.L. Ebola virus (*Filoviridae: Ebolavirus: Zaire ebolavirus*): fatal adaptation mutations. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(1): 7-16. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-23>

**For correspondence:** Dolzhikova Inna Vadimovna, Ph.D., D.Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of the State Collection of Viruses, FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia. <https://orcid.org/0000-0003-2548-6142>. E-mail: [dolzhikova@gamaleya.org](mailto:dolzhikova@gamaleya.org)

**Information about the authors:**Dolzhikova I.V., <https://orcid.org/0000-0003-2548-6142>Shcherbinin D.N., <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>Logunov D.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>Gintsburg A.L., <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

**Contribution:** Dolzhikova I.V. – collection, processing of material, writing of the text; Shcherbinin D.N. – collection, processing of material, writing of the text; Logunov D.Yu. – scientific editing, summary, general edition; Gintsburg A.L. – scientific editing, summary, general edition.

**Acknowledgement.** The work was carried out with funding from the State Assignment of the Ministry of Health of Russia No. 056-00034-20-02.

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

Received 7 October 2020

Accepted 12 November 2020

### Адаптационные мутации в структуре гликопротеина вируса Эбола приводят к увеличению его инфекционности для клеток человека и приматов

Болезнь, вызванная вирусом Эбола (БВВЭ), – одно из самых опасных инфекционных заболеваний, поражающих человека и приматов. Она характеризуется тяжёлым течением, развитием общей интоксикации и высоким уровнем летальности, достигающим 90% [1–3]. Возбудители БВВЭ принадлежат к роду эболавирусов (*Ebolavirus*), относящихся к семейству филловирусов (*Filoviridae*) [4]. В настоящее время известно 6 видов этого рода: *Zaire ebolavirus* (ZEBOV) (вирус Эбола, ВЭ), *Sudan ebolavirus* (SUDV), *Bundibugyo ebolavirus* (BDBV), *Reston ebolavirus* (RESTV), *Tai Forest ebolavirus* (TAFV), *Bombali ebolavirus* (BOMV), из них первые 3 наиболее патогенны для человека.

Вирус Эбола (ВЭ) имеет сложное строение. В его структуру входят липидная оболочка с трансмембранными белками, нуклеокапсид с геномной РНК и полимеразным комплексом, а также матриксный слой, состоящий из белков VP24 и VP40 [5]. Вирусный геном представлен молекулой одноцепочечной РНК (оцРНК) отрицательной полярности, которая кодирует структурные и неструктурные белки. Она расположена в центральной части вириона, будучи связана с нуклеопротеином (NP) и белками нуклеокапсида (VP30). Там же находятся белки VP35 и каталитическая субъединица вирусной полимеразы L [6–8]. Посредством матриксных белков VP24 и VP40 нуклеокапсид соединён с внутренней стороной липидного бислоя вирусной оболочки, сформированного из плазматической мембраны клетки хозяина во время отпочковывания от неё вириона [6–8]. Молекулы оболочечного гликопротеина (GP), заякоренные в бислое, формируют шипики и играют важнейшую роль в жизненном цикле вируса, поскольку опосредуют процесс интернализации.

Исследование различных мутаций в белках ВЭ показало, что наиболее эффективными из них с точки зрения размножения вируса являются те, которые затрагивают его полноразмерный гликопротеин. Так, в работе Wong G. и соавт. продемонстрировано, что приобретаемые мутации в структуре GP позволяют патогену более эффективно осуществлять интернализацию, что приводит к повышению скорости

роста и, как следствие, увеличению выхода вирусного потомства из клеток [9]. В итоге возрастает инфекционность агента как *in vitro*, так и *in vivo*. Сходные результаты получены разными авторами [10, 11] при изучении адаптационных мутаций (АМ) в гликопротеине ВЭ на клеточных культурах различных млекопитающих. В частности, Kurosaki Y. и соавт. показали, что во время культивирования рассматриваемого возбудителя или вируса везикулярного стоматита (vesicular stomatitis virus, VSV), гликопротеин которого заменён на таковой ВЭ, в клеточной культуре Vero E6 формируются АМ структуры гликопротеина, приводящие к повышению эффективности вирусной интернализации. Это, в свою очередь, обуславливает увеличение скорости роста и выхода потомства вируса из клетки. Таким образом, появление и закрепление мутационных изменений подобного рода ведёт к возрастанию инфекционности ВЭ для клеток человека и приматов [12–15].

Исследование АМ данного инфекционного агента в период разворачивающейся эпидемии 2014–2016 гг. выявило несколько ключевых мутаций, результатом которых стало широкое распространение заболевания. Среди них в первую очередь следует отметить мутационные изменения в полноразмерном гликопротеине вируса, позволившие последнему интернализироваться в несколько раз эффективнее [16, 17].

#### От первой вспышки БВВЭ к фатальным адаптационным мутациям

С момента выделения патогена и до настоящего времени известно более 25 вспышек БВВЭ (см. **таблицу**), самая крупная из которых в 2014–2016 гг. переросла в эпидемию и унесла жизни свыше 11 тыс. человек [18, 19].

Первый эпизод был зарегистрирован в конце июня 1976 г. в Судане (г. Нзара) у 3 работников хлопковой фабрики, путь заражения при этом не был описан [20]. Немного позднее, в сентябре того же года, имела место вспышка в Демократической Республике Конго (ДРК) (ранее – Заир) в районе деревни Ямбуку [21]. Первый заболевший лечился в больнице Yambuku Mission Hospital (YMH) с помощью инъекции от возможной малярии. Последующая передача инфекции произошла при использовании заражённых игл и шприцев в больнице и поликлиниках этого района, а также в ходе тесного личного контакта.

В 2014 г. вспышка, переросшая в эпидемию, началась с заболевания 18-месячного мальчика, проживавшего в деревне Мелианду на юге Гвинеи [22, 23].

Вероятной причиной заражения ребёнка считают контакт с летучими мышами или их отделяемым (моча, фекалии, слюна).

**Хронология вспышек БВВЭ с 1976 г. [19]**  
**Chronology of the EVD outbreaks since 1976 [19]**

Страна/регион Country/region	Случаи заболевания, <i>n</i> Cases of disease, <i>n</i>	Летальные исходы, <i>n</i> Lethal outcomes, <i>n</i>	Вид возбудителя Type of pathogen	Годы Years
Демократическая Республика Конго (ДРК), Уганда Democracy Republic of Congo (DRC), Uganda	3228	2157	ZEBOV	2018–2019
ДРК DRC	54	33	ZEBOV	2018
ДРК DRC	8	4	ZEBOV	2017
ДРК DRC	66	49	ZEBOV	2014
Гвинея, Сьерра-Леоне, Либерия Guinea, Sierra Leone, Liberia	28 652	11 325	ZEBOV	2014–2016
Уганда Uganda	6	3	SUDV	2012
ДРК DRC	36	13	BDBV	2012
Уганда Uganda	11	4	SUDV	2012
Уганда Uganda	1	1	SUDV	2011
ДРК DRC	32	15	ZEBOV	2008
Уганда Uganda	149	37	BDBV	2007
ДРК DRC	264	187	ZEBOV	2007
Южный Судан South Sudan	17	7	SUDV	2004
Республика Конго Republic of the Congo	35	29	ZEBOV	2003
Республика Конго Republic of the Congo	143	128	ZEBOV	2002
Республика Конго Republic of the Congo	57	43	ZEBOV	2001
Габон Gabon	65	53	ZEBOV	2001
Уганда Uganda	425	224	SUDV	2000
Южная Африка South Africa	2	1	ZEBOV	1996
Габон Gabon	60	45	ZEBOV	1996
Габон Gabon	37	21	ZEBOV	1996
ДРК DRC	315	250	ZEBOV	1995
Кот-д'Ивуар Côte d'Ivoire	1	0	TAFV	1994
Габон Gabon	52	31	ZEBOV	1994
Южный Судан South Sudan	34	22	SUDV	1979
ДРК DRC	1	1	ZEBOV	1977
Южный Судан South Sudan	284	151	SUDV	1976
ДРК DRC	318	280	ZEBOV	1976

При детальном рассмотрении эпизодов БВВЭ обращает на себя внимание, что часто первичным пациентом выступает один человек или небольшая группа людей, от которого/которых заболевание начинает передаваться остальным. В документах на сайтах Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и Центров по контролю и профилактике заболеваний (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) США указано, что наиболее вероятной причиной болезни у первичных пациентов в основном служит контакт с заражёнными/погибшими обезьянами (*Haplorhini*) либо летучими мышами (*Microchiroptera*). При контакте с первыми заболевание проявлялось практически одновременно у всех контактировавших, в то время как во втором случае – у единичных [24]. Для того чтобы произошло эффективное заражение человека (с развитием инфекционного процесса), необходимо наличие АМ, поскольку большинство вирусов животных не способно реплицироваться в человеческом организме [25].

До сих пор из летучих мышей не выделен ВЭ, обладающий высокой инфекционностью, несмотря на то что исследуемые животные были ПЦР-положительными [26]. Вирусный агент, полученный из их тканей, крайне неэффективно размножается в клеточных культурах человека и приматов, а следовательно, для репликации в человеческом организме ему необходимы АМ [17]. Важным этапом в исследовании АМ структуры гликопротеина, входящего в ВЭ, стало установление феномена утраты последним инфекционности для летучих мышей на фоне таких мутационных изменений. Urbanowicz R.A. с соавт. показали, что эти мутации обуславливают рост инфекционности вируса для человека и в то же время ведут к снижению проявления этого свойства по отношению к клеткам летучих мышей [17].

АМ могут появляться во время персистенции ВЭ в организме обезьян, которые контактируют с отделяемым заражённых летучих мышей (слюна, фекалии), а также поедают их. Способность вирусного агента в этих ситуациях мутировать показана при культивировании на культуре клеток эпителия почки африканской зелёной мартышки (*Chlorocebus sabaues*) – Vero E6 [10, 11], а также в ходе изучения его мутационной изменчивости у заражённых обезьян [27]: детектирован возбудитель с мутациями в различных областях генома (в том числе ответственных за структуру гликопротеина), приводящими к повышению эффективности интернализации. Адаптированный вирус способен активно размножаться в клетках обезьян и человека; результат попадания такого патогена в организм – развитие БВВЭ у индивидуума. Необходимо подчеркнуть, что все случаи контакта человека с заражёнными обезьянами приводили к заболеванию. Ярким примером этого служит эпизод в Центральной Африке, когда группа людей направилась на охоту и принесла в деревню погибшее (по тогда ещё не ясным причинам) животное, которое затем употребили в пищу. Спустя несколько дней в деревне началась вспышка БВВЭ.

АМ могут возникать, по всей видимости, и в человеческом организме. Интерес вызывает тот факт, что у населения эндемичных территорий обнаруживают специфические антитела (АТ) к ВЭ, несмотря на то что признаков заболевания у них не было. В Судане у 19% людей, контактировавших с больными и не имевших ранее контакта с возбудителем, в сыворотке крови определяются специфические АТ. В ДРК 1% живущих в деревнях за пределами эпидемической зоны людей, которые не имели контакта с заболевшими БВВЭ и ранее не проявляли симптомов болезни, также имеют подобные АТ [21]. В эндемичных районах страны (деревни в окрестности города Тандала) у 7% населения детектированы АТ к ВЭ, причём наличие их прямо коррелирует с возрастом: от 1% у детей до 4 лет до 21% у лиц старше 60 лет [28]. Ряд других исследований также показал серопозитивность людей к эболавирусам: 20,8% в Центральной Африканской Республике (ЦАР) [29], 22% в Судане [38], 13% – в Либерии [40], 11% в Габоне [34–37], 10% в ДРК [28, 30–33], 7% – в Камеруне [41, 42], 4% на Мадагаскаре [39], 2% в Нигерии [43], по 1% – в Федеративной Республике Германии (ФРГ) [44] и Кении [45]. Совсем недавние работы, опубликованные в июле 2020 г., свидетельствуют, что в Уганде проживающие и работающие в районах повышенного риска в 5,4 раза более серопозитивны к филовирусам, чем жители центральной части страны [46]. Таким образом, представители населения эндемичных по БВВЭ регионов так или иначе контактируют с носителями ВЭ (летучими мышами) в процессе их вылавливания, приготовления для употребления в пищу, поедания и т.д. В результате у проконтактировавших с вирусом может формироваться специфический иммунный ответ, который, по всей видимости, не позволяет прогрессировать заболеванию в нулевом пациенте. Однако возбудитель может персистировать у таких лиц, приобретая АМ; при этом болезнь у них не развивается, поскольку иммунная система позволяет сдерживать развитие инфекционного процесса. Для подтверждения этой гипотезы целесообразно проведение сравнительного анализа геномов ВЭ, выделенного от летучих мышей, с геномами возбудителя, изолированного от заболевших/погибших людей и обезьян, однако в настоящее время это не представляется возможным. В общедоступных базах данных (GenBank) имеется информация о нуклеотидных последовательностях гликопротеина ВЭ, основанная на изучении полученной из тканей заболевших людей и обезьян РНК, но отсутствуют аналогичные сведения относительно биологического материала природного резервуара патогена – летучих мышей. Имеется только 7 последовательностей, кодирующих полимержу L рассматриваемого вируса, выделенного от этих животных.

### Преодоление межвидового барьера

Таким образом, можно предположить несколько возможных вариантов преодоления вирусом межвидового барьера.

**Вариант 1.** Заражение людей происходит от летучих мышей или других животных, несущих адаптированный патоген.

Так, в начале эпидемии 2014–2016 гг. первичным пациентом был маленький мальчик, который играл с другими ребятами в старом дереве, где жила колония бульдоговых летучих мышей (*Mops condylurus*). Они представляют собой потенциальный резервуар ВЭ (недавно открытый новый вид эболавирусов – *Bombali ebolavirus* – выделен от животных этого вида). Летучие мыши обычно живут колониями, внутри каждой из которых возможно наличие особи, несущей вирус с мутациями. Заболевший ребёнок мог контактировать именно с таким животным [25].

В рамках этого варианта предполагается, что адаптация происходит в организме летучих мышей, после чего адаптированный вирус переходит на человека или обезьяну; при этом, поскольку люди отличаются от приматов, мутации могут быть различными (рис. 1). Обезьяны, в свою очередь, генетически ближе к людям по сравнению с летучими мышами, и поэтому преодоление межвидового барьера обезьяна–человек происходит легче, чем в случае с летучей мышью и человеком. Это общепринятая (классическая) в настоящее время схема. Однако остаётся неясным, способен ли возбудитель адаптироваться к отсутствующим в исходном организме структурам, учитывая, что ткани летучих мышей не содержат клеточных рецепторов человека, обезьян или представителей иных видов. При отрицательном ответе на этот вопрос появление адаптированного вируса следует признать невозможным.

**Вариант 2.** Заражение людей (или других животных) происходит от летучих мышей, несущих неадаптированный агент.

Этот вариант противоположен первому; постулируется, что АМ происходят в человеческом организме (рис. 2). Вирус адаптируется к окружающим его клеточным структурам, в данном случае – к клеткам человека. Однако в данной модели появляется ряд других проблем, а именно:

1) Адаптированный к клеткам летучих мышей инфекционный агент не может прикрепляться к клеткам человека, проникать в них, реплицироваться и т.д., о чём говорилось ранее. Необходимы те или иные АМ, которые появляются именно в процессе репликации вирусного генома, т.е. после прохождения всех указанных этапов.

2) В данном варианте из неvirulentного возбудителя формируется высокоvirulentный, т.е. летальность его в человеческом организме постепенно нарастает, а не снижается. Однако подобный процесс не наблюдается ни в природе, ни даже в лабораторных экспериментах. Летальность вируса после преодоления межвидового барьера всегда высокая и постепенно уменьшается. Тем не менее в случае вызываемых ВЭ эпидемий понижения virulentности не наблюдается (что, вероятно, является позитивным моментом, поскольку ведёт к эрадикации инфекции), однако это явление часто имеет место при других вирусных заболеваниях.

**Вариант 3.** Заражение людей происходит от животных, у которых часть микропопуляции вирусов имеет АМ.

Данная модель теории преодоления межвидового барьера, объединяющая все черты рассмотренных выше вариантов, привлекательна для многих современных исследователей и основана на теории квазивидов, предложенной ещё в 1982 г. нобелевским лауреатом.

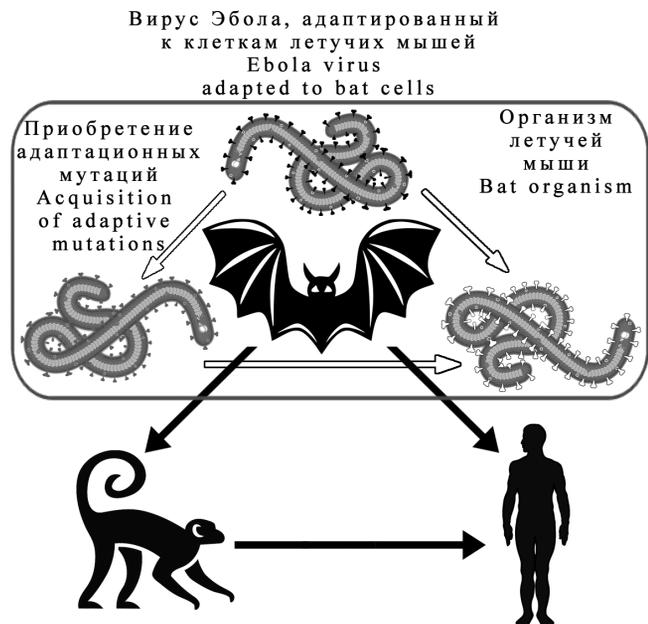


Рис. 1. Предполагаемый путь заражения людей или обезьян от летучих мышей, несущих мутантный вирус.

Fig. 1. The presumable route of infection in humans or monkeys from bats carrying the mutant virus.

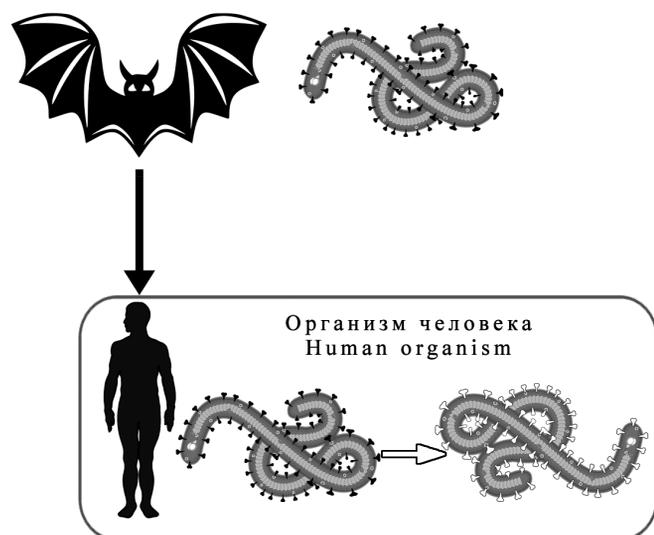
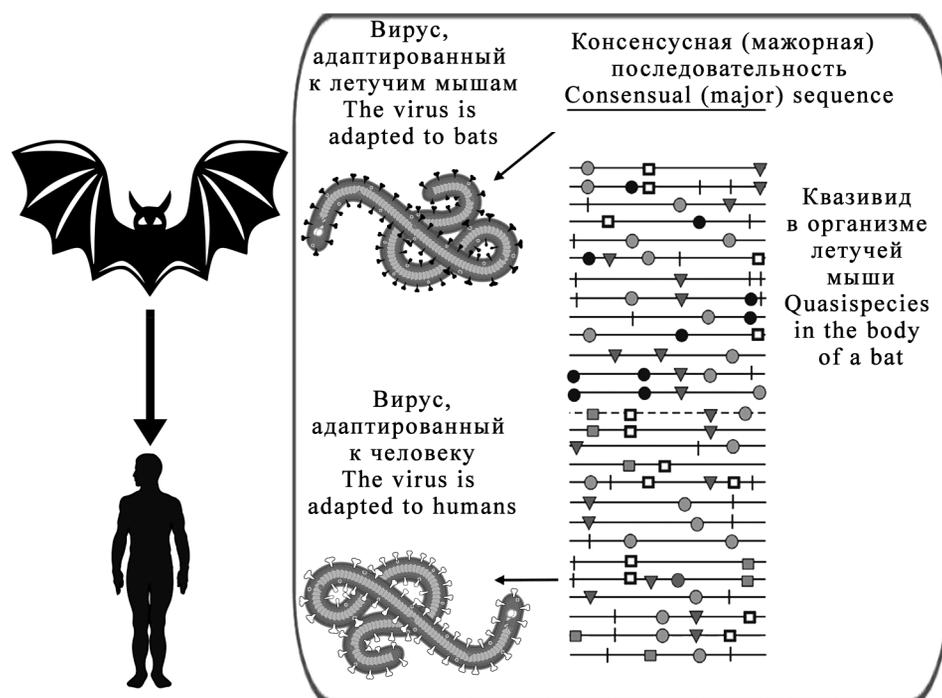


Рис. 2. Предполагаемый путь заражения людей или других животных от летучих мышей, несущих неадаптированный вирус.

Fig. 2. The presumable route of infection in humans or other animals from bats carrying the unadapted virus.



**Рис. 3.** Предполагаемый путь заражения людей от животных, у которых часть микропопуляции вирусов имеет АМ.  
**Fig. 3.** The presumable route of infection in humans from animals with part of the virus micropopulation having AM.

реатом Манфредом Эйгеном [47]. Он сформулировал гипотезу о существовании квазивидов – вирусных микропопуляций. Смысл её заключается в том, что РНК-вирусы в отличие от других организмов (в т.ч. ДНК-содержащих вирусов) очень быстро мутируют и потому существуют не как точные клоны одного вириона, а в виде микропопуляции во многом сходных, но в то же время несколько различающихся по нуклеотидным и белковым последовательностям частиц.

Таким образом, при большой концентрации вирионов и/или частом контакте с источником инфекции в случае присутствия варианта ВЭ, умеренно адаптированного к клеткам человека в результате стохастических мутаций, возможно заражение последнего (рис. 3). При этом вирус получает доступ к размножению, а, следовательно, к приобретению ряда других АМ, высокоспецифичных для репликации в человеческих клетках. Рассматриваемый вариант способен объяснить вышеупомянутые проблемы, а также результат одного экспериментального наблюдения:

- В отличие от первой модели преодоления межвидового барьера при данном механизме вирус в организме летучих мышей не претерпевает адаптации к клеточным структурам человека, но в то же время в составе микропопуляции ВЭ имеются вирионы с низкой приспособленностью (fitness) к ним.

- Логично предположить, что у всех заражённых инфекционный процесс протекает либо в острой (при адаптации возбудителя), либо в инаппарантной форме – при неспособности вируса к репликации или невозможности перехода болезни в острое течение до формирования специфического иммунитета.

При этом в случае развития острой формы инфекции и начала эпидемии происходит постепенное снижение вирулентности.

- Множество людей, не проявлявших симптомов болезни, вызванной ВЭ, имеют АТ к нему. Другими словами, имело место инаппарантное течение процесса, т.е., попав в организм, инфекционный агент вызвал образование АТ, однако заболевание не развилось, так как вирус не приспособлен к клеткам человека.

*Вариант 4.* Заражение людей происходит от различных животных, при этом нулевой пациент не проявляет признаков болезни.

Мы рассматриваем ещё один гипотетический путь преодоления межвидового барьера, при котором инфицирование происходит от различных животных неадаптированным вирусом. При этом в силу отсутствия адаптации патогена к клеткам человека инфекционный процесс может протекать либо временно (транзиторно), либо инаппарантно с возможным переходом – за счёт АМ в геноме вируса – в истинную персистенцию, характеризующуюся вирусывыделением на фоне отсутствия симптомов заболевания. В организме данного индивидуума (нулевого пациента) происходят АМ к соответствующим клеточным структурам. Персистирующий же характер инфекции с выделением возбудителя означает возможность заражения первичного пациента – первого человека с признаками болезни (рис. 4).

В пользу данного варианта свидетельствуют некоторые наблюдения и факты, в частности:

- Возможность приобретения инфекционным процессом характера истинной персистенции (наличие

вирусовыделения при отсутствии симптомов заболевания). Известны случаи, когда после купирования острой формы инфекции вирус сохранялся в организме. Вероятно, появляются генетические варианты ВЭ, способные по неизвестному пока механизму персистировать, при этом инфекционный агент всегда выделяется из иммунопривилегированных органов. Можно предполагать, что изменённые варианты вируса способны проникать в них, однако ввиду отсутствия благоприятных условий для репликации возбудитель со временем полностью исчезает. По-видимому, эпидемиологического значения этот феномен не имеет, однако допустима вероятность заражения с его участием другого индивидуума, от которого может начаться эпидемическая вспышка. Так, в одной из работ показано, что у выживших после БВВЭ людей и обезьян происходит персистенция инфекции [48]. Другие авторы продемонстрировали, что ВЭ может длительное время персистировать в суставной и семенной жидкостях, в передней камере глаза, костном мозге, грудном молоке, поте и других биологических средах организма человека [49]. Обследование 93 выживших после БВВЭ мужчин показало, что через 2–3 мес РНК ВЭ в сперме имели 100%, спустя 4–6 мес – 65%, через 7–9 мес – 26% [49]. Ещё в одном исследовании у 11 (8%) из 137 мужчин через 2 года после болезни в семенной жидкости продолжала детектироваться РНК возбудителя [50].

Примечательно, что БВВЭ может протекать и в хронической форме, когда происходит реактивация болезни у реконвалесцентов [51, 52]. Описано возникновение через несколько месяцев после выздоровления повторной инфекции, с наибольшей вероятностью вызванной персистирующим в организме вирусом. В частности, у однократно перенёвшей заболевание медицинской сестры спустя 9 мес начался менингит, при этом ВЭ определялся в крови и ликворе; у врача через 9 нед от момента выздоровления развился увеит с детекцией инфекционного агента во внутриглазной жидкости [53]. Информация о случаях реинфекции в литературе отсутствует.

• Наличие иммунной прослойки к эболавирусам среди населения эндемичных регионов. Как обсуждалось выше, у проживающих в эндемичных по БВВЭ районах детектируют АТ, специфичные к её возбудителям. Таким образом, нулевой пациент может иметь АТ к вирусу и в случае заражения при наличии способности к передаче инфекции не проявлять признаков заболевания. Наше предположение сводится к тому, что жители этих территорий так или иначе контактируют с животными – носителями эболавирусов: в процессе вылавливания, приготовления их для употребления в пищу, поедания и т.д. В результате у проконтактировавших, во-первых, вырабатываются специфические АТ, которые не позволяют развиваться болезни в нулевом пациенте, а, во-вторых, эболавирусы могут персистировать у имевших контакт с ними, приобретая при этом необходимые АМ. Нулевые пациенты в таком случае выступают в качестве потенциального источника инфекции. Такие носители

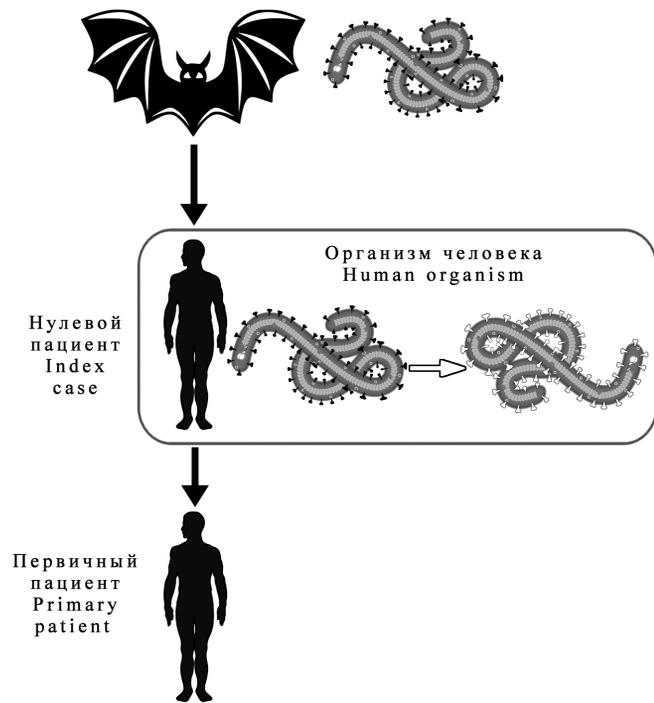


Рис. 4. Предполагаемый путь заражения людей от различных животных без проявления признаков заболевания у нулевого пациента.

Fig. 4. The presumable route of infection in humans from various animals without showing signs of disease in the index case.

могут активно мигрировать из одних регионов в другие (например, во время военных действий, которые нередки для Центральной и Восточной Африки), что может приводить к формированию вспышек болезни в местах с ранее благоприятной эпидемиологической ситуацией по БВВЭ.

### Заключение

Вирусы рода *Ebolavirus* – высокопатогенные инфекционные агенты с весьма значительным эпидемическим потенциалом, поэтому их изучение является одной из приоритетных задач в плане эпидемиологического благополучия человечества. Однако в силу нехватки информации о вариантах эболавирусов (главным образом существующих в естественных условиях) исследование эволюции данной таксономической группы и механизмов преодоления её представителями межвидовых барьеров затруднено. В связи с этим возникают сложности в оценке эпидемического потенциала конкретного варианта патогена, а также в решении вопроса о том, на основе какой разновидности гликопротеина как основного протективного антигена необходимо создавать вакцинные препараты. Следовательно, одним из основных исследовательских направлений должно быть изучение изолятов филовирюсов, выделенных из природных резервуаров. Преодоление межвидового барьера с участием человека, по всей видимости, может достигаться неким единым механизмом, который необходимо более детально исследовать

и сформулировать как комбинацию вышеописанных вариантов. Вероятно, детальное понимание этого пути позволит в дальнейшем прогнозировать появление и распространение вспышек БВВЭ, а также сократить количество эболавирусных эпидемий.

## ЛИТЕРАТУРА

- Sanchez A., Geisbert T.W., Feldmann H. Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006: 1409–48.
- Taylor D.J., Leach R.W., Bruenn J. Filoviruses are ancient and integrated into mammalian genomes. *BMC Evol. Biol.* 2010; 10: 193. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-193>.
- Geisbert T.W. Marburg and Ebola hemorrhagic fever (Filoviruses). In: *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia: Elsevier; 2015: 1995–9.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. Available at: [https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode\\_id=201901569](https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=201901569) (accessed January 14, 2021).
- Bharat T.A., Noda T., Riches J.D., Kraehling V., Kolesnikova L., Becker S., et al. Structural dissection of Ebola virus and its assembly determinants using cryo-electron tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109(11): 4275–80. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120453109>.
- Ascenzi P., Bocedi A., Heptonstall J., Capobianchi M.R., Di Caro A., Mastrangelo E., et al. Ebolavirus and Marburgvirus: insight the Filoviridae family. *Mol. Aspects Med.* 2008; 29(3): 151–85. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2007.09.005>.
- Gutsche I., Desfosses A., Effantin G., Ling W.L., Haupt M., Ruigrok R.W., et al. Structural virology. Near-atomic cryo-EM structure of the helical measles virus nucleocapsid. *Science.* 2015; 348(6235): 704–7. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5137>.
- Beniac D.R., Booth T.F. Structure of the Ebola virus glycoprotein spike within the virion envelope at 11 Å resolution. *Sci. Rep.* 2017; 7: 46374. <https://doi.org/10.1038/srep46374>.
- Wong G., He S., Leung A., Cao W., Bi Y., Zhang Z., et al. Naturally occurring single mutations in Ebola virus observably impact infectivity. *J. Virol.* 2018; 93(1): e01098-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01098-18>.
- Ruedas J.B., Arnold C.E., Palacios G., Connor J.H. Growth-adaptive mutations in the Ebola virus Makona glycoprotein alter different steps in the virus entry pathway. *J. Virol.* 2018; 92(19): e00820-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00820-18>.
- Ruedas J.B., Ladner J.T., Ettinger C.R., Gummuluru S., Palacios G., Connor J.H. Spontaneous mutation at amino acid 544 of the Ebola virus glycoprotein potentiates virus entry and selection in tissue culture. *J. Virol.* 2017; 91(15): e00392-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00392-17>.
- Kurosaki Y., Ueda M.T., Nakano Y., Yasuda J., Koyanagi Y., Sato K., et al. Different effects of two mutations on the infectivity of Ebola virus glycoprotein in nine mammalian species. *J. Gen. Virol.* 2018; 99(2): 181–6. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000999>.
- Diehl W.E., Lin A.E., Grubaugh N.D., Carvalho L.M., Kim K., Kyawe P.P., et al. Ebola virus glycoprotein with increased infectivity dominated the 2013–2016 epidemic. *Cell.* 2016; 167(4): 1088–98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.014>.
- Ueda M.T., Kurosaki Y., Izumi T., Nakano Y., Oloniniyi O.K., Yasuda J., et al. Functional mutations in spike glycoprotein of Zaire ebolavirus associated with an increase in infection efficiency. *Genes Cells.* 2017; 22(2): 148–59. <https://doi.org/10.1111/gtc.12463>.
- Wang M.K., Lim S.Y., Lee S.M., Cunningham J.M. Biochemical basis for increased activity of Ebola glycoprotein in the 2013–16 epidemic. *Cell Host Microbe.* 2017; 21(3): 367–75. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.02.002>.
- Dietzel E., Schudt G., Krähling V., Matrosovich M., Becker S. Functional characterization of adaptive mutations during the West African Ebola virus outbreak. *J. Virol.* 2017; 91(2): e01913-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01913-16>.
- Urbanowicz R.A., McClure C.P., Sakuntabhai A., Sall A.A., Kobinger G., Müller M.A., et al. Human adaptation of Ebola virus during the West African outbreak. *Cell.* 2016; 167(4): 1079–87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.013>.
- WHO. Ebola Situation Report-21; 2015. Available at: <https://apps.who.int/ebola/current-situation/ebola-situation-report-21-october-2015> (accessed January 14, 2021).
- CDC. Ebola virus disease distribution map: Cases of Ebola virus disease in Africa since 1976. Available at: <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/history/distribution-map.html> (accessed January 14, 2021).
- Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. Report of a WHO/International Study Team. *Bull. World Health Organ.* 1978; 56(2): 247–70.
- Report of an International Commission. Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976. *Bull. World Health Organ.* 1978; 56(2): 271–93.
- Baize S., Pannetier D., Oestereich L., Rieger T., Koivogui L., Magassouba N., et al. Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371(15): 1418–25. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1404505>.
- CDC. 2014–2016 Ebola Outbreak in West Africa. Available at: <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/history/2014-2016-outbreak/index.html> (accessed January 14, 2021).
- Marí Saéz A., Weiss S., Nowak K., Lapeyre V., Zimmermann F., Dux A., et al. Investigating the zoonotic origin of the West African Ebola epidemic. *EMBO Mol. Med.* 2015; 7(1): 17–23. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404792>.
- Warren C.J., Sawyer S.L. How host genetics dictates successful viral zoonosis. *PLoS Biol.* 2019; 17(4): e3000217. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000217>.
- Edenborough K.M., Bokelmann M., Lander A., Couacy-Hymann E., Lechner J., Drechsel O., et al. Dendritic cells generated from Mops condylurus, a likely filovirus reservoir host, are susceptible to and activated by Zaire ebolavirus infection. *Front. Immunol.* 2019; 10: 2414. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02414>.
- Guedj J., Piorkowski G., Jacquot F., Madelain V., Nguyen T.H.T., Rodallec A., et al. Antiviral efficacy of favipiravir against Ebola virus: A translational study in cynomolgus macaques. *PLoS Med.* 2018; 15(3): e1002535. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002535>.
- Heymann D.L., Weisfeld J.S., Webb P.A., Johnson K.M., Cairns T., Berquist H. Ebola hemorrhagic fever: Tandala, Zaire, 1977–1978 external icon. *J. Infect. Dis.* 1980; 142(3): 372–6. <https://doi.org/10.1093/infdis/142.3.372>.
- Meunier D.M., Johnson E.D., Gonzalez J.P., Georges-Courbot M.C., Madelon M.C., Georges A.J. Current serologic data on viral hemorrhagic fevers in the Central African Republic. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales.* 1987; 80(1): 51–61 (in French).
- Nkoghe D., Padilla C., Becquart P., Wauquier N., Moussavou G., Akué J.P., et al. Risk factors for Zaire ebolavirus-specific IgG in rural gabonese populations. *J. Infect. Dis.* 2011; 204 (Suppl. 3): S768–75. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir344>.
- Busico K.M., Marshall K.L., Ksiazek T.G., Roels T.H., Fleerackers Y., Feldmann H., et al. Prevalence of IgG antibodies to Ebola virus in individuals during an Ebola outbreak, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J. Infect. Dis.* 1999; 179(Suppl. 1): S102–7. <https://doi.org/10.1086/514309>.
- Becquart P., Wauquier N., Mahlaköiv T., Nkoghe D., Padilla C., Souris M., et al. High prevalence of both humoral and cellular immunity to Zaire ebolavirus among rural populations in Gabon. *PLoS One.* 2010; 5(2): e9126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009126>.
- Van der Groen G., Pattyn S.R. Measurement of antibodies to Ebola virus in human sera from N.W.-Zaire. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 1979; 59(1): 87–92.
- Allela L., Bourry O., Pouillot R., Délicat A., Yaba P., Kumulungui B., et al. Ebola virus antibody prevalence in dogs and human risk. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11(3): 385–90. <https://doi.org/10.3201/eid1103.040981>.
- Heffernan R.T., Pambo B., Hatchett R.J., Leman P.A., Swanepoel R., Ryder R.W. Low seroprevalence of IgG antibodies to Ebola virus in an epidemic zone: Ogooué-Ivindo region, Northeastern Gabon, 1997. *J. Infect. Dis.* 2005; 191(6): 964–8. <https://doi.org/10.1086/427994>.
- Lahm S.A., Kombila M., Swanepoel R., Barnes R.F.W. Morbidity and mortality of wild animals in relation to outbreaks of Ebola haemorrhagic fever in Gabon, 1994–2003. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2007; 101(1): 64–78. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.07.002>.
- Georges A.J., Leroy E.M., Renaut A.A., Benissan C.T., Nabias R.J., Ngoc M.T., et al. Ebola hemorrhagic fever outbreaks in Gabon, 1994–1997: epidemiologic and health control issues. *J. Infect. Dis.* 1999; 179(Suppl. 1): S65–75. <https://doi.org/10.1086/514290>.

38. Baron R.C., McCormick J.B., Zubeir O.A. Ebola virus disease in southern Sudan: hospital dissemination and intrafamilial spread. *Bull. World Health Organ.* 1983; 61(6): 997–1003.
39. Mathiot C.C., Georges A.J., Fontenille D., Coulanges P. Antibodies to haemorrhagic fever viruses in Madagascar populations. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1989; 83(3): 407–9. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(89\)90519-1](https://doi.org/10.1016/0035-9203(89)90519-1).
40. Van der Waals F.W., Pomeroy K.L., Goudsmit J., Asher D.M., Gajdusek D.C. Hemorrhagic fever virus infections in an isolated rainforest area of Central Liberia. Limitations of the indirect immunofluorescence slide test for antibody screening in Africa. *Trop. Geogr. Med.* 1986; 38(3): 209–14.
41. Bouree P., Bergmann J.F. Ebola virus infection in man: a serological and epidemiological survey in the Cameroons. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1983; 32(6): 1465–6. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1983.32.1465>.
42. Paix M.A., Poveda J.D., Malvy D., Bailly C., Merlin M., Fleury H.J. Serological study of the virus responsible for hemorrhagic fever in an urban population of Cameroon. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales.* 1988; 81(4): 679–82 (in French).
43. Tomori O., Fabiyi A., Sorungbe A., Smith A., McCormick J.B. Viral hemorrhagic fever antibodies in Nigerian populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1988; 38(2): 407–10. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1988.38.407>.
44. Becker S., Feldmann H., Will C., Slenczka W. Evidence for occurrence of filovirus antibodies in humans and imported monkeys: do subclinical filovirus infections occur worldwide? *Med. Microbiol. Immunol.* 1992; 181(1): 43–55. <https://doi.org/10.1007/BF00193395>.
45. Johnson B.K., Ocheng D., Gichogo A., Okiro M., Libondo D., Tukey P.M., et al. Antibodies against haemorrhagic fever viruses in Kenya populations. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1983; 77(5): 731–3. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(83\)90216-x](https://doi.org/10.1016/0035-9203(83)90216-x).
46. Nyakaruhuka L., Schafer I.J., Balinandi S., Mulei S., Tumusiime A., Kyondo J., et al. A retrospective cohort investigation of seroprevalence of Marburg virus and ebolaviruses in two different ecological zones in Uganda. *BMC Infect. Dis.* 2020; 20(1): 461. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05187-0>.
47. Эйген М., Шустер П. Периодизация. Принципы самоорганизации макромолекул. Пер. с англ. М.: Мир; 1982.
48. Zeng X., Blancett C.D., Koistinen K.A., Schellhase C.W., Bearss J.J., Radoshitzky S.R., et al. Identification and pathological characterization of persistent asymptomatic Ebola virus infection in rhesus monkeys. *Nat. Microbiol.* 2017; 2: 17113. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.113>.
49. Deen G.F., Broutet N., Xu W., Knust B., Sesay F.R., McDonald S.L.R., et al. Ebola RNA persistence in semen of Ebola virus disease survivors – final report. *N. Engl. J. Med.* 2017; 377(15): 1428–37. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1511410>.
50. Fischer W.A., Brown J., Wohl D.A., Loftis A.J., Tozay S., Reeves E., et al. Ebola virus ribonucleic acid detection in Semen more than two years after resolution of acute Ebola virus infection. *Open Forum Infect. Dis.* 2017; 4(3): ofx155. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx155>.
51. Forrester J.V. Ebola virus and persistent chronic infection: when does replication cease? *Ann. Transl. Med.* 2018; 6(Suppl. 1): S39. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.09.60>.
52. Varkey J.B., Shantha J.G., Crozier I., Kraft C.S., Lyon G.M., Mehta A.K., et al. Persistence of Ebola virus in ocular fluid during convalescence. *N. Engl. J. Med.* 2015; 372(25): 2423–7. <https://doi.org/10.1038/nri2940>.
53. MacIntyre C.R., Chughtai A.A. Recurrence and reinfection – a new paradigm for the management of Ebola virus disease. *Int. J. Infect. Dis.* 2016; 43: 58–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.12.011>.
5. Bharat T.A., Noda T., Riches J.D., Kraehling V., Kolesnikova L., Becker S., et al. Structural dissection of Ebola virus and its assembly determinants using cryo-electron tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012; 109(11): 4275–80. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120453109>.
6. Ascenzi P., Bocedi A., Heptonstall J., Capobianchi M.R., Di Caro A., Mastrangelo E., et al. Ebolavirus and Marburgvirus: insight the Filoviridae family. *Mol. Aspects Med.* 2008; 29(3): 151–85. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2007.09.005>.
7. Gutsche I., Desfosses A., Effantin G., Ling W.L., Haupt M., Ruigrok R.W., et al. Structural virology. Near-atomic cryo-EM structure of the helical measles virus nucleocapsid. *Science.* 2015; 348(6235): 704–7. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5137>.
8. Beniac D.R., Booth T.F. Structure of the Ebola virus glycoprotein spike within the virion envelope at 11 Å resolution. *Sci. Rep.* 2017; 7: 46374. <https://doi.org/10.1038/srep46374>.
9. Wong G., He S., Leung A., Cao W., Bi Y., Zhang Z., et al. Naturally occurring single mutations in Ebola virus observably impact infectivity. *J. Virol.* 2018; 93(1): e01098-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01098-18>.
10. Ruedas J.B., Arnold C.E., Palacios G., Connor J.H. Growth-adaptive mutations in the Ebola virus Makona glycoprotein alter different steps in the virus entry pathway. *J. Virol.* 2018; 92(19): e00820-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00820-18>.
11. Ruedas J.B., Ladner J.T., Ettinger C.R., Gummuluru S., Palacios G., Connor J.H. Spontaneous mutation at amino acid 544 of the Ebola virus glycoprotein potentiates virus entry and selection in tissue culture. *J. Virol.* 2017; 91(15): e00392-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00392-17>.
12. Kurosaki Y., Ueda M.T., Nakano Y., Yasuda J., Koyanagi Y., Sato K., et al. Different effects of two mutations on the infectivity of Ebola virus glycoprotein in nine mammalian species. *J. Gen. Virol.* 2018; 99(2): 181–6. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000999>.
13. Diehl W.E., Lin A.E., Grubaugh N.D., Carvalho L.M., Kim K., Kyawe P.P., et al. Ebola virus glycoprotein with increased infectivity dominated the 2013–2016 epidemic. *Cell.* 2016; 167(4): 1088–98. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.014>.
14. Ueda M.T., Kurosaki Y., Izumi T., Nakano Y., Oloniniyi O.K., Yasuda J., et al. Functional mutations in spike glycoprotein of Zaire ebolavirus associated with an increase in infection efficiency. *Genes Cells.* 2017; 22(2): 148–59. <https://doi.org/10.1111/gtc.12463>.
15. Wang M.K., Lim S.Y., Lee S.M., Cunningham J.M. Biochemical basis for increased activity of Ebola glycoprotein in the 2013–16 epidemic. *Cell Host Microbe.* 2017; 21(3): 367–75. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.02.002>.
16. Dietzel E., Schudt G., Krähling V., Matrosovich M., Becker S. Functional characterization of adaptive mutations during the West African Ebola virus outbreak. *J. Virol.* 2017; 91(2): e01913-16. <https://doi.org/10.1128/JVI.01913-16>.
17. Urbanowicz R.A., McClure C.P., Sakuntabhai A., Sall A.A., Babin G., Müller M.A., et al. Human adaptation of Ebola virus during the West African outbreak. *Cell.* 2016; 167(4): 1079–87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.013>.
18. WHO. Ebola Situation Report-21; 2015. Available at: <https://apps.who.int/ebola/current-situation/ebola-situation-report-21-october-2015> (accessed January 14, 2021).
19. CDC. Ebola virus disease distribution map: Cases of Ebola virus disease in Africa since 1976. Available at: <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/history/distribution-map.html> (accessed January 14, 2021).
20. Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. Report of a WHO/International Study Team. *Bull. World Health Organ.* 1978; 56(2): 247–70.
21. Report of an International Commission. Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976. *Bull. World Health Organ.* 1978; 56(2): 271–93.
22. Baize S., Pannetier D., Oestereich L., Rieger T., Koivogui L., Magassouba N., et al. Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371(15): 1418–25. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1404505>.
23. CDC. 2014–2016 Ebola Outbreak in West Africa. Available at: <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/history/2014-2016-outbreak/index.html> (accessed January 14, 2021).
24. Mari Saéz A., Weiss S., Nowak K., Lapeyre V., Zimmermann F., Dux A., et al. Investigating the zoonotic origin of the West African Ebola epidemic. *EMBO Mol. Med.* 2015; 7(1): 17–23. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404792>.
25. Warren C.J., Sawyer S.L. How host genetics dictates successful viral zoonosis. *PLoS Biol.* 2019; 17(4): e3000217. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000217>.

## REFERENCES

1. Sanchez A., Geisbert T.W., Feldmann H. Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. In: Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006: 1409–48.
2. Taylor D.J., Leach R.W., Bruenn J. Filoviruses are ancient and integrated into mammalian genomes. *BMC Evol. Biol.* 2010; 10: 193. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-193>
3. Geisbert T.W. Marburg and Ebola hemorrhagic fever (Filoviruses). In: *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia: Elsevier; 2015: 1995–9.
4. International Committee on Taxonomy of Viruses. Available at: [https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode\\_id=201901569](https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=201901569) (accessed January 14, 2021).

26. Edenborough K.M., Bokelmann M., Lander A., Couacy-Hymann E., Lechner J., Drechsel O., et al. Dendritic cells generated from Mops condylurus, a likely filovirus reservoir host, are susceptible to and activated by Zaire ebolavirus infection. *Front. Immunol.* 2019; 10: 2414. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02414>.
27. Guedj J., Piorkowski G., Jacquot F., Madelain V., Nguyen T.H.T., Rodallec A., et al. Antiviral efficacy of favipiravir against Ebola virus: A translational study in cynomolgus macaques. *PLoS Med.* 2018; 15(3): e1002535. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002535>.
28. Heymann D.L., Weisfeld J.S., Webb P.A., Johnson K.M., Cairns T., Berquist H. Ebola hemorrhagic fever: Tandala, Zaire, 1977–1978 external icon. *J. Infect. Dis.* 1980; 142(3): 372–6. <https://doi.org/10.1093/infdis/142.3.372>.
29. Meunier D.M., Johnson E.D., Gonzalez J.P., Georges-Courbot M.C., Madelon M.C., Georges A.J. Current serologic data on viral hemorrhagic fevers in the Central African Republic. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales.* 1987; 80(1): 51–61 (in French).
30. Nkoghe D., Padilla C., Becquart P., Wauquier N., Moussavou G., Akué J.P., et al. Risk factors for Zaire ebolavirus-specific IgG in rural gabonese populations. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(Suppl. 3): S768–75. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir344>.
31. Busico K.M., Marshall K.L., Ksiazek T.G., Roels T.H., Fleerackers Y., Feldmann H., et al. Prevalence of IgG antibodies to Ebola virus in individuals during an Ebola outbreak, Democratic Republic of the Congo, 1995. *J. Infect. Dis.* 1999; 179(Suppl. 1): S102–7. <https://doi.org/10.1086/514309>.
32. Becquart P., Wauquier N., Mahlaköv T., Nkoghe D., Padilla C., Souris M., et al. High prevalence of both humoral and cellular immunity to Zaire ebolavirus among rural populations in Gabon. *PLoS One.* 2010; 5(2): e9126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009126>.
33. Van der Groen G., Pattyn S.R. Measurement of antibodies to Ebola virus in human sera from N.W.-Zaire. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 1979; 59(1): 87–92.
34. Allela L., Bourry O., Pouillot R., Délicat A., Yaba P., Kumulungui B., et al. Ebola virus antibody prevalence in dogs and human risk. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11(3): 385–90. <https://doi.org/10.3201/eid1103.040981>.
35. Heffernan R.T., Pambo B., Hatchett R.J., Leman P.A., Swanepoel R., Ryder R.W. Low seroprevalence of IgG antibodies to Ebola virus in an epidemic zone: Ogooué-Ivindo region, Northeastern Gabon, 1997. *J. Infect. Dis.* 2005; 191(6): 964–8. <https://doi.org/10.1086/427994>.
36. Lahm S.A., Kombila M., Swanepoel R., Barnes R.F.W. Morbidity and mortality of wild animals in relation to outbreaks of Ebola haemorrhagic fever in Gabon, 1994–2003. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2007; 101(1): 64–78. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.07.002>.
37. Georges A.J., Leroy E.M., Renaut A.A., Benissan C.T., Nabias R.J., Ngoc M.T., et al. Ebola hemorrhagic fever outbreaks in Gabon, 1994–1997: epidemiologic and health control issues. *J. Infect. Dis.* 1999; 179(Suppl. 1): S65–75. <https://doi.org/10.1086/514290>.
38. Baron R.C., McCormick J.B., Zubeir O.A. Ebola virus disease in southern Sudan: hospital dissemination and intrafamilial spread. *Bull. World Health Organ.* 1983; 61(6): 997–1003.
39. Mathiot C.C., Georges A.J., Fontenille D., Coulanges P. Antibodies to haemorrhagic fever viruses in Madagascar populations. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1989; 83(3): 407–9. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(89\)90519-1](https://doi.org/10.1016/0035-9203(89)90519-1).
40. Van der Waals F.W., Pomeroy K.L., Goudsmit J., Asher D.M., Gajdusek D.C. Hemorrhagic fever virus infections in an isolated rainforest area of Central Liberia. Limitations of the indirect immunofluorescence slide test for antibody screening in Africa. *Trop. Geogr. Med.* 1986; 38(3): 209–14.
41. Bouree P., Bergmann J.F. Ebola virus infection in man: a serological and epidemiological survey in the Cameroons. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1983; 32(6): 1465–6. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1983.32.1465>.
42. Paix M.A., Poveda J.D., Malvy D., Bailly C., Merlin M., Fleury H.J. Serological study of the virus responsible for hemorrhagic fever in an urban population of Cameroon. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales.* 1988; 81(4): 679–82 (in French).
43. Tomori O., Fabiyi A., Sorungbe A., Smith A., McCormick J.B. Viral hemorrhagic fever antibodies in Nigerian populations. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1988; 38(2): 407–10. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1988.38.407>.
44. Becker S., Feldmann H., Will C., Slenczka W. Evidence for occurrence of filovirus antibodies in humans and imported monkeys: do subclinical filovirus infections occur worldwide? *Med. Microbiol. Immunol.* 1992; 181(1): 43–55. <https://doi.org/10.1007/BF00193395>.
45. Johnson B.K., Ocheng D., Gichogo A., Okiro M., Libondo D., Tukei P.M., et al. Antibodies against haemorrhagic fever viruses in Kenya populations. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1983; 77(5): 731–3. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(83\)90216-x](https://doi.org/10.1016/0035-9203(83)90216-x).
46. Nyakarahuka L., Schafer I.J., Balinandi S., Mulei S., Tumusiime A., Kyondo J., et al. A retrospective cohort investigation of seroprevalence of Marburg virus and ebolaviruses in two different ecological zones in Uganda. *BMC Infect. Dis.* 2020; 20(1): 461. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05187-0>.
47. Eigen M., Schuster P. The Hypercycle. A Principle of Natural Self-Organization. Springer-Verlag; 1979.
48. Zeng X., Blancett C.D., Koistinen K.A., Schellhase C.W., Bearss J.J., Radoshitzky S.R., et al. Identification and pathological characterization of persistent asymptomatic Ebola virus infection in rhesus monkeys. *Nat. Microbiol.* 2017; 2: 17113. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.113>.
49. Deen G.F., Broutet N., Xu W., Knust B., Sesay F.R., McDonald S.L.R., et al. Ebola RNA persistence in semen of Ebola virus disease survivors – final report. *N. Engl. J. Med.* 2017; 377(15): 1428–37. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1511410>.
50. Fischer W.A., Brown J., Wohl D.A., Loftis A.J., Tozay S., Reeves E., et al. Ebola virus ribonucleic acid detection in Semen more than two years after resolution of acute Ebola virus infection. *Open Forum Infect. Dis.* 2017; 4(3): ofx155. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofx155>.
51. Forrester J.V. Ebola virus and persistent chronic infection: when does replication cease? *Ann. Transl. Med.* 2018; 6(Suppl. 1): S39. <https://doi.org/10.21037/atm.2018.09.60>.
52. Varkey J.B., Shantha J.G., Crozier I., Kraft C.S., Lyon G.M., Mehta A.K., et al. Persistence of Ebola virus in ocular fluid during convalescence. *N. Engl. J. Med.* 2015; 372(25): 2423–7. <https://doi.org/10.1038/nri2940>.
53. MacIntyre C.R., Chughtai A.A. Recurrence and reinfection – a new paradigm for the management of Ebola virus disease. *Int. J. Infect. Dis.* 2016; 43: 58–61. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.12.011>.

## Экспресс-диагностика новой коронавирусной инфекции с помощью реакции петлевой изотермической амплификации

Хафизов К.Ф., Петров В.В., Красовитов К.В., Золкина М.В., Акимкин В.Г.

ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 111123, Москва, Россия

В настоящем обзоре представлены основные принципы применения реакции петлевой изотермической амплификации (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) для экспресс-диагностики коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2. Кратко описаны базовые технические детали метода, наиболее популярные способы специфической и неспецифической детекции продуктов амплификации, обсуждены первые опубликованные работы по использованию рассматриваемой технологии для выявления фрагментов молекулы нуклеиновой кислоты вируса SARS-CoV-2, в том числе разрабатываемые в Российской Федерации. Для доступных тестов на базе LAMP перечислены основные аналитические характеристики наборов, которые нередко сравнимы с параметрами тест-систем на основе метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), а в ряде случаев превосходят их. Обсуждены преимущества и ограничения этого подхода в сравнении с другими способами молекулярной диагностики (в первую очередь ОТ-ПЦР), а также перспективы развития технологии для выявления возбудителей других инфекций.

**Ключевые слова:** диагностика; коронавирусная инфекция; петлевая изотермическая амплификация; полимеразная цепная реакция; SARS-CoV-2

**Для цитирования:** Хафизов К.Ф., Петров В.В., Красовитов К.В., Золкина М.В., Акимкин В.Г. Экспресс-диагностика новой коронавирусной инфекции с помощью реакции петлевой изотермической амплификации. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(1): 17-28. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-42>

**Для корреспонденции:** Хафизов Камилль Фаридович, канд. биол. наук, руководитель научной группы разработки новых методов диагностики на основе технологий секвенирования следующего поколения отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии, ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 111123, Москва, Россия. E-mail: [kkhafizov@gmail.com](mailto:kkhafizov@gmail.com)

**Участие авторов:** Хафизов К.Ф. – написание текста, сбор и обработка материалов, подготовка иллюстративного материала; Петров В.В. – написание текста, экспериментальная проверка метода; Красовитов К.В. – написание текста, экспериментальная проверка метода; Золкина М.В. – написание и общая редакция текста; Акимкин В.Г. – резюме, общая редакция текста, научное редактирование.

**Финансирование.** Работа не имела целевого финансирования.

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

Поступила 27.01.2021  
Принята в печать 18.02.2021

## Rapid diagnostics of novel coronavirus infection by loop-mediated isothermal amplification

Kamil F. Khafizov, Vadim V. Petrov, Kirill V. Krasovitov, Maria V. Zolkina, Vasilii G. Akimkin

FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), Moscow, 111123, Russia

This review presents the basic principles of application of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction for the rapid diagnosis of coronavirus infection caused by SARS-CoV-2. The basic technical details of the method, and the most popular approaches of specific and non-specific detection of amplification products are briefly described. We also discuss the first published works on the use of the method for the detection of the nucleic acid of the SARS-CoV-2 virus, including those being developed in the Russian Federation. For commercially available and published LAMP-based assays, the main analytical characteristics of the tests are listed, which are often comparable to those based on the method of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and in some cases are even superior. The advantages and limitations of this promising methodology in comparison to other methods of molecular diagnostics, primarily RT-PCR, are discussed, as well as the prospects for the development of technology for the detection of other infectious agents.

**Key words:** diagnostics; coronavirus infection; loop-mediated isothermal amplification; polymerase chain reaction; SARS-CoV-2

**For citation:** Khafizov K.F., Petrov V.V., Krasovitev K.V., Zolkina M.V., Akimkin V.G. Rapid diagnostics of novel coronavirus infection by loop-mediated isothermal amplification. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(1): 17-28 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-42>

**For correspondence:** Khafizov Kamil Faridovich, Ph.D. (Biol.), Head of the Scientific Group for the Development of New Diagnostic Methods of the Department for Molecular Diagnostics and Epidemiology, FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), Moscow, 111123, Russia. E-mail: [kkhafizov@gmail.com](mailto:kkhafizov@gmail.com)

**Information about the authors:**

Khafizov K.F., <http://orcid.org/0000-0001-5524-0296>

Petrov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-3503-2366>

Krasovitev K.V., <https://orcid.org/0000-0001-7237-1810>

Zolkina M.V., <https://orcid.org/0000-0002-2973-9947>

Akimkin V.G., <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

**Contribution:** Khafizov K.F. – writing of the text, collection and processing of the materials, preparation of the illustrative material; Petrov V.V. – writing of the text, experimental verification of the method; Krasovitev K.V. – writing of the text, experimental verification of the method; Zolkina M.V. – writing of the text, general edition; Akimkin V.G. – scientific editing, resume, general edition.

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

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

Received 27 January 2021

Accepted 18 February 2021

## 1. Введение

В декабре 2019 г. в Ухане (Китайская Народная Республика, КНР) произошла вспышка нового заболевания, вызванного вирусом, получившим впоследствии наименование «коронавирус тяжёлого острого респираторного синдрома 2» (Severe Acute Respiratory Syndrome CoV 2, SARS-CoV-2, 2019-nCoV). Этот возбудитель вызывает так называемую «новую» коронавирусную инфекцию (novel Coronavirus Disease 2019, COVID-19) – болезнь, характер распространения которой с марта 2020 г. классифицируется Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) как пандемия (<https://www.who.int/ru/director-general/speeches-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>). Вирус SARS-CoV-2 относится к роду *Betacoronavirus* семейства *Coronaviridae*, представители которого поражают в основном млекопитающих [1]. Вирусный геном представлен одноцепочечной РНК положительной полярности длиной почти 30 тыс. нуклеотидных пар (н.п.) оснований с 14 открытыми рамками считывания, кодирующими 27 белков [2]. Симптомы инфекции сходны с проявлениями некоторых других респираторных заболеваний, но у значительной доли пациентов болезнь может протекать бессимптомно в течение достаточно продолжительного времени [3]. Поэтому отслеживание распространения нового патогена – крайне сложная задача, особенно с учётом того, что он достаточно легко передаётся от больного незаражённым. По состоянию на январь 2021 г. согласно данным Ресурсного Центра по коронавирусу им. Джона Хопкинса (John Hopkins Coronavirus Resource Center, <https://coronavirus.jhu.edu/>) зарегистрировано свыше 100 млн подтверждённых случаев COVID-19 и более 2 млн смертей, что свидетельствует о скорости распространения вируса и важности мер по его сдерживанию. Поскольку в настоящее время средств для эффективного лечения новой коронавирусной инфекции не существует,

а массовая вакцинация в разных странах находится на начальной стадии и длительность сохранения приобретённого иммунитета достоверно неизвестна, имеется острая необходимость в чувствительном и по возможности недорогом методе экспресс-диагностики с хорошей воспроизводимостью результатов. Для решения этой проблемы желательно иметь быстрый, простой и одновременно эффективный в эксплуатации набор для тестирования. С помощью подобного теста инфицированные пациенты могут быть идентифицированы на ранней стадии, что позволит ограничить социальные контакты и усилить врачебный контроль за их состоянием, в то время как здоровые люди смогут продолжать вести обычную жизнь.

Основной молекулярной диагностики инфекции, вызванной SARS-CoV-2, в настоящее время является применение полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [4, 5]. Такое исследование обнаруживает присутствие вирусных нуклеиновых кислот в образцах мазков из носоглотки с очень высокими показателями чувствительности и специфичности. ВОЗ и Центры по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) одобрили тесты на основе ОТ-ПЦР в качестве «золотого стандарта» для обнаружения возбудителя COVID-19 [6–8]. В Российской Федерации Росздравнадзором на данный момент зарегистрировано более 40 тест-систем отечественных производителей на основе ПЦР. Однако при всех очевидных преимуществах у данного способа есть несколько недостатков. В частности, реакция ОТ-ПЦР требует дорогостоящего лабораторного оборудования: цена большинства амплификаторов с возможностью детекции в реальном времени превышает 2 млн руб., что ограничивает их использование в небольших диагностических учреждениях. Кроме того, для проведения исследования требуется квалифицированный персонал, а вся процедура тестирования занимает несколько часов без учёта времени доставки биоматериала

в лабораторию. Эти ограничения усугубляются стремительным распространением пандемии, поскольку ОТ-ПЦР не предполагает возможности быстрого и массового скрининга на местах [9]. Другие широко используемые методы диагностики COVID-19 – серологические тесты, которые выявляют антитела или антигены, ассоциированные с коронавирусной инфекцией. Они просты в применении, дают быстрые результаты и при этом не требуют существенных затрат. Однако такие системы не обладают достаточной точностью, чтобы быть надёжным подспорьем в выявлении SARS-CoV-2 из-за низкой чувствительности и невысокой специфичности (<https://open.fda.gov/apis/device/covid19serology/>). Кроме того, подобные тесты практически бесполезны на самых ранних стадиях болезни [10], когда исключительно важно выявить и изолировать одного или нескольких больных во избежание массового заражения. Наконец, разработки диагностикумов на основе технологий высокопроизводительного секвенирования [11], потенциально способных выявлять все известные вирусные патогены и потому крайне востребованных во время вспышек инфекционных заболеваний неясной этиологии, пока находятся в начальной стадии и не могут быть использованы на практике во время пандемий.

Таким образом, имеется насущная необходимость в новых эффективных решениях для диагностики новой коронавирусной инфекции. Один из подходов – группа технологий на основе изотермической амплификации, такие как амплификация по принципу «катящегося кольца» (Rolling Circle Replication, RCA) [12], реакция транскрипционной амплификации (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, NASBA) [13], рекомбиназная полимеразная амплификация (Recombinase Polymerase Amplification, RPA) [14], хеликазозависимая (Helicase-Dependent DNA Amplification, HDA) [15] и петлевая изотермическая амплификация (Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP) [16]. Последняя вполне обоснованно считается наиболее перспективной разновидностью изотермической амплификации, что отражено в наиболее частом её упоминании в научных публикациях по сравнению с остальными. Технология LAMP похожа на обычные методики на основе ПЦР за исключением того, что амплификационный процесс протекает при постоянной температуре, что в принципе позволяет отказаться от использования дорогостоящего термоциклера, заменив его обычным термостатом. Такой способ амплификации делает выявление ДНК/РНК возбудителя в клиническом материале более быстрым и простым в использовании по сравнению с тестами на основе ПЦР, что подробно обсуждено, в частности, в недавнем обзоре [17]. Другие преимущества LAMP включают широкий диапазон доступных значений pH и температуры, которые являются приемлемыми для экспериментов [18], теоретическую возможность использовать образцы без этапа выделения нуклеиновых кислот [19] и гибкость процедур детекции получаемого продукта при сохранении специфичности и чувствительности, примерно

равных таковым у ПЦР-систем или иногда даже превосходящих их [20, 21]. Например, специфичность тестов на базе LAMP может быть во много раз выше, чем в случае ПЦР, так как необходимость одновременного отжига на матрице ДНК сразу нескольких пар праймеров в нужном порядке (см. ниже детальное описание метода) обуславливает исключительно низкую вероятность случайной амплификации нецелевого фрагмента генома.

Настоящий обзор имеет целью представить описание базовых принципов обнаружения нуклеиновых кислот с помощью петлевой изотермической амплификации и обобщение различных технологий метода, которые были разработаны для использования в диагностике COVID-19. По мнению авторов, он сможет предоставить общую информацию исследователям, заинтересованным в создании основанных на принципе LAMP методик обнаружения SARS-CoV-2 и других патогенов, а также дать более чёткое представление о потенциале использования рассматриваемой разновидности амплификации в процессе контроля текущей пандемии и потенциальных угроз в будущем.

## 2. Описание метода петлевой изотермической амплификации (LAMP)

LAMP – метод амплификации нуклеиновых кислот, известный с 2000 г. [16], который в настоящее время занимает всё большее место в диагностике инфекционных заболеваний, что во многом вызвано пандемией COVID-19 и необходимостью масштабного скрининга населения в максимально сжатые сроки. Этот процесс происходит при постоянной температуре (обычно 60–65 °C), что исключает необходимость использования термоциклера (как в случае традиционной ПЦР); кроме того, реакция устойчива к действию многих ингибиторов ПЦР [18]. Первоначально для амплификации целевой последовательности генома применяли 4 праймера [16], позже технология была оптимизирована с помощью введения дополнительной их пары [22]. Для протекания реакции достаточно присутствия в смеси единственного фермента – ДНК-полимеразы, обладающей способностью вытеснять цепь ДНК (например, *Bst*-полимераза из бактерии *Geobacillus stearothermophilus* или *Bsm*-полимераза из *Bacillus smithii*).

Как показано на рисунке, используемый для проведения типичного эксперимента с помощью LAMP набор состоит из 2 внешних (F3 и B3) и 2 внутренних (F1P и B1P) праймеров, которые распознают 6 отдельных областей последовательности ДНК-мишени (F3c, B3c, F2c, B2c, F1 и B1). Прямой внутренний праймер (F1P – Forward Internal Primer) в направлении 5'→3' состоит из области F1c, комплементарной последовательности мишени F1, и области F2, которая комплементарна участку F2c. Аналогично обратный внутренний праймер (B1P – Backward Internal Primer) состоит из областей B1c и B2, комплементарных последовательностям B1 и B2c в ДНК-мишени. Внешние праймеры F3 и B3 имеют последовательно-

сти, комплементарные участкам F3с и В3с соответственно. Применяемые для любой процедуры LAMP праймеры должны быть оптимизированы в целях удовлетворения ряду критериев, таких как температура плавления, GC-состав, длина и расстояния между участками в ДНК-мишени, стабильность 5'- и 3'-концов и т.д. [23].

Амплификационный процесс начинается с формирования комплекса FIP с целевой ДНК в области F2 с образованием двухцепочечной ДНК в равновесии при температуре около 65 °С [23]. Затем *Bst*-ДНК-полимераза с вытесняющей активностью инициирует соединение ДНК с FIP, одновременно вытесняя одну цепь ДНК при её наличии. После этой стадии инициации праймер F3 связывается с комплементарной областью F3с и замещает созданную FIP-комплементарную цепь. Благодаря наличию последовательности F1с в FIP последняя способна самоотжигаться и образовывать петлевую структуру на одном конце ДНК. Эта цепь затем служит мишенью для инициированного с VIP синтеза ДНК и последующего замещения цепи из процесса образования молекулы нуклеиновой кислоты, начавшегося с В3. Подобное явление позволяет другому концу одноцепочечной ДНК также образовывать форму петли, в результате чего получается напоминающая гантель структура, служащая шаблоном для последующей амплификации. Полезными для первичного понимания механизма LAMP могут быть соответствующие видеоролики от компании – крупного производителя *Bst*-полимеразы

«New England Biolabs» (США) ([https://youtu.be/9Kv\\_hSDEX7M](https://youtu.be/9Kv_hSDEX7M); <https://youtu.be/cnXDTjCXGjE>). Для дизайна структур праймеров часто используют специализированный программный продукт PrimerExplorer (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>). Важным нюансом в ходе разработки является отсутствие гомо- и гетеродимеров, поскольку они способны ингибировать образование целевого продукта в ходе нематричной амплификации, приводя к ложным результатам.

После образования гантелеподобной структуры происходит экспоненциальная амплификация аналогичных образований, при этом ДНК-полимераза запускает синтез ДНК в области F1. FIP также гибридизуется с однопетлевой структурой из участка F2, и синтез ДНК этого праймера вызывает смещение праймированной с области F1 цепи и самосвязывание её в петлевую структуру. Наконец, с другой стороны исследуемого фрагмента ДНК, из области В1 в новой петле повторно начинается синтез самопраймированной ДНК с амплификацией текущей матрицы и созданием новой из замещения FIP-комплементарной цепи. Благодаря этому повторяющемуся процессу возможно получение больших количеств нуклеиновых кислот – ДНК может быть амплифицирована до 10<sup>9</sup> раз в течение 1 ч [24]. Для дальнейшего повышения эффективности разработана также методика LAMP с 6 праймерами (т.н. петлевыми) [22]. В ней вместо 2 пар используются 3, при этом прямые и обратные петлевые праймеры (LoopF и LoopB) отжигаются с областями между F1/F2 и В1/В2 соответствен-

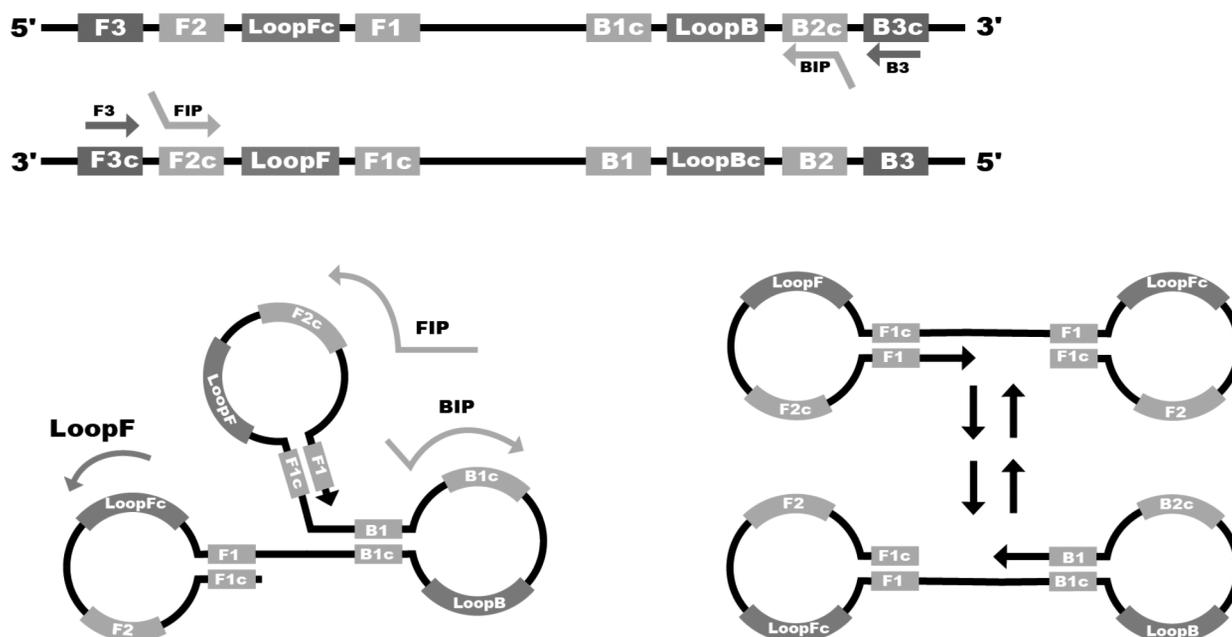


Схема петлевой изотермической амплификации. Внешние праймеры отмечены как F3/B3; внутренние, состоящие из областей F2/B2 и комплементарных им последовательностей F1/B1, – FIP/BIP; петлевые – LoopF/B. В ходе реакции происходят циклический переход между двумя формами и их удлинение в гантелеобразные структуры с множественными петлями.

Schematic representation of the loop-mediated isothermal amplification. External primers are labeled as F3/B3, internal – FIP/BIP, consisting of F2/B2 regions and complementary sequences of F1/B1, loop primers – LoopF/B. During the amplification reaction, a cyclic transition between two forms and their subsequent elongation into dumbbell-like structures with multiple loops occur.

но [23]. Доказано, что такие праймеры ускоряют течение реакции, поскольку амплификация происходит быстрее благодаря увеличению количества начальных точек синтеза ДНК [24].

С целью расширения возможностей LAMP от определения ДНК до выявления РНК, а также для реализации мультиплексной детекции в исходный протокол было добавлено несколько улучшений для разработки различных методик, включая процедуру LAMP с обратной транскрипцией (RT-LAMP) и мультиплексную LAMP. В первом случае к реакционной смеси добавляют обратную транскриптазу, чтобы осуществить преобразование вирусной РНК в комплементарную ДНК (кДНК), которая будет затем использована для амплификации. Эта процедура оказалась важнейшей в идентификации множества РНК-вирусов [24], в том числе и SARS-CoV-2. Так, комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК разработки ФБУН ЦНИИ эпидемиологии по состоянию на 2020 г. входил в состав более 25% наборов для диагностики новой коронавирусной инфекции в РФ. Мультиплексные системы на базе LAMP были разработаны для обнаружения нескольких патогенов в одной пробирке с использованием большего числа праймеров либо с уникальными флуоресцентными сигналами [25, 26]. Вышеперечисленные характеристики тестов на основе LAMP свидетельствуют о перспективности рассматриваемой технологии в области экспресс-диагностики вирусных инфекций. Таким образом, данный метод имеет большой потенциал для выявления SARS-CoV-2, о чем сказано далее в соответствующем разделе.

### 3. Детекция продуктов амплификации LAMP

#### 3.1. Неспецифические методы детекции

В ходе LAMP-амплификации происходит накопление пирофосфата, высвобождающегося при синтезе молекул ДНК вследствие гидролиза нуклеозидтрифосфатов. Он, в свою очередь, взаимодействует с присутствующими в буфере ионами магния ( $Mg^{2+}$ ), благодаря чему образуется белый осадок. В результате в ходе реакции происходит помутнение раствора, которое может быть зафиксировано, например, посредством турбидиметра (мутномера) [27]. Ещё одним часто используемым способом неспецифической детекции служит добавление в реакционную смесь интеркалирующих красителей, в частности SYBR<sup>TM</sup> Green I, EvaGreen<sup>TM</sup> или SYTO, что позволяет с помощью ПЦР-амплификатора с детекцией в режиме реального времени получать кривые амплификации. Однако недостатком ряда (хотя и не всех) этих красителей является их ингибирующий реакцию эффект, что может снижать чувствительность тестов на основе LAMP [28]. В то же время показано, что метод LAMP толерантен к веществам, ингибирующим ПЦР, что является его важным преимуществом [18]. При использовании некоторых красителей (например, SYBR<sup>TM</sup> Green I или EvaGreen<sup>TM</sup>) пробирки

можно освещать ультрафиолетовой (УФ) лампой или светодиодом, что даёт окрашивание положительных проб [29].

Помимо этого для возможности использования в полевых условиях разработан ряд методик для визуализации конечных продуктов невооружённым глазом. Обычно к реакционной смеси добавляют индикаторы, меняющие цвет в случае прохождения реакции. Для некоторых из них (включая, крезоловый красный или нейтральный красный) необходимо довести pH исходной реакционной смеси до определённого значения (~8,8). В ходе реакции этот показатель снижается до ~6,0–6,5, что сопровождается изменением цвета красителя [30]. Другие индикаторы не требуют специальной подготовки смеси: например, гидронафтол синий или флуоресцентный краситель Quant-iT<sup>TM</sup> PicoGreen<sup>TM</sup>, изменение цвета которых также можно наблюдать невооружённым глазом [31]. Предложен также простой метод детекции, основанный на геле-электрофорезе [32]. Кроме того, результат амплификации можно количественно оценить посредством измерения концентрации ионов марганца ( $Mn^{2+}$ ). Для этого было предложено перед реакцией добавлять к раствору кальцеин (флуорексон) – индикатор флуоресцентного металла, в отсутствие свободных  $Mn^{2+}$  начинающий флуоресцировать при облучении светом с определённой длиной волны (495 нм) [33]. Если же в начальной смеси присутствовали указанные ионы, то кальцеин будет образовывать с ними нерастворимый солевой комплекс марганецпирофосфат. Впоследствии флуоресценция ещё более усиливается при связывании свободного кальцеина с  $Mg^{2+}$  из реакционной смеси LAMP, и её можно легко наблюдать в УФ-свете при длине волны 365 нм [24]. Наконец, среди других неспецифических способов можно отметить анализ кривых плавления и отжига, биолюминесценцию через конверсию пирофосфата [34] и электрохемилюминесценцию [35].

Следует отметить, что хотя вероятность случайной амплификации похожих последовательностей геномных фрагментов, принадлежащих другим организмам, достаточно мала и в значительной степени может контролироваться за счёт тщательного дизайна праймеров, перечисленные выше методы обнаружения, не зависящие от последовательностей ДНК, могут показать наличие длинных димеров праймеров как ложноположительный результат [36]. В связи с этим возникает проблема специфической (зависящей от последовательности нуклеиновой кислоты, т.е. последовательность-специфичной) детекции продуктов амплификации LAMP. Ряд таких методик описан в следующем разделе.

#### 3.2. Специфические методы детекции

На сегодняшний день опубликовано более 30 различных методов детекции продуктов амплификации ДНК при помощи LAMP, которые детально рассмотрены в недавнем обзоре [37]. Здесь мы кратко представим лишь наиболее перспективные на наш взгляд для практической диагностики COVID-19.

### 3.2.1. Молекулярный маяк

ДНК-зонд, специфичный к фрагменту мишени, модифицируется флуорофором и гасителем с каждого конца. При этом его 5'-конец комплементарен 3'-концу на протяжении 5–7 нуклеотидов, что позволяет формироваться структуре в форме шпильки или «сковородки» [38, 39]. В отсутствие амплификационных продуктов молекулярный маяк (molecular beacon) существует в форме замкнутой петли из-за внутримолекулярной гибридизации между фрагментами у 5'- и 3'-концов. Таким образом, флуорофор и гаситель располагаются в непосредственной близости, что приводит к затуханию флуоресценции. При наличии продуктов амплификации зонд специфически гибридизуется с ампликоном, в результате чего петля раскрывается, разделяя флуорофор и гаситель с последующим высвобождением флуоресценции. Молекулярные маяки применялись ранее с целью определения вирусных нуклеиновых кислот при помощи LAMP для вирусов иммунодефицита человека (ВИЧ; Human Immunodeficiency Virus, HIV), гепатитов В, С и Е (Hepatitis Virus type B, C, E – HBV, HCV, HEV), Денге (Dengue Virus, DENV) и Западного Нила (West Nile Virus, WNV) [38]. Аналитическая чувствительность при этом составила 50–100 вирусных частиц на реакцию в случае обнаружения вирусов гепатита В и С. Высокая аналитическая специфичность подтверждена тестированием на различных вирусных нуклеиновых кислотах. Кроме того, проведены клинические испытания на реальном биологическом материале от пациентов. Итоговые показатели диагностической чувствительности и специфичности достигли 97 и 100% соответственно. Молекулярные маяки были также использованы для обнаружения части гена *ompW* длиной 1031 п.н. из *Vibrio cholerae* [39]. Необходимо отметить нестабильность шпильки в условиях реакции LAMP, что иногда приводит к не очень высокому соотношению сигнал/шум. С помощью «заблокированных» нуклеиновых кислот (Locked Nucleic Acids, LNA), создающих более высокие температуры плавления, можно повысить термостабильность молекулярных маяков, уменьшая сигнал фоновой флуоресценции [40].

### 3.2.2. Конкурентно-связывающийся тушающий зонд

Конкурентно-связывающийся тушающий зонд для LAMP (Alternately Binding Quenching Probe Competitive LAMP, ABC-LAMP), разработанный первоначально в целях количественного определения ДНК, использует гуаниновое тушение и основан на конкурентной гибридизации [41]. Реакционная смесь включает 2 мишени: целевой ампликон и внутренний контроль амплификации (так называемый «конкурент»). Обе они содержат одинаковую последовательность в области петли, которая комплементарна особому флуоресцентно-меченному (ФМ)-зонду для альтернативного тушения за счёт связывания (Alternately Binding Quenching Probe, AB-QProbe). При этом связывание зонда с целевым ампликоном снижает интенсивность флуоресценции вследствие её тушения гуа-

нином. Напротив, связывание с конкурентом поддерживает флуоресценцию метки зонда, так как гуанин в конкуренте заменён на цитозин. Отношение числа продуктов амплификации от мишени и от конкурента можно рассчитать по интенсивности флуоресценции. Процедура ABC-LAMP охарактеризована для модельной мишени – гена *atoA*, который кодирует фермент, окисляющий аммиак у бактерий окружающей среды. Аналитические параметры не оценивались, однако успешно продемонстрировано точное количественное определение. Преимущество ABC-LAMP для количественного определения ДНК-мишени состоит в том, что присутствующие в смеси для LAMP ингибиторы одинаково влияют на амплификацию реальной мишени и конкурента. Последний при этом служит внутренним контролем и позволяет количественно определять амплификационные продукты на основе измерений флуоресценции в начале и в конце процесса амплификации, не требуя мониторинга в режиме реального времени. Одним из недостатков подхода является то, что эффективность усиления флуоресценции мишени и конкурента должна быть сбалансирована, для чего необходимо построение стандартной кривой.

### 3.2.3. Флуоресценция петлевого праймера при самозатухании

Внутренний или петлевой праймер могут быть модифицированы флуорофором (в позициях 2 или 3 тимины с 3'-конца), способным к самозатуханию. Этот процесс является механизмом гашения, не основанном на FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer – флуоресцентный резонансный перенос энергии), так как не требуется дополнительных флуорогенных молекул. Детали повторного появления ранее погашенной флуоресценции сопряжённой метки пока окончательно не ясны, но одно из возможных объяснений гашения флуоресценции может заключаться в донорской способности гуанина, которая позволяет переносить заряд между азотистым основанием и ближайшим красителем [42]. Первоначально модифицированный флуорофором праймер не связан с матрицей ДНК и находится в растворе в свободном состоянии, вследствие чего может проявлять феномен самозатухания. Во время амплификации такой праймер включается в двухцепочечный ампликон, что ведёт к ослаблению тушения и, как следствие, усилению флуоресценции. По мере увеличения числа подобных ампликонов интенсивность свечения нарастает, что свидетельствует об успешной амплификации с помощью реакции LAMP. Аналитическая и клиническая валидация методики с использованием флуоресценции петлевого праймера при самозатухании (Fluorescence of Loop Primer Upon Self Dequenching, FLOS-LAMP) проведена в отношении высокоинфекционного для человека ДНК-содержащего вируса ветряной оспы *Varicella zoster* [43]. В эксперименте использовались 2 типа материала: без этапа предварительной экстракции нуклеиновых кислот и на уже выделенной ДНК, причём в последнем вариан-

те наблюдался более надёжный сигнал. Аналитическая чувствительность составила 500 копий на реакцию, показатели диагностической чувствительности и специфичности – 96,8 и 100% соответственно. Одной из технических проблем в рассматриваемом случае является необходимость подбора флуорофоров, демонстрирующих высокое самозатухание, и праймера, подходящего для модификации флуорофором в нужном месте, что не всегда представляет собой простую задачу и накладывает определённые ограничения при дизайне структур олигонуклеотидов. Визуализация при таком способе возможна также при добавлении полиэтиленimina, что приводит к образованию его нерастворимого комплекса с ампликоном. Флуоресцентно-меченные зонды встраиваются в осадок и могут быть обнаружены при помощи обычной УФ-лампы. Кроме того, существует принципиальная возможность различения 2 мишеней с получением, таким образом, аналогичного мультиплексу формата при присутствии в смеси лишь одной из них.

### 3.2.4. Универсальный ФМ-зонд

Универсальный ФМ-зонд (QProbe) [44] используется совместно с присоединённой одноцепочечной молекулой ДНК, которая состоит из комплементарной ДНК-мишени последовательности одного из основных праймеров с добавленной 5'-концевой универсальной последовательностью, комплементарной в свою очередь универсальному олигонуклеотиду с присоединённым гасителем на 3'-конце. Такая молекула ДНК действует как сочленение между ФМ-зондом и мишенью посредством гибридизации с матрицей во время амплификации. Перенос электрона между флуорофором и гуанином в целевой последовательности вызывает тушение флуоресценции. Преимущество метода заключается в том, что нуклеотидная последовательность зонда фиксирована и не содержит целевых (вариабельных) областей; кроме того, возможно использование внутреннего контроля. Тем не менее этот способ является последовательность-специфичным механизмом детекции продуктов амплификации, поскольку флуорофор, прикрепленный к 3'-концу универсальной последовательности, тушится гуанином в целевой цепи при условии нахождения последнего в непосредственной близости. Указанная методика применима лишь в ситуациях, когда основания гуанина присутствуют в целевой последовательности в нужной позиции, в связи с чем её можно в большей степени считать полуниверсальной.

### 3.2.5. Зонды LightCycler

Зонды LightCycler были использованы в процессе реакции LAMP Chou P.H. и соавт. [36] и в настоящее время коммерчески доступны для ПЦР. Конструкция содержит зонд-акцептор, модифицированный гасителем на 5'-конце, и зонд-донор с флуорофором на 3'-конце. Расстояние между 5'- и 3'-концами акцепторной и донорной частей в целевой последовательности обычно равно 2 н.п., что позволяет гаран-

тировать близость расположения флуорофора и гасителя. В процессе LAMP генерируются ампликоны, обеспечивающие комплементарные зондам последовательности, с которыми они гибридизуются, приближая флуорофор и гаситель. Аналитическая чувствительность определялась для вируса синдрома белых пятен (White Spot Syndrome Virus, WSSV) креветок пенеид (*Penaeidae*) и оказалась равной около 100 копий на реакцию. Специфичность подтверждена тестированием на ДНК хозяина и других обнаруженных у креветок вирусных патогенов. Клиническая значимость продемонстрирована путём тестирования геномной ДНК вируса WSSV при инфицировании им белоногой креветки (*Penaeus vannamei*) [36].

### 3.2.6. Детекция на основе нуклеазы Cas12 и тонкослойной хроматографии

Broughton J.P. и соавт. [8] опубликовали разработку и первоначальную валидацию теста для обнаружения РНК SARS-CoV-2 из образцов пациентов на основе комплекса CRISPR/Cas12. Методика получила название DETECTR (DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter). В ходе такого исследования одновременно осуществляются обратная транскрипция и изотермическая амплификация по методу RT-LAMP, а также последующее обнаружение с помощью белка Cas12 предопределённых последовательностей нового коронавируса, после чего расщепление репортёрной молекулы подтверждает выявление вирусной РНК. Визуализация детекции Cas12 достигается с помощью молекулы FAM-биотина и тест-полосок, предназначенных для захвата меченых нуклеиновых кислот. Нерасщеплённые репортёрные молекулы при этом захватываются на 1-й (контрольной) линии детектирования, тогда как неизбирательная активность расщепления Cas12 генерирует сигнал на 2-й (тестовой) линии.

### 3.3. Другие методы детекции

Безусловно, на этом список методик специфической детекции продуктов амплификации с помощью LAMP не исчерпывается, однако их подробное описание выходит за рамки данного обзора. Среди других возможных способов можно упомянуть гашение гуанином с потерей сигнала при отжиге праймера [45], флуоресценцию с усилением сигнала с использованием меченых праймеров и интеркалятора – бромида этидия ( $C_{21}H_{20}BrN$ ) [46], обнаружение амплификации по высвобождению тушения (Detection of Amplification by Release of Quenching, DARQ) [47], использование ассимилирующего зонда [48], метод одноступенчатого вытеснения цепи (One-step Strand Displacement, OSD) [49].

## 4. Недостатки метода LAMP

Одним из основных недостатков тестов на базе LAMP является относительная сложность дизайна праймеров, так как требуется подобрать сразу 6–8 участков на достаточно коротком фрагменте ДНК и избежать при этом амплифицирования других (не-

желательных) её последовательностей, особенно в геноме хозяина, что существенно ограничивает выбор целевых участков. Большое количество праймеров увеличивает также вероятность формирования конкатамеров [50]. В связи с тем что суммарная область покрытия праймерами существенно больше, чем при классической ПЦР, заметно выше становится и вероятность появления мутаций в местах посадки, особенно у РНК-вирусов, к которым относится и SARS-CoV-2. Это явление может привести к меньшей эффективности отжига праймеров с получением ложнонегативных результатов [51]. Поэтому необходимо постоянно отслеживать появление новых мутационных изменений в геномах исследуемых патогенов, чтобы своевременно корректировать ситуацию посредством замены олигонуклеотидов либо введением так называемых вырождений. Кроме того, возможно одновременное использование сразу 2 и более геномных фрагментов в одном тесте, особенно при неспецифической детекции продукта амплификации, что может снизить эффект появления замен в геноме и предоставить дополнительное время на редизайн праймеров в случае необходимости.

Другая проблема, частично описанная выше, – трудности в специфической детекции амплификационных продуктов, хотя для их преодоления предложены различные подходы (см. раздел 3) [37]. Таким образом, LAMP пока проблематично использовать в режиме мультиплекса для выявления сразу нескольких патогенов в одной пробирке, что важно при диагностике острых респираторных и кишечных инфекций, вызываемых большим количеством бактерий и вирусов. Кроме того, этот факт определённым образом усложняет процесс внесения внутреннего контрольного образца (ВКО), которое постепенно становится практически обязательным этапом в подготовке коммерческих диагностических тест-систем.

Наконец, следует отметить сохраняющуюся ограниченность в предложении на российском рынке реагентов отечественного производства для реакции петлевой изотермической амплификации (в частности, *Bst*-полимеразы), хотя указанная ситуация, несомненно, будет улучшаться.

### 5. Прогресс в обнаружении SARS-CoV-2 с помощью RT-LAMP

В самом начале пандемии COVID-19 (2020 г.) Lamb L.E. и соавт. [21] сообщили о разработке скринингового экспресс-теста на основе LAMP для обнаружения РНК SARS-CoV-2 с продолжительностью анализа менее 30 мин без этапа выделения. Для достижения этой цели были использованы консенсусные последовательности 23 известных на тот момент штаммов вируса. С помощью программного обеспечения LAMP Designer (Premier Biosoft™, США) был осуществлён дизайн праймеров для таргетирования консенсусных последовательностей в ходе RT-LAMP, общих для всех известных штаммов коронавируса, но отличающихся от таковых у вирусосов со схожими последовательностями (например, коро-

навирус летучих мышей (BtCoV)). С целью проверки работоспособности теста в качестве модельных образцов использовали биологический материал от здоровых людей с добавлением синтезированных олигонуклеотидов, созданных на базе последовательности GenBank MN908947.3. Детекцию результатов амплификации RT-LAMP контролировали 3 методами: наблюдением за изменением цвета реакционной смеси, определением уровня флуоресценции и гель-электрофорезом. Показано, что данный тест имеет очень высокую специфичность в отношении SARS-CoV-2, поскольку во многих случаях с использованием других вирусов, таких как MERS (коронавирус Ближневосточного респираторного синдрома), BtCoV и MHV (вирус гепатита мышей), сигнал не наблюдался. Чувствительность также была исследована с пределом обнаружения до 1,02 фг на реакцию с применением смоделированных образцов. Наконец, подтверждена высокая клиническая ценность данного теста, поскольку он правильно определял молекулы нуклеиновых кислот SARS-CoV-2 независимо от типа пробы (сыворотка, моча, слюна, мазки из рото- и носоглотки).

С целью создания быстрой и простой в применении тест-системы для диагностики COVID-19 Huang W.E. и соавт. разработали 4 набора праймеров для LAMP, нацеленные на различные области генома SARS-CoV-2 [52]. Из них 2 относились к гену *N* вируса, а 2 других – к генам *S* и *ORF1ab*. Последний располагается близко к 5'-концу вирусной РНК, тогда как *N* находится у 3'-конца. Было высказано предположение, что эффективность детекции в разных регионах может быть неодинаковой, поскольку деградация РНК происходит от 5'-к 3'-концу в процессе её забора и экстракции. Праймеры FIP конъюгировали с FAM на 5'-конце, что оказалось эффективным и надёжным как для флуоресцентного, так и для колориметрического способа обнаружения продуктов амплификации. Подтверждена высокая специфичность всех праймеров для обнаружения SARS-CoV-2 и показано, что они не амплифицируют ДНК человека, благодаря чему могут использоваться при анализе клинических образцов. Точность тестов также оказалась приемлемой: показатели хорошо согласовывались с полученными при традиционной ОТ-ПЦР. В ходе обнаружения вирусной РНК наборы праймеров продемонстрировали результаты с чувствительностью от 2 до 20 копий РНК на реакцию (25 мкл) за 30 мин амплификации в зависимости от мишени. Выполнен дополнительный одноэтапный тест для оценки возможности исключения стадии выделения РНК в процессе RT-LAMP. Отмечено, что последняя на протяжении 40 мин привела к видимому невооружённым глазом изменению цвета, что указывает на осуществимость проведения RT-LAMP без этапа экстракции нуклеиновых кислот. Праймерные наборы правильно выявили все 8 положительных и 8 отрицательных клинических образцов, что служит доказательством возможности использования такого теста в качестве замены классическим методикам на основе ОТ-ПЦР для обнаружения SARS-CoV-2, осо-

бенно в условиях отсутствия специализированной лаборатории.

С начала 2020 г. создано значительное количество тест-систем для экспресс-диагностики SARS-CoV-2 на основе LAMP и опубликованы соответствующие статьи. Только поиск по базе PubMed даёт свыше 80 работ (начиная с марта 2020 г.), имеющих отношение к тестированию новой коронавирусной инфекции с помощью петлевой изотермической амплификации. При этом сюда не входят статьи в статусе препринта, а также не публикуемые в открытой печати коммерческие решения. В частности, разработано несколько сетов праймеров, специфичных к различным генам нового коронавируса [53], и продемонстрированы их весьма высокие показатели чувствительности и специфичности. В другом случае в целях определения результатов амплификации использован портативный прибор на базе смартфона для выполнения конечной флуоресцентной детекции LAMP-образцов на микрофлюидном чипе [54]. Показано, что значения специфичности при диагностике посредством LAMP могут приближаться к 100% [55], а чувствительности – превышать 90%. В работе Dao Thi V.L. и соавт. [56] описана процедура RT-LAMP, которая надёжно обнаруживала РНК SARS-CoV-2 с пороговым значением цикла в ОТ-ПЦР до 30 при чувствительности 97,5% и специфичности 99,7%. Опубликован также протокол без предварительного выделения нуклеиновой кислоты, который сохранил отличную специфичность (99,5%), хотя и показал снижение чувствительности (86% для количества циклов ПЦР с превышением порогового значения флуоресценции (Ct) <30) по сравнению с RT-LAMP с предварительной экстракцией РНК. Ещё в одном исследовании выделение нуклеиновых кислот и последующая RT-LAMP были интегрированы в реакционные блоки микрофлюидного диска [57]; единый прибор запускал реакцию вращением последнего, контролировал нагрев до необходимой температуры, выполняя также обнаружение сигнала флуоресценции. Предполагаемый предел обнаружения для РНК вирусных частиц составил 2 копии на реакцию, пропускная способность – 21 тест на диске, время анализа от образца до результата – ~70 мин. Продемонстрировано также обнаружение SARS-CoV-2 на основе RT-LAMP с использованием специально изготовленного картриджа и прибора на базе смартфона, которое может быть выполнено непосредственно в месте забора образца [58]. Методика имеет предел обнаружения (limit of detection, LOD) 50 копий РНК на 1 мкл реакционной смеси в течение ~30 мин. По утверждению авторов разработки, это был первый мобильный прибор для детекции РНК нового коронавируса на основе изотермической амплификации с применением одноразового картриджа и без выполнения этапа экстракции РНК. Другая аналогичная технология от Colog Genomics (США) показала высокие пропускную способность и чувствительность (LOD 0,75 копий на 1 мкл), однако она требует предварительной стадии выделения РНК.

С целью удовлетворения потребностей в диагностической платформе на основе автономной колориметрической изотермической амплификации нуклеиновых кислот разработано недорогое устройство со встроенным компьютером, камерой для визуализации и алгоритмом обработки изображений на основе искусственного интеллекта [59]. В общей сложности с использованием такой платформы протестировано около 200 образцов пациентов с подозрением на наличие COVID-19, при этом достигнуты более высокие показатели надёжности, специфичности и чувствительности, чем у текущего «золотого стандарта» ПЦР. Семь типов коронавируса (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2) были выявлены с помощью специального микрофлюидного устройства и изотермической амплификации за 40 мин [60]. Быстрый и простой в использовании вариант методики RT-LAMP, специфически амплифицирующей области генов *ORF8* и *N*, был использован на базе недорогого лабораторного оборудования, что особенно подходит для вокзалов, аэропортов и больниц [61]. Далее, создана тест-система на основе RT-LAMP для определения одновременно 2 генов SARS-CoV-2 (*S* и *RdRP*), имеющие параметры аналитической чувствительности и специфичности, предел обнаружения и точность, сравнимые с таковыми ОТ-ПЦР [62]. Такой протокол, использующий сразу 2 мишени, может быть особенно востребован с учётом постоянно появляющихся новых мутаций возбудителя, потенциально способных привести к снижению эффективности некоторых тестов (что уже произошло с рядом диагностикомов вследствие «британской мутации») [51]. Наконец, описан ещё один подход с мультиплексированием RT-LAMP и проверена его чувствительность [63]. Мультиплексирование праймеров в реакциях RT-LAMP представляется многообещающим способом дальнейшего повышения чувствительности за счёт детекции нескольких геномных фрагментов. Комбинация ПЦР и LAMP была использована для повышения степени чувствительности теста [64]. На данный момент также коммерчески доступен набор от New England Biolabs (США) для быстрой детекции SARS-CoV-2 методом колориметрической петлевой изотермической амплификации, содержащий реагенты для LAMP-амплификации фрагментов генов *N* и *E* нового коронавируса и контроли оценки эффективности. Реакция проводится при температуре 65 °С и занимает всего 30 мин. Для простой визуальной колориметрической интерпретации результатов в состав реакционной смеси включён рН-чувствительный краситель.

В РФ также предпринято несколько попыток введения тестов на основе изотермической амплификации в диагностическую практику. Так, в наборе реагентов, разработанном ООО «Медико-биологический Союз» (Россия), использована методика LAMP, что заметно сократило время исследования образцов по сравнению с ОТ-ПЦР. В этой системе достаточно прогреть образцы в лизирующем буфере, перенести их в планшет, добавив реакционную смесь, и провести

амплификацию, а заявленная чувствительность составляет  $10^3$  копий на 1 мл. В тестах от «Эвотэк-Мирай Геномикс» (Россия – Япония) реализован модифицированный метод петлевой изотермической амплификации (SmartAmp), который по точности не уступает технологии ПЦР, но сокращает время тестирования более чем в 4 раза. Значение чувствительности заявлено производителем как  $10^2$  копий на 1 мл. В наборе реагентов для выявления РНК нового коронавируса методом RT-LAMP от НПФ «Литех» (Россия) аналитических характеристик не заявлено. Был также разработан комплекс («Синтол», Россия) [64] для проведения реакции RT-LAMP с целью обнаружения специфических фрагментов РНК нового коронавируса посредством флуоресцентной детекции в режиме реального времени. Его применение позволяет выявить 2 мишени в одной пробирке: фрагмент вирусной РНК и фрагмент ДНК внутреннего положительного контроля, исключающий ложноотрицательный результат; время анализа – не более 40 мин. Экспресс-тест от ООО «Система-БиоТех» (Россия) позволяет определять наличие SARS-CoV-2 за 20 мин. Система предназначена для диагностики на всех стадиях заболевания, может использоваться для скрининга в любых медицинских организациях; детекция вируса происходит по изменению цвета реакционной смеси в пробирке. Кроме того, различными организациями в РФ ведутся работы по локализации производства реагентов для создания тестов на базе LAMP, что, безусловно, приведёт к снижению их стоимости и более быстрому внедрению в широкую клиническую практику. Анонсированный в начале 2021 г. экспресс-тест для выявления РНК SARS-CoV-2 от ФБУН ЦНИИ эпидемиологии (Россия), основанный на реакции LAMP и разработанный полностью на базе ферментов отечественного производства, является одним из важных этапов в будущем переходе от традиционных диагностических систем на основе ПЦР на технологии нового поколения.

## 6. Заключение

Быстрые, недорогие и удобные для пользователя методы молекулярной диагностики – важное подспорье в борьбе со вспышками инфекционных заболеваний. Пандемия COVID-19 показала, что существует острая необходимость в наращивании объёмов тестирования, которые должны на порядки превышать уровень, достижимый с помощью существующих стандартных методик и подходов [65]. LAMP – инновационная технология амплификации генов, имеющая значительные перспективы в качестве инструмента обнаружения вирусных нуклеиновых кислот, особенно во время пандемии новой коронавирусной инфекции. В данном обзоре суммированы недавние достижения в тестировании с помощью LAMP для быстрой и точной детекции молекул РНК SARS-CoV-2. Несмотря на то что такие тесты до сих пор могут приводить к ошибочным результатам, особенно ложнонегативным, преимущества использования LAMP по-прежнему значительны. Одним из них является

высокая скорость исследования – подтверждение результатов для типичной процедуры RT-LAMP происходит в несколько раз быстрее, чем при ОТ-ПЦР [23]. Отсутствие стадии денатурирования и возможное объединение процессов амплификации и детекции позволяют провести анализ с коротким временем получения результатов. Другим достоинством является простота применения, поскольку изотермический характер амплификации не требует использования дорогостоящего оборудования. Изотермические условия также помогают обеспечить высокую эффективность амплификации вследствие отсутствия потерь времени на термоденатурацию (как у традиционной ОТ-ПЦР) [24]. Наконец, визуализация результатов относительно проста, поскольку в качестве индикатора можно использовать pH-зависимые красители либо степень помутнения раствора, что вполне можно увидеть невооружённым глазом. Поэтому, скорость, простота и экономическая эффективность процедуры делают LAMP хорошим кандидатом для мониторинга распространения вируса SARS-CoV-2.

Помимо улучшения чувствительности и специфичности за счёт тщательного дизайна праймеров для LAMP, в свете дальнейшей оптимизации крупномасштабного скрининга на COVID-19 одной из важных тенденций представляется разработка «истинного» одностадийного процесса LAMP в закрытой пробирке [17]. Такая процедура потребует только перенесения пользователем тампона для отбора проб в реакционную смесь с последующей амплификацией в закрытой пробирке при постоянной температуре. Таким образом, анализ может обнаруживать SARS-CoV-2 и другие патогены практически в домашних условиях с высоким уровнем детекции, подобно тому как это уже реализовано в тест-системе от компании Lucira™ (США). Вероятно, в ближайшем будущем молекулярная диагностика у постели больного станет действительно доступной, что не только повысит эффективность выявления инфекционных агентов, но и значительно снизит затраты системы здравоохранения. Сам подход может сыграть важную роль в борьбе с нынешними и будущими вспышками пандемий.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Woo P.C.Y., Huang Y., Lau S.K.P., Yuen K.Y. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses*. 2010; 2(8): 1804–20. <https://doi.org/10.3390/v2081803>.
2. Wu A., Peng Y., Huang B., Ding X., Wang X., Niu P., et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microbe*. 2020; 27(3): 325–8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001>.
3. Udugama B., Kadhiresan P., Kozlowski H.N., Malekjahani A., Osborne M., Li V.Y.C., et al. Diagnosing COVID-19: the disease and tools for detection. *ACS Nano*. 2020; 14(4): 3822–35. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02624>.
4. Drosten C., Götting S., Schilling S., Asper M., Panning M., Schmitz H., et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, Dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(7): 2323–30. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.7.2323-2330.2002>.
5. Mackay I.M. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*. 2002; 30(6): 1292–305. <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.1292>.

6. Esbin M.N., Whitney O.N., Chong S., Maurer A., Darzacq X., Tjian R. Overcoming the bottleneck to widespread testing: a rapid review of nucleic acid testing approaches for COVID-19 detection. *RNA*. 2020; 26(7): 771–83. <https://doi.org/10.1261/rna.076232.120>.
7. Shen M., Zhou Y., Ye J., Abdullah Al-Maskri A.A., Kang Y., Zeng S., et al. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *J. Pharm. Anal.* 2020; 10(1): 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.02.010>.
8. Broughton J.P., Deng X., Yu G., Fasching C.L., Servellita V., Singh J., et al. CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat. Biotechnol.* 2020; 38(7): 870–4. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>.
9. Schmid-Burgk J.L., Schmithausen R.M., Li D., Hollstein R., Ben-Shmuel A., Israeli O., et al. LAMP-Seq: population-scale COVID-19 diagnostics using combinatorial barcoding. *bioRxiv*. 2020.04.06.025635. <https://doi.org/10.1101/2020.04.06.025635>.
10. Hueston L., Kok J., Guibone A., McDonald D., Hone G., Goodwin J., et al. The antibody response to SARS-CoV-2 infection. *Open Forum Infect. Dis.* 2020; 7(9): ofaa387. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa387>.
11. Kiselev D., Matsvay A., Abramov I., Dedkov V., Shipulin G., Khafizov K. Current trends in diagnostics of viral infections of unknown etiology. *Viruses*. 2020; 12(2): 211. <https://doi.org/10.3390/v12020211>.
12. Blanco L., Bernad A., Lázaro J.M., Martín G., Garmendia C., Salas M. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J. Biol. Chem.* 1989; 264(15): 8935–40.
13. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*. 1991; 350(6313): 91–2. <https://doi.org/10.1038/350091a0>.
14. Piepenburg O., Williams C.H., Stemple D.L., Armes N.A. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol.* 2006; 4(7): e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>.
15. Vincent M., Xu Y., Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Rep.* 2004; 5(8): 795–800. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400200>.
16. Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 2000; 28(12): E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.
17. Thompson D., Lei Y. Mini review: Recent progress in RT-LAMP enabled COVID-19 detection. *Sens. Actuators Rep.* 2020; 2(1): 100017. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2020.100017>.
18. Francois P., Tangomo M., Hibbs J., Bonetti E.J., Boehme C.C., Notomi T., et al. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2011; 62(1): 41–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00785.x>.
19. Rödel J., Egerer R., Suleyman A., Sommer-Schmid B., Baier M., Henke A., et al. Use of the variplex™ SARS-CoV-2 RT-LAMP as a rapid molecular assay to complement RT-PCR for COVID-19 diagnosis. *J. Clin. Virol.* 2020; 132: 104616. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104616>.
20. El-Tholoth M., Branavan M., Naveenathayalan A., Balachandran W. Recombinase polymerase amplification-nucleic acid lateral flow immunoassays for Newcastle disease virus and infectious bronchitis virus detection. *Mol. Biol. Rep.* 2019; 46: 6391–7. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05085-y>.
21. Lamb L.E., Bartolone S.N., Ward E., Chancellor M.B. Rapid detection of novel coronavirus/Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *PLoS One*. 2020; 15(6): e0234682. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234682>.
22. Nagamine K., Hase T., Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell Probes*. 2002; 16(3): 223–9. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>.
23. Parida M., Sannarangaiah S., Dash P.K., Rao P.V.L., Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev. Med. Virol.* 2008; 18(6): 407–21. <https://doi.org/10.1002/rmv.593>.
24. Sahoo P.R., Sethy K., Mohapatra S., Panda D. Loop mediated isothermal amplification: An innovative gene amplification technique for animal diseases. *Vet. World*. 2016; 9(5): 465–9. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.465-469>.
25. Mahony J., Chong S., Bulir D., Ruyter A., Mwawasi K., Waltho D. Multiplex loop-mediated isothermal amplification (M-LAMP) assay for the detection of influenza A/H1, A/H3 and influenza B can provide a specimen-to-result diagnosis in 40 min with single genome copy sensitivity. *J. Clin. Virol.* 2013; 58(1): 127–31. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.06.006>.
26. Foo P.C., Chan Y.Y., Mohamed M., Wong W.K., Nurul Najian A.B., Lim B.H. Development of a thermostabilised triplex LAMP assay with dry-reagent four target lateral flow dipstick for detection of *Entamoeba histolytica* and non-pathogenic *Entamoeba* spp. *Anal. Chim. Acta*. 2017; 966: 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.02.019>.
27. Mori Y., Nagamine K., Tomita N., Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 289(1): 150–4. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921>.
28. Yu L., Wu S., Hao X., Dong X., Mao L., Pelechano V., et al. Rapid detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform. *Clin. Chem.* 2020; 66(7): 975–7. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa102>.
29. Karthik K., Rathore R., Thomas P., Arun T.R., Viswas K.N., Dhama K., et al. New closed tube loop mediated isothermal amplification assay for prevention of product cross-contamination. *MethodsX*. 2014; 1: 137–43. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.08.009>.
30. Tanner N.A., Zhang Y., Evans T.C. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *Biotechniques*. 2015; 58(2): 59–68. <https://doi.org/10.2144/000114253>.
31. Wastling S.L., Picozzi K., Kakembo A.S.L., Welburn S.C. LAMP for human African trypanosomiasis: a comparative study of detection formats. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 4(11): e865. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000865>.
32. Iwamoto T., Sonobe T., Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(6): 2616–22. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2616-2622.2003>.
33. Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat. Protoc.* 2008; 3(5): 877–82. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>.
34. Gandelman O.A., Church V.L., Moore C.A., Kiddle G., Carne C.A., Parmar S., et al. Novel bioluminescent quantitative detection of nucleic acid amplification in real-time. *PLoS One*. 2010; 5(11): e14155. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014155>.
35. Roy S., Wei S.X., Ying J.L.Z., Safavi M., Ahmed M.U. A novel, sensitive and label-free loop-mediated isothermal amplification detection method for nucleic acids using luminophore dyes. *Biosens. Bioelectron.* 2016; 86: 346–52. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.06.065>.
36. Chou P.H., Lin Y.C., Teng P.H., Chen C.L., Lee P.Y. Real-time target-specific detection of loop-mediated isothermal amplification for white spot syndrome virus using fluorescence energy transfer-based probes. *J. Virol. Methods*. 2011; 173(1): 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.01.009>.
37. Becherer L., Borst N., Bakheit M., Frischmann S., Zengerle R., von Stetten F. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection. *Anal. Methods*. 2020; 12(6): 717–46. <https://doi.org/10.1039/C9AY02246E>.
38. Nyan D.C., Swinson K.L. A novel multiplex isothermal amplification method for rapid detection and identification of viruses. *Sci. Rep.* 2015; 5: 17925. <https://doi.org/10.1038/srep17925>.
39. Liu W., Huang S., Liu N., Dong D., Yang Z., Tang Y., et al. Establishment of an accurate and fast detection method using molecular beacons in loop-mediated isothermal amplification assay. *Sci. Rep.* 2017; 7: 40125. <https://doi.org/10.1038/srep40125>.
40. Wang L., Yang C.J., Medley C.D., Benner S.A., Tan W. Locked nucleic acid molecular beacons. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; 127(45): 15664–5. <https://doi.org/10.1021/ja052498g>.
41. Tani H., Teramura T., Adachi K., Tsuneda S., Kurata S., Nakamura K., et al. Technique for quantitative detection of specific DNA sequences using alternately binding quenching probe competitive assay combined with loop-mediated isothermal amplification. *Anal. Chem.* 2007; 79(15): 5608–13. <https://doi.org/10.1021/ac070041e>.
42. Nazarenko I., Pires R., Lowe B., Obaidy M., Rashtchian A. Effect of primary and secondary structure of oligodeoxyribonucleotides on

- the fluorescent properties of conjugated dyes. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(9): 2089–195. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.2089>.
43. Gadkar V.J., Goldfarb D.M., Gantt S., Tilley P.A.G. Real-time detection and monitoring of loop mediated amplification (LAMP) reaction using self-quenching and de-quenching fluorogenic probes. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 5548. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23930-1>.
  44. Ayukawa Y., Hanyuda S., Fujita N., Komatsu K., Arie T. Novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay with a universal QProbe can detect SNPs determining races in plant pathogenic fungi. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 4253. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04084-y>.
  45. Zerilli F., Bonanno C., Shehi E., Amicarelli G., Adlerstein D., Makrigiorgos G.M. Methylation-specific loop-mediated isothermal amplification for detecting hypermethylated DNA in simplex and multiplex formats. *Clin. Chem.* 2010; 56(8): 1287–96. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.143545>.
  46. Kouguchi Y., Fujiwara T., Teramoto M., Kuramoto M. Homogeneous, real-time duplex loop-mediated isothermal amplification using a single fluorophore-labeled primer and an intercalator dye: Its application to the simultaneous detection of Shiga toxin genes 1 and 2 in Shiga toxigenic *Escherichia coli* isolates. *Mol. Cell Probes.* 2010; 24(4): 190–5. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2010.03.001>.
  47. Tanner N.A., Zhang Y., Evans T.C. Jr. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *Biotechniques.* 2012; 53(2): 81–9. <https://doi.org/10.2144/0000113902>.
  48. Kubota R., Jenkins D.M. Real-time duplex applications of Loop-mediated AMplification (LAMP) by assimilating probes. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16(3): 4786–99. <https://doi.org/10.3390/ijms16034786>.
  49. Jiang Y.S., Bhadra S., Li B., Wu Y.R., Milligan J.N., Ellington A.D. Robust strand exchange reactions for the sequence-specific, real-time detection of nucleic acid amplicons. *Anal. Chem.* 2015; 87: 3314–20. <https://doi.org/10.1021/ac504387c>.
  50. Kumar Y., Bansal S., Jaiswal P. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid and sensitive tool for quality assessment of meat products. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2017; 16(6): 1359–78. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12309>.
  51. Kidd M., Richter A., Best A., Mirza J., Percival B., Mayhew M., et al. S-variant SARS-CoV-2 is associated with significantly higher viral loads in samples tested by ThermoFisher TaqPath RT-QPCR. *medRxiv.* 2020; 2020.12.24.20248834. <https://doi.org/10.1101/2020.12.24.20248834>.
  52. Huang W.E., Lim B., Hsu C.C., Xiong D., Wu W., Yu Y., et al. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microb. Biotechnol.* 2020; 13(4): 950–61. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13586>.
  53. Park G.S., Ku K., Baek S.H., Kim S.J., Kim S.I., Kim B.T., et al. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays targeting Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *J. Mol. Diagn.* 2020; 22(6): 729–35. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.03.006>.
  54. Sun F., Ganguli A., Nguyen J., Brisbin R., Shanmugam K., Hirschberg D.L., et al. Smartphone-based multiplex 30-minute nucleic acid test of live virus from nasal swab extract. *Lab. Chip.* 2020; 20(9): 1621–7. <https://doi.org/10.1039/d0lc00304b>.
  55. Jiang M., Pan W., Arasther A., Fang W., Ling L., Fang H., et al. Development and validation of a rapid, single-step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system potentially to be used for reliable and high-throughput screening of COVID-19. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020; 10: 331. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00331>.
  56. Dao Thi V.L., Herbst K., Boerner K., Meurer M., Kremer L.P., Kirrmaier D., et al. A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Sci. Transl. Med.* 2020; 12(556): eabc7075. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc7075>.
  57. Tian F., Liu C., Deng J., Han Z., Zhang L., Chen Q., et al. A fully automated centrifugal microfluidic system for sample-to-answer viral nucleic acid testing. *Sci. China Chem.* 2020; 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11426-020-9800-6>.
  58. Ganguli A., Mostafa A., Berger J., Aydin M.Y., Sun F., de Ramirez S.A.S., et al. Rapid isothermal amplification and portable detection system for SARS-CoV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020; 117(37): 22727–35. <https://doi.org/10.1073/pnas.2014739117>.
  59. Rohaim M.A., Clayton E., Sahin I., Vilela J., Khalifa M.E., Al-Natour M.Q., et al. Artificial intelligence-assisted loop mediated isothermal amplification (AI-LAMP) for rapid detection of SARS-CoV-2. *Viruses.* 2020; 12(9): 972. <https://doi.org/10.3390/v12090972>.
  60. Xiong H., Ye X., Li Y., Wang L., Zhang J., Fang X., et al. Rapid differential diagnosis of seven human respiratory coronaviruses based on centrifugal microfluidic nucleic acid assay. *Anal. Chem.* 2020; 92(21): 14297–302. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03364>.
  61. Mautner L., Baillie C.K., Herold H.M., Volkwein W., Guertler P., Eberle U., et al. Rapid point-of-care detection of SARS-CoV-2 using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Virol. J.* 2020; 17(1): 160. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01435-6>.
  62. Mohon A.N., Oberding L., Hundt J., van Marle G., Pabbaraju K., Berenger B.M., et al. Optimization and clinical validation of dual-target RT-LAMP for SARS-CoV-2. *J. Virol. Methods.* 2020; 286: 113972. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113972>.
  63. Schermer B., Fabretti F., Damagnez M., Di Cristanziano V., Heger E., Arjune S., et al. Rapid SARS-CoV-2 testing in primary material based on a novel multiplex RT-LAMP assay. *PLoS One.* 2020; 15(11): e0238612. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238612>.
  64. Varlamov D.A., Blagodatskikh K.A., Smirnova E.V., Kramarov V.M., Ignatov K.B. Combinations of PCR and isothermal amplification techniques are suitable for fast and sensitive detection of SARS-CoV-2 viral RNA. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020; 8: 604793. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.604793>.
  65. Lei Y. Kitchen range oven enabled one-tube RT-LAMP for RNA detection at home – A potential solution for large-scale screening of COVID-19. *enRxiv.* 2020. Preprint. <https://doi.org/10.31224/osf.io/ed85s>.

---

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

---

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



### Биологическая характеристика и перmissивность к вирусам штамма диплоидных клеток почки летучей мыши нетопыря Натусиуса (*Pipistrellus nathusii* Keyserling & Blasius, 1839; *Chiroptera: Microchiroptera: Vespertilionidae*)

Поволяева О.С., Юрков С.Г., Лаптева О.Г., Колбасова О.Л., Чадаева А.А., Кольцов А.Ю., Синдрякова И.П., Власов М.Е., Живодёров С.П., Луницин А.В.

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» Минобрнауки России, 601125, Владимирская область, пос. Вольгинский, Россия

---

**Введение.** Летучие мыши (*Microchiroptera*) являются эпидемиологически важным естественным резервуаром вирусов различных таксономических групп, включая возбудителей особо опасных болезней человека и животных. Учитывая актуальность арбовирусных инфекций, представляется целесообразным проведение исследований по изучению спектра чувствительности клеток из тканей летучих мышей, обитающих и мигрирующих на территории Российской Федерации, к вирусам векторных инфекций сельскохозяйственных животных.

**Цель исследования** – получение диплоидного штамма клеток почечной ткани летучей мыши (ПЛМ) вида нетопырь лесной, или нетопырь Натусиуса (*Pipistrellus nathusii*), изучение его биологических характеристик, а также оценка перmissивности полученной клеточной культуры к вирусам блютанга, лихорадки долины Рифт (ЛДР), заразного узелкового дерматита (ЗУД) крупного рогатого скота (КРС), миксомы кроликов (*Mucorhynchus cupinuli*), фибромы Шоупа, африканской чумы лошадей (АЧЛ) и африканской чумы свиней (АЧС).

**Материал и методы.** Донорами органов служили 2 особи клинически здоровых самцов летучей мыши *P. nathusii*. Для получения диплоидного штамма культуры клеток почки *этого вида* и изучения свойств полученной клеточной культуры градации от 6-го и выше пассажных уровней использовали традиционные цитологические, вирусологические и молекулярные методы. Определяли перmissивность данного штамма к вирусам блютанга, ЛДР, ЗУД, миксомы кроликов, фибромы Шоупа, АЧЛ и АЧС.

**Результаты.** Формирование конфлюэнтного монослоя наблюдали через 72 ч, при этом индекс пролиферации (ИП) был равен 2,7–3,3. Клеточный монослой сохранялся без смены среды в течение 45 сут (срок наблюдения). Показана стабильность кариотипа в условиях непрерывного субкультивирования на уровне 36-го пассажа. Культура клеток получила наименование «Штамм диплоидных клеток почки летучей мыши *Pipistrellus nathusii* (Diploid cell line *Pipistrellus nathusii* kidney)»; установлена её перmissивность к вирусам блютанга, ЛДР, ЗУД и миксомы кроликов.

**Обсуждение.** Чувствительность полученного клеточного материала к вирусам блютанга и ЛДР согласуется с данными об идентификации реовируса и возбудителя ЛДР у египетских фруктовых летучих мышей (*Rousettus aegyptiacus*), а перmissивность данного штамма к возбудителям ЗУД и миксомы кроликов – с результатами обнаружения поксвирусов у вида поздний кожан (*Eptesicus fuscus*).

**Выводы.** Получен и паспортизирован штамм диплоидных клеток ПЛМ *P. nathusii*. Установленная перmissивность к вирусам блютанга, ЛДР, ЗУД и миксомы кроликов позволяет использовать его для выделения и изучения этих патологических агентов. Репродукция возбудителей в клетках данного штамма из тканей ПЛМ вида *P. nathusii*, обитающего и мигрирующего на территории европейской части Российской Федерации, указывает на его потенциальную роль в эпидемиологии значимых инфекций, особенно трансмиссивных.

**Ключевые слова:** летучие мыши; штамм диплоидных клеток; вирус; особо опасные инфекционные болезни

**Для цитирования:** Поволяева О.С., Юрков С.Г., Лаптева О.Г., Колбасова О.Л., Чадаева А.А., Кольцов А.Ю., Синдрякова И.П., Власов М.Е., Живодёров С.П., Луницин А.В. Биологическая характеристика и перmissивность к вирусам штамма диплоидных клеток почки летучей мыши нетопыря Натусиуса (*Pipistrellus nathusii* Keyserling & Blasius, 1839; *Chiroptera: Microchiroptera: Vespertilionidae*). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(1): 29-39. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-12>

**Для корреспонденции:** Юрков Сергей Григорьевич, д-р биол. наук, профессор, главный научный сотрудник ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» Минобрнауки, 601125, Россия, Москва. E-mail: [patronn13@rambler.ru](mailto:patronn13@rambler.ru)

**Участие авторов:** Поволяева О.С. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка, написание текста; Юрков С.Г. – концепция и дизайн исследования, написание текста; Лаптева О.Г. – сбор и обработка материала; Колбасова О.Л. – сбор и обработка материала; Чадаева А.А. – сбор и обработка материала; Кольцов А.Ю. – сбор и обработка материала; Синдрякова И.П. – сбор и обработка материала; Власов М.Е. – сбор и обработка материала; Живодёров С.П. – сбор и обработка материала; Луницин А.В. – сбор и обработка материала.

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

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

Поступила 18.09.2020

Принята в печать 12.11.2020

## Biological characteristics and permissiveness to viruses of diploid kidney cells strain from the bat *Nathusius' pipistrelle* (*Pipistrellus nathusii* Keyserling & Blasius, 1839; *Chiroptera: Microchiroptera: Vespertilionidae*)

Ol'ga S. Povolyaeva, Sergey G. Yurkov, Oksana G. Lapteva, Ol'ga L. Kolbasova, Anna A. Chadaeva, Andrey Yu. Kol'tsov, Irina P. Sindryakova, Mikhail E. Vlasov, Sergey P. Zhivoderov, Andrey V. Lunitsin

FSBRI «Federal Research Center for Virology and Microbiology» of the Ministry of Science and Higher Education of Russia, 601125, Vladimir region, Vol'ginsky vill., Russia

**Introduction.** Bats are an epidemiologically important natural reservoir of viruses of various taxonomic groups, including causative agents of especially dangerous infections of humans and animals. Considering the relevance of arbovirus infections, it seems advisable to study the spectrum of the sensitivity of cells derived from bats inhabiting and migrating on the territory of the Russian Federation to causative agents of vector-borne diseases of animals. The study aimed to obtain a diploid strain of cells from renal tissue of bats *Pipistrellus nathusii* and to investigate its biological characteristics, as well as to assess its permissiveness for bluetongue (BTV); Rift Valley fever (RVFV); lumpy skin disease (LSDV); rabbit myxoma (Myxomatosis cuniculi); rabbit, or Shope fibroma (RFV); African horse sickness (AHSV) and African swine fever (ASFV) viruses.

**Material and methods.** There were 2 clinically healthy male individuals of *P. nathusii* who taken as donors of organs. To obtain diploid kidney cell culture strain and to study its properties, the level of the 6<sup>th</sup> passage was investigated by conventional cytological, virological, and molecular methods. The permissiveness of the obtained cell culture for BTV, RVFV, LSDV, Myxomatosis cuniculi, RFV, AHSV and ASFV was determined.

**Results.** The formation of a confluent monolayer was observed after 72 hours, while the proliferation index was 2.7–3.3. The cell monolayer had been maintained without changing the medium for 45 days (observation period). The stability of the karyotype had been demonstrated in continuous subculturing at the 36<sup>th</sup> passage. The cell culture named «Diploid cell line *Pipistrellus nathusii* kidney», and its permissiveness to BTV, RVFV, LSDV and Myxomatosis cuniculi had been demonstrated.

**Discussion.** The sensitivity of the strain to BTV and RVFV is consistent with the data on the identification of reovirus and RVFV in Egyptian fruit bats (*Rousettus aegyptiacus*), and its permissiveness for LSDV and rabbits myxoma virus is consistent with the results of detection of poxviruses in big brown bat (*Eptesicus fuscus*).

**Conclusion.** A diploid kidney cell strain derived from *P. nathusii* was obtained and certified. Its permissiveness to BTV, RVFV, LSDV and rabbits myxoma viruses makes it possible to use this strain for isolation and studies of these viruses. Reproduction of the viruses in diploid kidney cells strain derived from *P. nathusii* living and migrating in the European part of the Russian Federation indicates their potential role in the epidemiology of significant infections, especially transmissible ones.

**Key words:** bat; diploid cell strain; virus; highly dangerous infectious diseases

**For citation:** Povolyaeva O.S., Yurkov S.G., Lapteva O.G., Kolbasova O.L., Chadaeva A.A., Kol'tsov A.Yu., Sindryakova I.P., Vlasov M.E., Zhivoderov S.P., Lunitsin A.V. Biological characteristics and permissiveness to viruses of diploid kidney cells strain from the bat *Nathusius' pipistrelle* (*Pipistrellus nathusii* Keyserling & Blasius, 1839; *Chiroptera: Microchiroptera: Vespertilionidae*). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(1): 29-39 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-12>

**For correspondence:** Sergey G. Yurkov, Ph.D., D.Sci. (Biol.), Prof., Chief Researcher, FSBRI «Federal Research Center for Virology and Microbiology» of the Ministry of Science and Higher Education of Russia. E-mail: [patronn13@rambler.ru](mailto:patronn13@rambler.ru)

### Information about the authors:

Povolyaeva O.S., <http://orcid.org/0000-0002-5635-6677>

Yurkov S.G., <http://orcid.org/0000-0002-6801-9424>

Lapteva O.G., <http://orcid.org/0000-0002-4435-8368>

Kolbasova O.L., <http://orcid.org/0000-0001-5153-0982>

Chadaeva A.A., <http://orcid.org/0000-0002-9615-9758>

Kol'tsov A.Yu., <http://orcid.org/0000-0003-3294-6602>

Sindryakova I.P., <http://orcid.org/0000-0002-5947-9402>

Vlasov M.E., <http://orcid.org/0000-0002-8324-3256>

Zhivoderov S.P., <http://orcid.org/0000-0002-4919-3080>

Lunitsin A.V., <http://orcid.org/0000-0002-5043-446X>

**Contribution:** Povolyaeva O.S. – research conception and design of the study, collecting and processing of the results, statistical processing of the results, writing of the text; Yurkov S.G. – research conception and design of the study; Lapteva O.G. – collecting and processing of the results; Kolbasova O.L. – collecting and processing of the results; Chadaeva A.A. – collecting and processing of the results; Koltsov A.Yu. – collecting and processing of the results; Sindryakova I.P. – collecting and processing of the results; Vlasov M.E. – collecting and processing of the results; Zhivoderov S.P. – collecting and processing of the results, Lunitsin A.V. – collecting and processing of the results.

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

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

Received 18 September 2020

Accepted 12 November 2020

## Введение

Возникновение и распространение новых вирусных заболеваний человека и животных интенсифицировало исследования в области поиска источников, переносчиков и резервуаров вирусов, а также эволюции и изменчивости этих патологических агентов, установления механизмов преодоления ими видовых барьеров. Рукокрылые (*Chiroptera*), насчитывающие свыше 1200 видов, являются вторым по величине отрядом млекопитающих [1], что наряду с высокой популяционной плотностью, широчайшим ареалом распространения, миграционной подвижностью и особенностями организации иммунной системы [2] позволяет рассматривать их как один из важнейших естественных резервуаров и источников распространения вирусных агентов [3–5]. Изоляция от летучих мышей (*Microchiroptera*) более 200 видов вирусов различных таксономических групп [6] подтвердила значение этих представителей рукокрылых как важнейшего звена эпидемического процесса при ряде особо опасных инфекционных болезней [7].

Установлено, что летучие мыши в большинстве биогеографических регионов, включая Западную Палеарктику, выступают естественным резервуаром для вирусов многих значимых семейств, таких как *Rhabdoviridae* [8, 9], *Coronaviridae* [10], *Herpesviridae*, *Adenoviridae* [11], *Filoviridae* [12], *Reoviridae* [13], *Paramyxoviridae* [14–16], *Astroviridae* и др. [17]. В то же время роль этих животных в эпидемиологии вирусных инфекций для Российской Федерации изучена недостаточно.

Следует отметить, что в подавляющем большинстве работ по идентификации вирусов летучих мышей основным инструментом исследований стали молекулярно-генетические методы, однако сам факт идентификации, в свою очередь, указывает также на высокий уровень перmissивности клеток тканей данных представителей млекопитающих к вирусам различных таксономических групп.

Основной лабораторной моделью первичной изоляции вирусных патогенов являются культуры клеток. Тем не менее в случаях, когда в качестве источника инфекции рассматриваются летучие мыши, использование традиционных систем культивирования на клеточных культурах видов, не являющихся резервуарами, как правило, является малопродуктивным. По данным ряда исследователей, попытки выделить инфекционные агенты, переносимые летучими мышами, в различных линиях клеток мле-

копитающих в большинстве случаев не увенчались успехом [18].

Исследования по оценке чувствительности клеточного материала из тканей летучих мышей к патогенам немногочисленны и выполнены только для ряда видов, в основном связанных с возбудителями вирусных болезней человека [12]. Одной из первых клеточных культур, полученных из тканей летучих мышей, была культура клеток лёгкого вида *Tadarida brasiliensis* Tb 1 Lu (ATCC CCL-88), которая оказалась чувствительной к ретровирусу лейкоза КРС [19], вирусу энцефаломиокардита мышей, вирусу Эбола [20], возбудителям гриппа человека и птиц [21].

В связи со вспышками новых особо опасных болезней, ассоциированных с летучими мышами в качестве резервуаров возбудителей (Эбола, Хендра, Нипах, SARS, MERS, SARS-CoV-2), значительно расширились исследования по получению культур клеток из тканей различных видов представителей рукокрылых как для непосредственно вирусологических целей [22–25], так и для изучения иммунологических аспектов устойчивости этих млекопитающих к вирусным инфекциям и механизмов взаимодействия вирус–клетка [26, 27].

Кроме того, данные по чувствительности *in vitro* клеточных культур из тканей и органов летучих мышей могут быть экстраполированы на процессы оценки восприимчивости их хозяев к патогенам, исследование возможности вирусносительства и участия данных животных в формировании природных инфекционных очагов [28]. Поэтому целью этой работы явились получение диплоидного штамма клеток почки летучей мыши (ПЛМ) – представителя семейства *Vespertilionidae*, вида *Pipistrellus nathusii* как многочисленного, широко распространённого в европейской части России, склонного к антропоургической среде обитания, не находящегося в зоне риска и в то же время совершающего миграции, а также изучение перmissивности полученной культуры к ряду вирусов – возбудителей инфекционных заболеваний животных.

## Материал и методы

**Животные.** В экспериментах использованы летучие мыши вида нетопырь лесной, или нетопырь Натузиуса (*Pipistrellus nathusii*), отловленные при помощи туман-сети в Волгоградской области. В качестве доноров почек были отобраны 2 клинически здоровых самца с массой тела 10 и 12 г.

**Культура клеток.** Исследования выполняли с полученным нами диплоидным штаммом культуры клеток почки нетопыря лесного (Diploid cell line *Pipistrellus nathusii* kidney) градации 6-го и последующих пассажных уровней.

**Вирусы.** Определялась перmissивность клеточной культуры к следующим вирусным агентам:

- Вирус блютанга (семейство *Reoviridae*) 1-го серотипа 6-го пассажа в перевиваемой линии клеток почки африканской зелёной мартышки (*Chlorocebus sabaeus*) Веро с инфекционной активностью (ИА) 6,25 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл (ТЦД – титр цитопатического действия, ЦПД).

- Вирус лихорадки долины Рифт (ЛДР, семейство *Phenuiviridae*), штамм «1974-ВНИИВВиМ» на уровне 10-го пассажа в перевиваемой линии клеток почки сайги (*Saiga tatarica*) (ПС) с ИА 5,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.

- Вирус заразного узелкового дерматита (ЗУД) крупного рогатого скота (КРС) (семейство *Poxviridae*) – полевой изолят, выделенный в очаге инфекции в Самарской области на уровне 5-го пассажа в первичной культуре клеток тестикул козлёнка (*Capra hircus*) (ТК), ИА 6,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.

- Вирус африканской чумы лошадей (АЧЛ, семейство *Reoviridae*) 1-го серотипа на уровне 5-го пассажа в перевиваемой линии клеток почки африканской зелёной мартышки (CV-1) с ИА 5,75 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.

- Вирус африканской чумы свиней (АЧС, семейство *Asfarviridae*), штамм «Волгоград» на уровне 4-го пассажа в культуре клеток костного мозга свиньи (*Sus scrofa domesticus*) с ИА 7,25 lg ГАЕ<sub>50</sub>/мл (ГАЕ – гемагглютинирующая единица).

- Вирус фибромы Шоупа (семейство *Poxviridae*), патогенный для кроликов (*Oryctolagus*), выделен из патологического материала с ИА на кроликах на уровне 5-го пассажа 4,11 lg ИД<sub>50</sub>/мл (ИД – инфицирующая доза).

- Вирус миксомы кроликов (семейство *Poxviridae*), штамм В-82 на уровне 3-го пассажа в перевиваемой линии клеток почки кролика РК-13/2-03, ИА – 6,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.

Используемые штаммы вирусов получали из Государственной коллекции микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в том числе зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии» («ФИЦВиМ») (реестровый номер центра коллективного пользования (ЦКП) – 441429, <http://ckp-rf.ru/ckp/441429/>).

**Питательные среды и растворы.** Для культивирования клеток в качестве ростовой среды применяли питательные среды Игла MEM и DMEM («HyClone», США) с добавлением 10% фетальной сыворотки крови КРС (FBS) («HyClone») и антибиотиков (ципрофлоксацин и амфотерицин в конечной концентрации 10 и 5 мкг/мл соответственно).

Первичную клеточную культуру почки получали методом стандартной трипсинизации с использованием 0,25% раствора трипсина и 0,02% раствора Версена. Субкультуры клеток ПЛМ поддерживали общепринятой методикой последовательных пересевов

при температуре  $37 \pm 0,5$  °С в атмосфере с повышенным до 5% содержанием углекислого газа и относительной влажности 95%.

Криоконсервирование клеток проводили в ростовой среде с добавлением криопротектора – 10% DMSO (Dimethyl Sulfoxide for cell culture), «Sigma», США) с эквilibрацией при 4 °С в течение 60 мин и последующим быстрым замораживанием при –70 °С; через 14 сут клетки подвергали глубокому замораживанию в жидком азоте (–196 °С).

Для кариологического исследования клеточную культуру на стадии активного роста инкубировали в среде с колхицином (0,05 мкг/мл среды) в течение 2 ч. Клетки диспергировали смесью 0,02% раствора Версена и 0,25% раствора трипсина в соотношении 7 : 1, подогретой до  $37,0 \pm 1,0$  °С. Проводили гипотоническую обработку клеток в суспензии (1 часть FBS и 4 части дистиллированной воды) и выдерживали в термостате 25–40 мин, фиксировали в смеси метанола с ледяной уксусной кислотой в соотношении 3 : 1, наносили на поверхность предметных стёкол и окрашивали 2% водным раствором красителя Романовского–Гимзы [29, 30].

Для определения перmissивности полученных клеток соответствующий вирусный материал инокулировали в культуральные флаконы (по 5 для каждого вируса) с конфлюэнтным клеточным монослоем, для чего из флаконов удаляли ростовую среду и вносили вирус в дозе 0,1–0,01 ТЦД<sub>50</sub>/кл. Адсорбцию последнего проводили в течение 60 мин. Затем вносили поддерживающую среду, содержащую 2% FBS, и инфицированные культуры инкубировали при  $37,0 \pm 0,5$  °С до наступления выраженного ЦПД вируса. Перmissивность клеток к возбудителям миксомы кроликов и фибромы Шоупа определяли при множественности заражения 0,5–0,7 и 0,001–0,002 ИД<sub>50</sub>/кл соответственно (ИД – инфекционная доза). Адсорбцию и культивирование вируса осуществляли при  $33,0 \pm 0,5$  °С.

Инфекционную активность устанавливали путём титрования в перmissивных для каждого патогена клеточных культурах, учитывали развитие ЦПД; титр вируса рассчитывали по методике Рида и Менча в модификации Ашмарина.

Идентификация вируса блютанга, полученного в культуре штамма диплоидных клеток ПЛМ вида *P. nathusii*, проведена методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. Идентификация полевого изолята вируса ЗУД КРС осуществлена путём ПЦР в реальном времени по методике Bowden T.R. и соавт. [31] с олигонуклеотидными праймерами CaPV-074F1 (5'-AAA ACG GTA TAT GGA ATA GAG TTG GAA-3'), CaPV-074R1 (5'-AAA TGA AAC CAA TGG ATG GGA TA-3') и гибридизационным зондом CaPV-074P1 (5'-6FAM-TGG CTC ATA GAT TTC CT-MGB-NFQ-3').

Результаты обрабатывали статистически с использованием программы Microsoft Excel 2010. Достоверность статистической разницы между средними величинами определяли по разностному методу Стьюдента–Фишера.



**Рис. 1.** Летучая мышь, самец, вид нетопырь Натузиуса (*Pipistrellus nathusii*).

**Fig. 1.** Bat male of *Nathusius' pipistrelle* (*Pipistrellus nathusii*).

### Результаты

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с российским законодательством и рекомендациями этического комитета ФГБНУ «ФИЦВиМ» (Владимирская область, пос. Вольгинский).

#### Получение первичных культур клеток

Летучие мыши вида *P. nathusii* (**рис. 1**) были отловлены с использованием туман-сети в Волгоградской области и доставлены в лабораторию ФГБНУ «ФИЦВиМ».

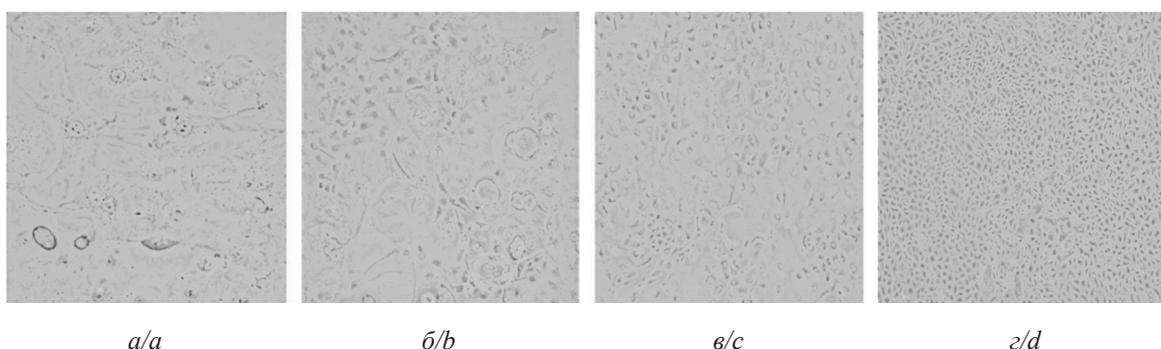
Эвтаназию животных осуществляли путём внутрибрюшинного введения 0,5 мл 70% этилового спирта и цервикальной дислокацией шейных позвонков через 2 мин после остановки сердца [32]. При вскрытии отделяли почки, которые помещали в отдельные ёмкости, содержащие среду Игла MEM с добавлением антибиотиков (20 мкг/мл ципрофлоксацина и 5 мкг/мл амфотерицина В). После удаления почечных лоханок и мозгового вещества корковый слой почек механически измельчали на фрагменты размером около 2–3 мм<sup>3</sup> и отмывали от крови 4 раза средой Игла MEM до получения прозрачных сливов. Затем материал переносили в коническую плоскодонную колбу объёмом 500 мл

и заливали смесью 0,25% раствора трипсина и 0,02% раствора Версена в соотношении 2 : 1 при температуре 37 °С. Ферментативную дезагрегацию осуществляли посредством перемешивания тканевой суспензии на магнитной мешалке в течение 15 мин. После интенсивного помутнения диспергирующего раствора колбу снимали с мешалки, давали отстояться в течение 2 мин и сливали клеточную суспензию во флакон объёмом 500 мл. Данную процедуру повторяли 3 раза до полного истощения ткани. К клеткам в диспергирующем растворе добавляли FBS для нейтрализации трипсина.

В дальнейшем полученную суспензию центрифугировали при 700 g в течение 10 мин, надосадочную жидкость декантировали, а осадок с клетками ресуспендировали в 25 мл ростовой среды. Клеточную суспензию фильтровали через марлевый фильтр для удаления не подвергшихся воздействию трипсина фрагментов почечной ткани, тщательно перемешивали и отбирали пробу суспензии для подсчёта клеточных элементов в камере Горяева. Жизнеспособность клеток по тесту витального окрашивания трипановым синим составила 78–81%. Клеточную суспензию доводили до посевной концентрации 400 тыс. кл/мл ростовой средой и разливали в пластиковые флаконы площадью 25 см<sup>2</sup> («Corning», США). После 24 ч культивирования клеточный монослой промывали средой с антибиотиками, удаляя не прикрепившиеся и мёртвые клетки, после чего проводили смену ростовой питательной среды. В дальнейшем среду меняли каждые 2–3 сут.

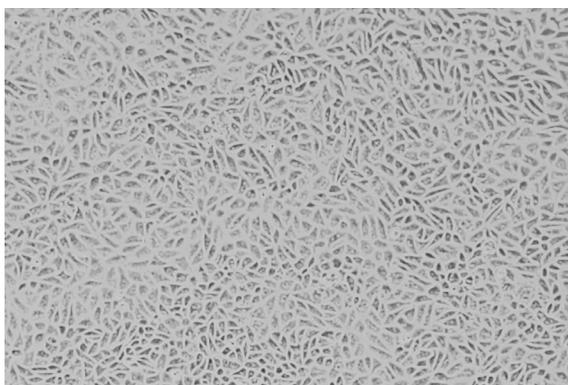
Последовательные пересевы клеточной культуры осуществляли с использованием одних и тех же серий питательной среды и сыворотки (DMEM 90% и FBS – 10%).

Первично-трипсинизированная культура была представлена разнородными в морфологическом отношении клеточными популяциями с преимущественным преобладанием эпителиоподобных клеток (**рис. 2**), образующих вначале островковый клеточный рост, и формированием конфлюэнтного монослоя на 5-е сут культивирования.



**Рис. 2.** Первично-трипсинизированная культура клеток почки летучей мыши *Pipistrellus nathusii*: *a* – через 24 ч культивирования, *б* – через 72 ч культивирования, *в* – спустя 24 ч после 1-го субпассажа, *г* – конфлюэнтный монослой 2-го пассажа (микрофотография, увеличение  $\times 150$ ).

**Fig. 2.** Primary trypsinized cell culture of *Pipistrellus nathusii* kidney: *a* – after 24 hs of cultivation, *b* – after 72 hs of cultivation, *c* – in 24 hs after the 1<sup>st</sup> subpassage, *d* – confluent monolayer of the 2<sup>nd</sup> passage (microphotograph, magnification  $\times 150$ ).



**Рис. 3.** Монослой культуры клеток почки летучей мыши *Pipistrellus nathusii* на уровне 5-го пассажа (микрофотография, увеличение  $\times 150$ ).

**Fig. 3.** Monolayer of the kidney cell culture of the bat *Pipistrellus nathusii* at the 5<sup>th</sup> passage level (microphotograph, magnification  $\times 150$ ).

Дальнейшее культивирование клеток проводили с пересевом 2–3 раза в неделю. При посевной концентрации 120–150 тыс. кл/мл формирование конфлюэнтного монослоя наблюдали через 72 ч, при этом индекс пролиферации (ИП) составлял 2,7–3,3. Клеточный монослой без признаков дегенерации клеток и проявлений ЦПД сохранялся без смены среды на протяжении 45 сут (срок наблюдения).

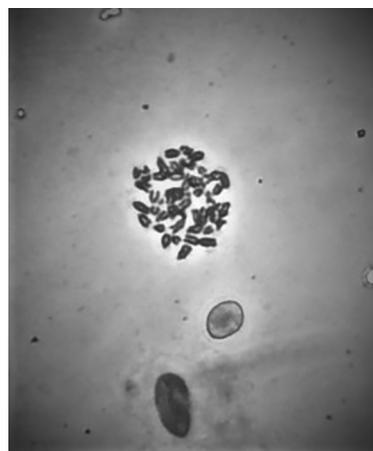
При морфологическом изучении субкультур установлено, что монослой культуры ПЛМ представлен преимущественно эпителиоподобными полигональными клетками с ядром овальной или эллипсовидной, реже округлой формы с 1–3 (иногда больше) округлыми ядрышками, варьирующими по размеру. Ядерный матрикс равномерный. При пассировании клеточный монослой сохранял характерную типичную морфологию (**рис. 3**).

В результате последовательных пересевов в среде Игла DMEM с 10% FBS получены субкультуры, и на уровне 4-, 10-, 13-, 18-, 20-, 22-, 28- и 33-го пассажей созданы криобанки данной культуры в жидком азоте.

После размораживания на нулевом пассаже жизнеспособность клеток по тесту витального окрашивания трипановым синим составляла от 78 до 85%, клеточный монослой формировался на 2-е сут культивирования и был представлен типичными эпителиоподобными клетками.

Целями кариологического анализа культуры клеток почки нетопыря лесного (*P. nathusii*) стали как подтверждение видовой принадлежности, так и оценка стабильности хромосомного набора клеток в условиях длительного культивирования.

Как отмечено рядом исследователей, виды рода *Pipistrellus* обладают значительным внутривидовым кариологическим полиморфизмом и внутривидовой стабильностью [33]. Количество хромосом в их клетках варьирует от 26 до 44, а число плеч аутосом (NFa) – от 44 до 56 [34], поэтому хромосомные характеристики для представителей этого рода являются надёжным видовым признаком.



**Рис. 4.** Метафазная пластинка культуры клеток почки летучей мыши *Pipistrellus nathusii* (микрофотография, увеличение  $\times 900$ ).

**Fig. 4.** Metaphase plate of the kidney cell culture of the bat *Pipistrellus nathusii* (microphotograph, magnification  $\times 900$ ).

Анализ 50 метафазных пластинок клеточной культуры, проведённый на 2-м и 3-м пассажных уровнях после криоконсервации и на уровне 36-го пассажа – в условиях непрерывного субкультивирования, показал, что модальный класс хромосом культуры клеток соответствует диплоидному набору ( $2n = 44$ ) данного вида при NFa = 50. Полученные результаты согласуются с данными хромосомного анализа ряда других представителей рода *Pipistrellus*, таких как кожановидный нетопырь (*Pipistrellus savii koreensis*) и средиземноморский нетопырь, или нетопырь Куля (*P. Kuhli*) [35, 36].

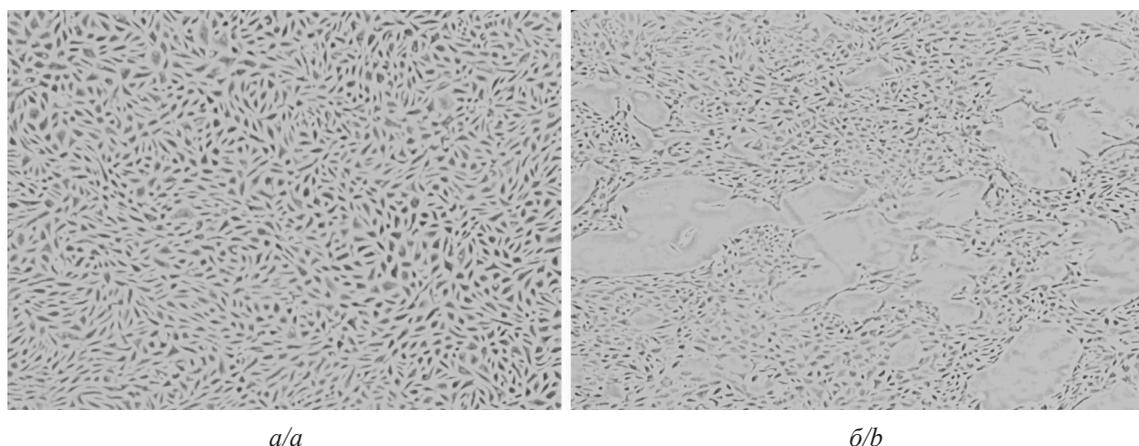
Кариологические исследования культуры клеток ПЛМ на уровне 36-го пассажа в условиях непрерывного субкультивирования показали стабильность кариотипа, который сохранял как диплоидный набор хромосом, так и отсутствие хромосомных перестроек и образования маркерных хромосом (**рис. 4**).

По совокупности цитоморфологических, ростовых и кариологических показателей начиная с 6-го пассажа клеточная культура соответствовала характеристике диплоидного штамма и получила наименование «Штамм диплоидных клеток почки летучей мыши *Pipistrellus nathusii* (Diploid cell line *Pipistrellus nathusii* kidney)».

При изучении чувствительности штамма диплоидных клеток ПЛМ *P. nathusii* к вирусу блютанга с множественностью заражения 0,1–0,01 ТЦД<sub>50</sub>/кл на 2-е сут отмечено незначительное ЦПД в виде формирования тяжёлой из веретенообразных клеток. На 3-и сут наблюдали округление и отслоение инфицированных клеток от подложки с лизисом и деструкцией клеточного монослоя. В контрольной культуре подобных изменений не выявлено (**рис. 5**).

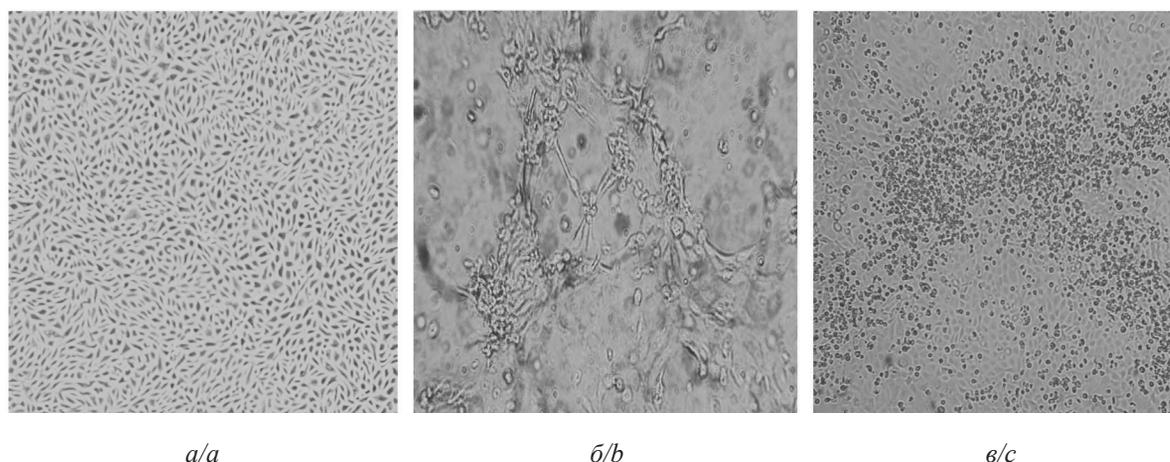
ИА вируса, полученного в исследуемой культуре, при титровании в 2-суточной культуре перевиваемой линии клеток почки африканской зелёной мартышки (Vero) составила 5,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.

Для определения чувствительности к возбудителю ЛДР вирус с множественностью заражения 0,1–



**Рис. 5.** Цитопатическое действие вируса блютанга в культуре штамма диплоидных клеток почки летучей мыши *Pipistrellus nathusii*, 12-й пассаж: *a* – контрольная клеточная культура, *б* – культура клеток на 3-и сут после заражения (микрофотография, увеличение  $\times 150$ ).

**Fig. 5.** Cytopathic effect of BTV in the culture of the diploid kidney cell strain of the bat *Pipistrellus nathusii*, 12<sup>th</sup> passage: *a* – control cell culture, *b* – cell culture in 3 days after infection (microphotograph, magnification  $\times 150$ ).



**Рис. 6.** Цитопатическое действие вируса ЛДР в культуре штамма диплоидных клеток почки летучей мыши *Pipistrellus nathusii* 12-го пассажа: *a* – контрольная культура клеток, *б* – культура клеток на 3-и сут после заражения, *в* – культура клеток на 5-е сут после заражения (микрофотография, увеличение  $\times 150$ ).

**Fig. 6.** Cytopathic effect of RVFV in the culture of the diploid kidney cell strain of the bat *Pipistrellus nathusii*, 12<sup>th</sup> passage: *a* – control cell culture, *b* – cell culture on day 3 after infection, *c* – cell culture on day 5 after infection (microphotograph, magnification  $\times 150$ ).

0,01 ТЦД<sub>50</sub>/кл инокулировали в культуральные флаконы с конфлюэнтным монослоем штамма диплоидных клеток ПЛМ *P. nathusii*. На 3-и сут инкубации отмечены начальные признаки развития ЦПД в виде появления тяжелой веретенообразных клеток. На 5-е сут имели место округление и отслоение инфицированных клеток от подложки на фоне лизиса и деструкции клеточного монослоя. В контрольной культуре подобных изменений также не зарегистрировано (**рис. 6**).

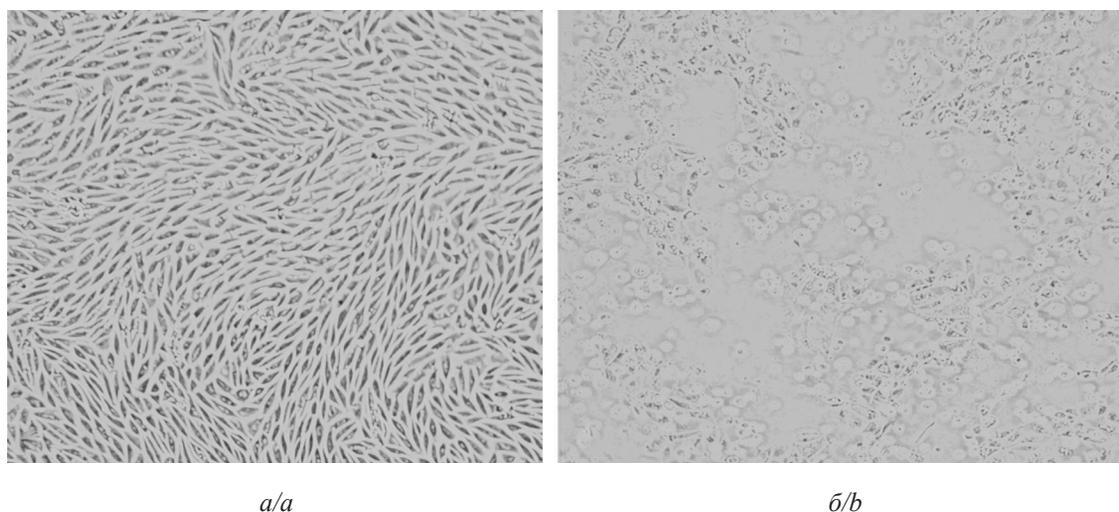
Значение ИА возбудителя ЛДР при титровании в 2-суточной культуре перевиваемой клеточной линии Vero было равным 5,25 лг ТЦД<sub>50</sub>/мл.

Изучение перmissивности полученного штамма к вирусу ЗУД КРС проводили в отношении полевого изолята, выделенного с использованием первичной культуры клеток ТК. Как и в вышеописанных опытах, вирус ЗУД вызывал в исследуемой культуре раз-

витие ЦПД на 3-и сут, выражающегося в формировании тяжей из веретенообразных клеток. На 5-е сут наблюдали округление и отслоение инфицированных клеток от подложки, а также лизис и деструкцию клеточного монослоя. В контрольной культуре аналогичных изменений не отмечено (**рис. 7**).

Показатель ИА полевого изолята вируса ЗУД, полученного на 5-е сут культивирования в исследуемой культуре, составил 5,25 лг ТЦД<sub>50</sub>/мл.

Исследование перmissивности клеточного материала ПЛМ *P. nathusii* к возбудителям АЧЛ и АЧС показало, что клетки культуры не поддерживали репродукцию этих вирусов. На протяжении 10 сут наблюдения клеточный монослой инфицированных культур морфологически не отличался от контрольных, а тест-культуры (CV-1 и лейкоциты свиньи соответственно) не показали нарастания ИА в материалах заражённых культур клеток.



**Рис. 7.** Цитопатическое действие вируса ЗУД КРС в культуре штамма диплоидных клеток почки летучей мыши *Pipistrellus nathusii* 10-го пассажа: *a* – контрольная клеточная культура, *б* – культура клеток на 3-и сут после заражения (микрофотография, увеличение  $\times 150$ ).

**Fig. 7.** Cytopathic effect of LSDV in the culture of the diploid kidney cell strain of a bat *Pipistrellus nathusii*, 10<sup>th</sup> passage: *a* – control cell culture, *b* – cell culture in 3 days after infection (microphotography, magnification  $\times 150$ ).

В инфицированной вирусом миксомы кроликов (*Mухоматозис сункули*) исследуемой культуре на 3-и сут инкубирования наблюдали ЦПД вируса в виде образования стяжек (**рис. 8**). На 5-е сут отмечали округление и отслоение инфицированных клеток от подложки, деструкцию клеточного монослоя.

Значение ИА вируса миксомы кроликов, полученного в исследуемой культуре, было равным  $4,25 \pm 0,25 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{мл}$ .

Исследование перmissивности полученных клеток к вирусу фибромы Шоупа проводили на кроликах с патогенным для них изолятом возбудителя, выделенным из патологического материала, с ИА на уровне 5-го пассажа  $4,11 \text{ lg ИД}_{50}/\text{мл}$ . Методом ПЦР подтверждена аутентичность использованного вируса.

Результаты определения вирусрепродуцирующей способности культуры штамма диплоидных клеток ПЛМ *P. nathusii* в отношении вирулентного вируса фибромы Шоупа показали отсутствие развитие цитопатического эффекта, а титр ИА не превышал введённую дозу инфекционного агента.

### Обсуждение

Изучение спектра чувствительности клеток из тканей летучих мышей, обитающих и мигрирующих на территории Российской Федерации, к вирусам векторных инфекций сельскохозяйственных животных, для которых имеет место риск заноса и распространения, является актуальным, в особенности для возбудителей трансмиссивных вирусных болезней.

Все разновидности летучих мышей, обитающих в России (около 40 видов), – насекомоядные. По оценкам специалистов, 1 особь в течение 1 ч охоты съедает до 200 комаров, которые, в свою очередь, могут выступать переносчиками возбудите-

лей многих трансмиссивных заболеваний. Ежегодная миграция части популяций летучих мышей средней полосы РФ на юг простирается на ареал Средиземного и Чёрного морей, Закавказья, северного Ирана и северной Турции ([http://vertebrata.ru/index/lesnoj\\_netopyr/0-407](http://vertebrata.ru/index/lesnoj_netopyr/0-407)), в том числе на регионы, стационарные по особо опасным болезням сельскохозяйственных животных. Данные по изоляции патогенов от летучих мышей в различных регионах мира (включая вирусы особо опасных болезней) указывают на необходимость подобных исследований для РФ, где роль рукокрылых в распространении возбудителей указанных болезней не получила достаточного экспериментального подтверждения.

Полученный штамм диплоидных клеток ПЛМ *P. nathusii* сохранял цитоморфологические, ростовые и кариологические характеристики на протяжении 36 пассажей (срок наблюдения), что позволило создать крупный криобанк этих клеток на разных пассажных уровнях и оценить их перmissивность к вирусам – возбудителям экономически значимых и карантинных заболеваний.

Показатели чувствительности полученной клеточной культуры к вирусам блютанга и ЛДР согласуются с данными об идентификации реовируса и возбудителя ЛДР у египетских фруктовых летучих мышей [37, 38], а перmissивность полученного штамма диплоидных клеток ПЛМ *P. nathusii* к вирусам ЗУД КРС и миксомы кроликов (*Мухоматозис сункули*) соответствует результатам обнаружения поксвирусов у летучих мышей вида поздний кожан (*Eptesicus fuscus*) [39]. Кроме того, данный клеточный штамм также может быть использован для выделения и изучения вирусных патогенов – возбудителей инфекционных болезней человека.

## Выводы

1. Впервые получен и паспортизирован штамм диплоидных клеток ПЛМ *Pipistrellus nathusii*. Создан криобанк этого штамма на разных пассажных уровнях для вирусологических исследований.

2. Установлена перmissивность полученного клеточного штамма к вирусам блютанга, ЛДР, ЗУД, миксома кроликов. Данная культура клеток оказалась нечувствительной к возбудителям АЧЛ, АЧС и фибромы Шоупа.

3. Методом ПЦР подтверждена таксономическая принадлежность полевых изолятов вирусов ЗУД и фибромы Шоупа, используемых в экспериментальной работе с культурой клеток летучей мыши.

4. Репродукция возбудителей трансмиссивных болезней сельскохозяйственных животных в клетках диплоидного штамма из тканей летучей мыши *P. nathusii*, обитающей и мигрирующей на территории европейской части Российской Федерации, свидетельствует о возможности вирусоносительства представителями указанного вида, а также их потенциальном участии в эпидемическом процессе в качестве переносчиков вирусов из сопредельных с РФ территорий. Это, в свою очередь, позволяет говорить о роли данных животных в формировании природных резервуаров инфекций.

## ЛИТЕРАТУРА

- IUCN SSC Bat Specialist Group. Available at: <https://www.iucn.org/commissions/ssc-groups/mammals/specialist-groups-a-e/bat> (accessed January 18, 2021).
- Baker M.L., Schountz T., Wang L.F. Antiviral immune responses of bats: a review. *Zoonoses Public Health*. 2013; 60(1): 104–16. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01528.x>.
- Calisher C.H., Childs J.E., Field H.E., Holmes K.V., Schountz T. Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19(3): 531–45. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06>.
- Wang L.F., Walker P.J., Poon L.L. Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: are bats 'special' as reservoirs for emerging viruses? *Curr. Opin. Virol.* 2011; 1(6): 649–57. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.013>.
- Drexler J.F., Corman V.M., Wegner T., Tateno A.F., Zerbini R.M., Gloza-Rausch F., et al. Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(3): 449–56. <https://doi.org/10.3201/eid1703.100526>.
- Moratelli R., Calisher C.H. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2015; 110(1): 1–22. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150048>.
- Макаров В.В., Лозовой Д.А. Вирусы и рукокрылые. Эпидемиологические особенности восприимчивости. *Пест-Менеджмент*. 2017; (4): 13–22.
- Vázquez-Morón S., Juste J., Ibáñez C., Berciano J.M., Echevarría J.E. Phylogeny of European Bat Lyssavirus 1 in *Eptesicus isabellinus* Bats, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(3): 520–3. <https://doi.org/10.3201/eid1703.100894>.
- Ceballos N.A., Morón S.V., Berciano J.M., Nicolás O., López C.A., Juste J., et al. Novel lyssavirus in Bat, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(5): 793–5. <https://doi.org/10.3201/eid1905.121071>.
- Ge X.Y., Li J.L., Yang X.L., Chmura A.A., Zhu G., Epstein J.H., et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*. 2013; 503(7477): 535–8. <https://doi.org/10.1038/nature12711>.
- Jánoska M., Vidovszky M., Molnár V., Liptovszky M., Harrach B., Benkő M. Novel adenoviruses and herpesviruses detected in bats. *Vet. J.* 2011; 189(1): 118–21. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.06.020>.
- Leroy E.M., Kumulungui B., Pourrut X., Rouquet P., Hassanin A., Yaba P., et al. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*. 2005; 438(7068): 575–6. <https://doi.org/10.1038/438575a>.
- Kohl C., Lesnik R., Brinkmann A., Ebinger A., Radonić A., Nitsche A., et al. Isolation and characterization of three mammalian orthoreoviruses from European bats. *PLoS One*. 2012; 7(8): e43106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043106>.
- Chua K.B., Koh C.L., Hooi P.S., Wee K.F., Khong J.H., Chua B.H., et al. Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes. *Microbes Infect.* 2002; 4(2): 145–51. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(01\)01522-2](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01522-2).
- Halpin K., Young P.L., Field H.E., Mackenzie J.S. Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(Pt. 8): 1927–32. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-8-1927>.
- Albariño C.G., Foltzer M., Towne J.S., Rowe L.A., Campbell S., Jaramillo C.M., et al. Novel paramyxovirus associated with severe acute febrile disease, South Sudan and Uganda, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(2): 211–6. <https://doi.org/10.3201/eid2002.131620>.
- Waruhiu C., Ommeh S., Obanda V., Agwanda B., Gakuya F., Ge X.Y., et al. Molecular detection of viruses in Kenyan bats and discovery of novel astroviruses, caliciviruses and rotaviruses. *Virol. Sin.* 2017; 32(2): 101–14. <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3930-2>.
- Zhang H., Todd S., Tachedjian M., Barr J.A., Luo M., Yu M., et al. A novel bat herpesvirus encodes homologues of major histocompatibility complex classes I and II, C-type lectin, and a unique family of immune-related genes. *J. Virol.* 2012; 86(15): 8014–30. <https://doi.org/10.1128/jvi.00723-12>.
- Graves D.C., Ferrer J.F. In vitro transmission and propagation of the bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. *Cancer Res.* 1976; 36(11 Pt. 1): 4152–9.
- Sandekian V., Lim D., Prud'homme P., Lemay G. Transient high level mammalian reovirus replication in a bat epithelial cell line occurs without cytopathic effect. *Virus Res.* 2013; 173(2): 327–35. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.01.010>.
- Slater T., Eckerle I., Chang K. Bat lung epithelial cells show greater host species-specific innate resistance than MDCK cells to human and avian influenza viruses. *Virol. J.* 2018; 15(1): 68. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0979-6>.
- Jordan I., Horn D., Oehmke S., Leendertz F.H., Sandig V. Cell lines from the Egyptian fruit bat are permissive for modified vaccinia Ankara. *Virus Res.* 2009; 145(1): 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.06.007>.
- Cramer G., Todd S., Grimley S., McEachern J.A., Marsh G.A., Smith C., et al. Establishment, immortalisation and characterisation of pteropid bat cell lines. *PLoS One*. 2009; 4(12): e8266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008266>.
- Banerjee A., Misra V., Schountz T., Baker M.L. Tools to study pathogen-host interactions in bats. *Virus Res.* 2018; 248: 5–12. <https://doi.org/10.1016>.
- Biesold S.E., Ritz D., Gloza-Rausch F., Wollny R., Drexler J.F., Corman V.M., et al. Type I interferon reaction to viral infection in interferon-competent, immortalized cell lines from the African fruit bat *Eidolon helvum*. *PLoS One*. 2011; 6(11): e28131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028131>.
- Zhou P., Chionh Y.T., Irac S.E., Ahn M., Jia Ng J.H., Fossum E., et al. Unlocking bat immunology: establishment of *Pteropus alecto* bone marrow-derived dendritic cells and macrophages. *Sci. Rep.* 2016; 6: 38597. <https://doi.org/10.1038/srep38597>.
- Irving A.T., Rozario P., Kong P., Luko K., Gorman J.J., Hastie M.L., et al. Robust dengue virus infection in bat cells and limited innate immune responses coupled with positive serology from bats in IndoMalaya and Australasia. *Cell. Mol. Life Sci.* 2020; 77(8): 1607–22. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03242-x>.
- Жуков В.А., Шишкина Л.Н., Сафатов А.С., Сергеев А.А., Пьянков О.В., Петрищенко В.А. и др. Валидация модифицированного алгоритма прогнозирования восприимчивости хозяина к вирусам с учетом параметров восприимчивости первичных культур клеток-мишеней и факторов врожденного иммунитета. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2010; (5): 24–9.
- Ford C.E., Hamerton J.L. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technol.* 1956; 31(6): 247–51. <https://doi.org/10.3109/10520295609113814>.
- Rothfels K.H., Siminovitch L. Air drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown in vitro. *Stain Technol.* 1958; 33(2): 73–7. <https://doi.org/10.3109/10520295809111827>.

31. Bowden T.R., Babiuk S.L., Parkyn G.R., Coppes J.S., Boylea D.B. Capripoxvirus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology*. 2008; 371 (2) 380–393. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.10.002>.
32. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals (Formerly AVMA Guidelines on Euthanasia): 2013 Edition. Available at: <https://www.avma.org/KB/Policies/Pages/Euthanasia-Guidelines.aspx> (accessed January 18, 2021).
33. Воронцов Н.Н., Раджабли С.И., Волобуев В.Т. Сравнительная кариология летучих мышей семейства Vespertilionidae (Chiroptera). В кн.: *Млекопитающие (эволюция, кариология, систематика, фаунистика)*. Новосибирск: Наука; 1969: 16–21.
34. Baker R.J. Karyotypic trends in bats. In: *Wimsatt W.A., ed. Biology of bats*. Academic Press Inc.: New York; 1970, 65–97. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-758001-2.50007-1>.
35. Park S.R., Won P.O. Chromosomes of Korean bats. *J. Mammal. Soc. Jpn.* 1978; (7): 199–203. <https://doi.org/10.11238/jmammsojapan.1952.7.1999>.
36. Дзуев Р.И., Хашкулова М.А., Боготова И.Х. Особенности хромосомного набора и промеров тела средиземноморского нетопыря (*Pipistrellus kuhli*) в условиях лесостепного пояса северного макросклона Центрального Кавказа. *Современные проблемы науки и образования*. 2016; (3): 390.
37. Balkema-Buschmann A., Rissmann M., Kley N., Ulrich R., Eiden M., Groschup M.H. Productive propagation of Rift valley fever phlebovirus vaccine strain MP-12 in Rousettus aegyptiacus fruit bats. *Viruses*. 2018; 10(12): 681. <https://doi.org/10.3390/v10120681>.
38. Fagre A.C., Lee J.S., Kityo R.M., Bergren N.A., Mossel E.C., Nakayiki T., et al. Discovery and characterization of Bukakata orbivirus (Reoviridae: Orbivirus), a novel virus from a Ugandan bat. *Viruses*. 2019; 11(3): 209. <https://doi.org/10.3390/v11030209>.
39. Emerson Ginny L., Nordhausen R., Garner M.M., Huckabee J.R., Johnson S., Wöhrle R.D., et al. Novel Poxvirus in big brown bats, Northwestern United States. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19(6): 1002–4. <https://doi.org/10.3201/eid1906.121713>.
11. Jánoska M., Vidovszky M., Molnár V., Liptovszky M., Harrach B., Benkő M. Novel adenoviruses and herpesviruses detected in bats. *Vet. J.* 2011; 189(1): 118–21. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.06.020>.
12. Leroy E.M., Kumulungui B., Pourrut X., Rouquet P., Hassanin A., Yaba P., et al. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*. 2005; 438(7068): 575–6. <https://doi.org/10.1038/438575a>.
13. Kohl C., Lesnik R., Brinkmann A., Ebinger A., Radonić A., Nitsche A., et al. Isolation and characterization of three mammalian orthoreoviruses from European bats. *PLoS One*. 2012; 7(8): e43106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043106>.
14. Chua K.B., Koh C.L., Hooi P.S., Wee K.F., Khong J.H., Chua B.H., et al. Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes. *Microbes Infect.* 2002; 4(2): 145–51. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(01\)01522-2](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01522-2).
15. Halpin K., Young P.L., Field H.E., Mackenzie J.S. Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(Pt. 8): 1927–32. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-8-1927>.
16. Albariño C.G., Foltzer M., Towne J.S., Rowe L.A., Campbell S., Jaramillo C.M., et al. Novel paramyxovirus associated with severe acute febrile disease, South Sudan and Uganda, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(2): 211–6. <https://doi.org/10.3201/eid2002.131620>.
17. Waruhiu C., Ommeh S., Obanda V., Agwanda B., Gakuya F., Ge X.Y., et al. Molecular detection of viruses in Kenyan bats and discovery of novel astroviruses, caliciviruses and rotaviruses. *Virology*. 2017; 511(2): 101–14. <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3930-2>.
18. Zhang H., Todd S., Tachedjian M., Barr J.A., Luo M., Yu M., et al. A novel bat herpesvirus encodes homologues of major histocompatibility complex classes I and II, C-type lectin, and a unique family of immune-related genes. *J. Virol.* 2012; 86(15): 8014–30. <https://doi.org/10.1128/jvi.00723-12>.
19. Graves D.C., Ferrer J.F. In vitro transmission and propagation of the bovine leukemia virus in monolayer cell cultures. *Cancer Res.* 1976; 36(11 Pt. 1): 4152–9.
20. Sandekian V., Lim D., Prud'homme P., Lemay G. Transient high level mammalian reovirus replication in a bat epithelial cell line occurs without cytopathic effect. *Virus Res.* 2013; 173(2): 327–35. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.01.010>.
21. Slater T., Eckerle I., Chang K. Bat lung epithelial cells show greater host species-specific innate resistance than MDCK cells to human and avian influenza viruses. *Virology*. 2018; 511(1): 68. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0979-6>.
22. Jordan I., Horn D., Oehmke S., Leendertz F.H., Sandig V. Cell lines from the Egyptian fruit bat are permissive for modified vaccinia Ankara. *Virus Res.* 2009; 145(1): 54–62. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.06.007>.
23. Cramer G., Todd S., Grimley S., McEachern J.A., Marsh G.A., Smith C., et al. Establishment, immortalisation and characterisation of pteropid bat cell lines. *PLoS One*. 2009; 4(12): e8266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008266>.
24. Banerjee A., Misra V., Schountz T., Baker M.L. Tools to study pathogen-host interactions in bats. *Virus Res.* 2018; 248: 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.06.007>.
25. Biesold S.E., Ritz D., Gloza-Rausch F., Wollny R., Drexler J.F., Corman V.M., et al. Type I interferon reaction to viral infection in interferon-competent, immortalized cell lines from the African fruit bat *Eidolon helvum*. *PLoS One*. 2011; 6(11): e28131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028131>.
26. Zhou P., Chionh Y.T., Irac S.E., Ahn M., Jia Ng J.H., Fossum E., et al. Unlocking bat immunology: establishment of Pteropus alecto bone marrow-derived dendritic cells and macrophages. *Sci. Rep.* 2016; 6: 38597. <https://doi.org/10.1038/srep38597>.
27. Irving A.T., Rozario P., Kong P., Luko K., Gorman J.J., Hastie M.L., et al. Robust dengue virus infection in bat cells and limited innate immune responses coupled with positive serology from bats in IndoMalaya and Australasia. *Cell. Mol. Life Sci.* 2020; 77(8): 1607–22. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03242-x>.
28. Zhukov V.A., Shishkina L.N., Safatov A.S., Sergeev A.A., Piankov O.V., Petrishchenko V.A., et al. Validation of a modified algorithm for predicting host susceptibility to viruses taking into account susceptibility parameters of primary target cell cultures and congenital immune factors. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2010; (5): 24–9 (in Russian).

## REFERENCES

1. IUCN SSC Bat Specialist Group. Available at: <https://www.iucn.org/commissions/ssc-groups/mammals/specialist-groups-a-e/bat> (accessed January 18, 2021).
2. Baker M.L., Schountz T., Wang L.F. Antiviral immune responses of bats: a review. *Zoonoses Public Health*. 2013; 60(1): 104–16. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01528.x>.
3. Calisher C.H., Childs J.E., Field H.E., Holmes K.V., Schountz T. Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19(3): 531–45. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06>.
4. Wang L.F., Walker P.J., Poon L.L. Mass extinctions, biodiversity and mitochondrial function: are bats 'special' as reservoirs for emerging viruses? *Curr. Opin. Virol.* 2011; 1(6): 649–57. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.013>.
5. Drexler J.F., Corman V.M., Wegner T., Tateno A.F., Zerbinati R.M., Gloza-Rausch F., et al. Amplification of emerging viruses in a bat colony. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(3): 449–56. <https://doi.org/10.3201/eid1703.100526>.
6. Moratelli R., Calisher C.H. Bats and zoonotic viruses: can we confidently link bats with emerging deadly viruses? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2015; 110(1): 1–22. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150048>.
7. Makarov V.V., Lozovoy D.A. Viruses and chiroptera. Epidemiological features of susceptibility. [*Virusy i rukokrylye. Epidemiologicheskie osobennosti vosprimchivosti*]. *Pest-Menedzhment*. 2017; (4): 13–22 (in Russian).
8. Vázquez-Morón S., Juste J., Ibáñez C., Berciano J.M., Echevarría J.E. Phylogeny of European Bat Lyssavirus 1 in *Eptesicus isabellinus* Bats, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(3): 520–3. <https://doi.org/10.3201/eid1703.100894>.
9. Ceballos N.A., Morón S.V., Berciano J.M., Nicolás O., López C.A., Juste J., et al. Novel lyssavirus in Bat, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(5): 793–5. <https://doi.org/10.3201/eid1905.121071>.
10. Ge X.Y., Li J.L., Yang X.L., Chmura A.A., Zhu G., Epstein J.H., et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*. 2013; 503(7477): 535–8. <https://doi.org/10.1038/nature12711>.

29. Ford C.E., Hamerton J.L. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technol.* 1956; 31(6): 247–51. <https://doi.org/10.3109/10520295609113814>.
30. Rothfels K.H., Siminovitch L. Air drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown in vitro. *Stain Technol.* 1958; 33(2): 73–7. <https://doi.org/10.3109/10520295809111827>.
31. Bowden T.R., Babiuk S.L., Parkynb G.R., Copps J.S., Boylea D.B. Capripoxvirus tissue tropism and shedding: A quantitative study in experimentally infected sheep and goats. *Virology.* 2008; 371 (2) 380–393. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.10.002>.
32. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals (Formerly AVMA Guidelines on Euthanasia): 2013 Edition. Available at: <https://www.avma.org/KB/Policies/Pages/Euthanasia-Guidelines.aspx> (accessed January 18, 2021).
33. Vorontsov N.N., Radzhabli S.I., Volobuev V.T. Comparative karyology of bats of Vespertilionidae family (Chiroptera). In: *Mammals (Evolution, Karyology, Taxonomy, Faunistics) [Sravnitel'naya kariologiya letuchikh myshei semeistva Vespertilionidae (Chiroptera). In: Mlekopitayushchie (evolyutsiya, kariologiya, sistematika, faunistika)]*. Novosibirsk: Nauka; 1969: 16–21 (in Russian).
34. Baker R.J. Karyotypic trends in bats. In: *Wimsatt W.A., ed. Biology of bats*. Academic Press Inc.: New York; 1970, 65–97. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-758001-2.50007-1>.
35. Park S.R., Won P.O. Chromosomes of Korean bats. *J. Mammal. Soc. Jpn.* 1978; (7): 199–203. <https://doi.org/10.11238/jmammsocjapan1952.7.1999>.
36. Dzuev R.I., Khashkulova M.A., Bogotova I.Kh. Features of the chromosome set and measurements of body mediterranean bat (*Pipistrellus Kuhli*) in the conditions of forest-steppe zone macrolone the northern Central Caucasus. [*Osobennosti khromosomno-go nabora i promerov tela sredizemnomorskogo netopyrya (Pipistrellus Kuhli) v usloviyakh lesostepnogo poyasa severnogo makrosklona Tsentral'nogo Kavkaza*]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya.* 2016; (3): 390 (in Russian).
37. Balkema-Buschmann A., Rissmann M., Kley N., Ulrich R., Eiden M., Groschup M.H. Productive propagation of Rift valley fever phlebovirus vaccine strain MP-12 in *Rousettus aegyptiacus* fruit bats. *Viruses.* 2018; 10(12): 681. <https://doi.org/10.3390/v10120681>.
38. Fagre A.C., Lee J.S., Kityo R.M., Bergren N.A., Mossel E.C., Nakayiki T., et al. Discovery and characterization of Bukakata orbivirus (Reoviridae: Orbivirus), a novel virus from a Ugandan bat. *Viruses.* 2019; 11(3): 209. <https://doi.org/10.3390/v11030209>.
39. Emerson Ginny L., Nordhausen R., Garner M.M., Huckabee J.R., Johnson S., Wohrle R.D., et al. Novel Poxvirus in big brown bats, Northwestern United States. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19(6): 1002–4. <https://doi.org/10.3201/eid1906.121713>.



## Влияние антикоагулянтной терапии на течение COVID-19 у коморбидных пациентов

Руженцова Т.А.<sup>1</sup>, Хавкина Д.А.<sup>2</sup>, Чухляев П.В.<sup>2</sup>, Гарбузов А.А.<sup>2</sup>, Плоскирева А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 125212, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 111123, Москва, Россия

**Введение.** Анализ патогенеза новой коронавирусной инфекции свидетельствует о значительном влиянии нарушений гемореологии на её течение и исходы. Известно, что хронические заболевания сердечно-сосудистой системы ассоциируются с риском тяжёлого течения и летальных исходов как при COVID-19, так и при других инфекционных болезнях. В связи с этим в каждом случае необходимо изучение взаимодействия и взаимовлияния различных составляющих лечебной программы, назначаемой таким пациентам.

**Цель работы** – оценить влияние активности системы гемостаза на течение новой коронавирусной инфекции (COVID-19) и обосновать тактику ведения коморбидных пациентов, получающих новые пероральные антикоагулянты (ПОАК) в подобранных ранее дозах по имеющимся показаниям в связи с наличием тех или иных соматических заболеваний.

**Материал и методы.** Проанализировано 76 случаев подтверждённой коронавирусной инфекции у пациентов, получавших стартовую терапию ПОАК (ривароксабан, аликсабан, дабигатран) амбулаторно. Из этого количества 26 участников, принимавших данные препараты, составили основную группу, и 50 – группу сравнения (контрольную), в которой до эпизода COVID-19 не назначались лекарственные средства, влияющие на свёртываемость крови. Всем пациентам было проведено лечение в соответствии с актуальной на момент начала исследования версией Временных методических рекомендаций «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» (<https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/>).

**Результаты и обсуждение.** В группе пациентов, которым назначались ПОАК, отмечено достоверно меньшее число случаев госпитализаций (19 против 66% в контрольной группе), отсутствие летальных исходов и эпизодов развития тяжёлой дыхательной и/или почечной недостаточности, тогда как среди не получавших антикоагулянты неблагоприятные исходы зарегистрированы в 14%.

**Заключение.** Приём ПОАК в соответствии с имеющейся сопутствующей патологией соматического характера снижает вероятность тяжёлого течения и неблагоприятных исходов при развитии инфекции, вызванной SARS-CoV-2, что указывает на существенный вклад поражения различных звеньев свёртывающей системы крови в патогенез COVID-19. У пациентов, получающих адекватную терапию указанными препаратами, при лечении в амбулаторных условиях лёгкой и среднетяжёлой форм коронавирусной инфекции не выявлено показаний для замены лекарственных средств этой фармакологической группы и коррекции схем антикоагулянтной терапии.

**Ключевые слова:** пероральные антикоагулянты; антикоагулянтная терапия; SARS-CoV-2; коронавирусная инфекция; COVID-19; фибрилляция предсердий

**Для цитирования:** Руженцова Т.А., Хавкина Д.А., Чухляев П.В., Гарбузов А.А., Плоскирева А.А. Влияние антикоагулянтной терапии на течение COVID-19 у коморбидных пациентов. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66 (1): 40-46. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-14>

**Для корреспонденции:** Руженцова Татьяна Александровна – д-р мед. наук, заместитель директора по клинической работе ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 125212, Москва, Россия. E-mail: [ruzhencova@gmail.com](mailto:ruzhencova@gmail.com)

**Участие авторов:** Руженцова Т.А. – разработка концепции исследования, интерпретация результатов; Хавкина Д.А. – анализ результатов, написание и редактирование текста; Плоскирева А.А. – редактирование текста; Чухляев П.В. – подбор и изучение медицинской документации; Гарбузов А.А. – оценка достоверности полученных результатов.

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

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

Поступила 20.09.2020  
Принята в печать 12.11.2020

## Effect of anticoagulant therapy on the course of COVID-19 in comorbid patients

Tatiana A. Ruzhentsova, Daria A. Khavkina, Pavel V. Chukhliaev, Alexander A. Garbuzov, Antonina A. Ploskireva

<sup>1</sup>FSBI «Gabrichevsky research institute for epidemiology and microbiology» of the Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), Moscow, 125212, Russia;

<sup>2</sup>FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), Moscow, 111123, Russia

**Introduction.** Analysis of the pathogenesis of coronavirus infection caused SARS-CoV-2 indicates a significant impact of hemorheological disorders on its course and outcomes. It is known that chronic cardiovascular diseases are associated with the risk of severe course and lethal outcomes both in COVID-19 and other infectious diseases. Therefore, in each case it is necessary to study the interaction and mutual influence of different components of the treatment program prescribed to such patients.

**The purpose** of this work was to evaluate the effect of coagulation activity on the course of a novel coronavirus infection (COVID-19) and to justify the management of comorbid patients having been received novel oral anticoagulants (NOACs) in previously selected doses according to indications in concomitant somatic diseases.

**Material and methods.** Total 76 cases of confirmed coronavirus infection in patients who had been received initial therapy on an outpatient basis were analyzed. 26 patients who received NOACs (rivaroxaban, apixaban, dabigatran) made up the main group and 50 – the comparison (control) group in which patients had not been administered any drugs that affect blood clotting until the episode of COVID-19. All patients have been prescribed therapy following the Provisional guidelines «Prevention, diagnosis and treatment of coronavirus infection (COVID-19)» (<https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/>).

**Results and discussion.** The number of hospitalizations was significantly fewer in the group of patients who had been received NOACs (19 vs. 66% in the control group). No deaths or cases of severe respiratory and/or renal failure were observed in the main group, while adverse outcomes were noted in 14% of patients who had not been administered these drugs.

**Conclusion.** Taking NOACs reduces the probability of severe course and adverse outcomes in the development of coronavirus infection caused by SARS-CoV-2, which indicates a significant contribution of coagulation mechanisms to the pathogenesis in COVID-19. There were no indications for drug replacement and correction of anticoagulant therapy regimens in patients who received adequate therapy with oral anticoagulants for treating a non-severe form of coronavirus infection in ambulatory patient settings.

**Key words:** *novel oral anticoagulants; anticoagulant therapy; SARS-CoV-2; coronavirus infection; COVID-19; atrial fibrillation*

**For citation:** Ruzhentsova T.A., Khavkina D.A., Chukhliaev P.V., Garbuzov A.A., Ploskireva A.A. Effect of anti-coagulant therapy on the course of COVID-19 in comorbid patients. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(1): 40-46 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-14>

**For correspondence:** Tatiana A. Ruzhentsova, Ph.D., D.Sci. (Med.), Head of Clinical Research Department, Professor of the Educational Center, FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), Moscow, 111123, Russia. E-mail: [ruzhencova@gmail.com](mailto:ruzhencova@gmail.com)

### Information about the authors:

Khavkina D.A., <http://orcid.org/0000-0001-5919-9841>

Chukhliaev P.V., <http://orcid.org/0000-0003-1210-1215>

Garbuzov A.A., <http://orcid.org/0000-0002-3378-8418>

Ploskireva A.A., <http://orcid.org/0000-0002-3612-1889>

**Contribution:** Ruzhentsova T.A. – researching of the concept of the study, interpretation of the results; Khavkina D.A. – analysis of the results, writing and editing of the text; Ploskireva A.A. – editing of the text; Chukhliaev P.V. – selection and study of medical documentation; Garbuzov A.A. – evaluation of the reliability of the results obtained.

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

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

Received 20 September 2020

Accepted 12 November 2020

## Введение

Анализ особенностей патогенеза новой коронавирусной инфекции (COVID-19) демонстрирует существенное влияние нарушений микроциркуляции и процесса тромбообразования на её течение и исходы. Результаты оценки 2773 случаев болезни у госпитализированных пациентов, находившихся на искусственной вентиляции лёгких (ИВЛ), показали, что среди получавших антикоагулянтную терапию летальность была в 2 раза ниже: 29,1% по сравнению с 62,7% при

отсутствии профилактики тромботических осложнений [1]. Эту тенденцию подтверждают и ранее опубликованные данные [2, 3]. Однако если при тяжёлом течении рассматриваемого заболевания необходимость применения парентеральных антикоагулянтов прямого действия на сегодняшний день очевидна, то при не тяжёлых формах на практике часто возникает вопрос о тактике антитромботической терапии. Кроме того, при значительном числе случаев лёгкого и стёртого течения COVID-19 в настоящее время, в том числе

у лиц старше 65 лет, увеличиваются количество отказов от госпитализации и доля получающих лечение на дому. Назначение же парентеральной терапии в амбулаторных условиях часто нежелательно. В то же время, учитывая особенности протекания этой инфекции с возможностью быстрого нарастания симптоматики и ухудшения состояния на протяжении нескольких часов [4], тактика амбулаторного ведения пациентов, как правило, должна быть достаточно активной. Все её составляющие должны быть тщательно выверены.

Немалое количество больных получают ранее подобранную терапию в связи с сопутствующей соматической патологией; их число возрастает среди пожилых. В то же время хронические заболевания сердечно-сосудистой системы ассоциируются с риском тяжёлого течения и летальных исходов не только при COVID-19, но и при других инфекционных болезнях. В связи с этим в каждом случае необходимы изучение взаимодействия и взаимовлияния различных составляющих комплексной лечебной программы, оценка пользы от используемого медикаментозного вмешательства и его потенциальных рисков.

В соответствии с имеющимися актуальными рекомендациями у значительной доли пациентов имеются показания к постоянному приёму антикоагулянтных препаратов: персистирующая и пароксизмальная формы фибрилляции предсердий (ФП), тромбозы вен, тромбоз лёгочной артерии в анамнезе, ограничения

подвижности в связи с травмами, некоторыми хирургическими вмешательствами, заболеваниями нервной системы. Тем не менее приходится констатировать, что в настоящее время отсутствует общепринятый подход к назначению и коррекции схем антитромботической терапии при амбулаторном лечении COVID-19.

Цель данной работы – оценить влияние активности коагуляционной системы на течение новой коронавирусной инфекции и обосновать тактику ведения коморбидных пациентов, получающих пероральные антикоагулянты (ПОАК) в подобранных ранее дозах по имеющимся соматическим показаниям.

### Материал и методы

Проанализировано 76 случаев подтверждённой новой коронавирусной инфекции у лиц, получавших стартовую антикоагулянтную терапию амбулаторно. Анализ медицинской документации, клинической картины, результатов лабораторных исследований и компьютерной томографии (КТ) лёгких у наблюдавшихся нами пациентов проведён методом сплошного скрининга. Основную группу составили 26 больных, получавших ПОАК (ривароксабан, апиксабан, дабигатран); 50 участников вошли в группу сравнения (контрольную), в которой до эпизода COVID-19 лекарственные средства, влияющие на свёртываемость крови, не назначались. По другой терапии, подобранной ранее в связи с хронической патологией, обе группы были сопоставимы (табл. 1).

**Таблица 1. Лекарственные препараты схем поддерживающей терапии, регулярно назначавшиеся пациентам сравниваемых групп**  
**Table 1. Medications of maintenance therapy regimens had been regularly administered to patients in the compared groups**

Препарат Medication	Основная группа Main group n (%)	Контрольная группа Control group n (%)
Ривароксабан Rivaroxaban	16 (62)*	–
Дабигатран Dabigatran	5 (19)*	–
Апиксабан Apixaban	5 (19)*	–
Клопидогрел Clopidogrel	3 (12)	9 (18)
Ацетилсалициловая кислота Acetylsalicylic acid	0*	19 (38)
Бета-адреноблокаторы Beta blockers	7 (27)	16 (32)
Блокаторы кальциевых каналов I класса Class I calcium channel blockers	1 (4)	5 (10)
Блокаторы кальциевых каналов II класса Class II calcium channel blockers	3 (12)	14 (28)
Ингибиторы ангиотензин превращающего фермента Angiotensin-converting enzyme inhibitors	4 (15)	7 (14)
Антагонисты рецепторов ангиотензина 2 типа Type 2 angiotensin receptor antagonists	12 (46)	16 (32)
Статины Statins	20 (77)	29 (58)
Агонисты имидазолиновых рецепторов Imidazoline receptor agonists	3 (12)	5 (10)
Не принимавшие регулярно лекарственных препаратов Not taking any medication regularly	0*	7 (14)

**Примечание.** \* – различия достоверны,  $p < 0,05$ .

**Note.** \* – differences are significant,  $p < 0.05$ .

В первой группе 38% пациентов получали ацетилсалициловую кислоту в профилактической дозе 100 мг в сутки, а 14% не принимали регулярно каких-либо препаратов. После оценки жалоб, анамнеза и физикального осмотра всем больным было назначено лечение в соответствии с актуальной на момент начала терапии версией Временных методических рекомендаций «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» (<https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/>). При отсутствии на момент инициализации лечения лабораторных результатов, подтверждающих наличие SARS-CoV-2, использовались препараты, рекомендованные для терапии ОРВИ и гриппа.

Сравниваемые группы были сопоставимы по полу, степени тяжести на момент начала лечения, времени появления первых симптомов коронавирусной инфекции, а также по характеру назначенной стартовой терапии. Возраст пациентов составлял от 42 до 96 лет. Среди участников в обеих группах несколько преобладали женщины: 58% в основной и 56% – в контрольной. Срок от начала заболевания до инициализации медикаментозного вмешательства составлял от 1 до 5 сут. Лёгкая форма COVID-19 зарегистрирована у 6 (23%) пациентов основной группы и у 10 (20%) – контрольной.

Признаки поражения лёгочной ткани (от 3 до 25% объёма) (КТ-1) выявлены у 20 (77%) больных в основной группе и у 40 (80%) – в контрольной. В качестве этиотропного лечения назначали умифеновир, интерферон альфа-2b, имидазолилэтанамид пентандиовой кислоты, лопинавир/ритонавир, риамиловир, инозин пранобекс (табл. 2). По показаниям для снижения температуры тела использовали парацетамол. При признаках пневмонии применяли антибактериальные (азитромицин, амоксициллина клавуланат или левофлоксацин) и муколитические (ацетилцистеин, амброксол) препараты. В качестве дополнительной терапии некоторые пациенты получали энтеросорбенты (при клинически значимых проявлениях интоксикации) и витаминно-минеральные комплексы.

У всех исследуемых ежедневно проводили мониторинг клинической симптоматики, температуры тела, сатурации крови кислородом. На 1–3-й день, а впоследствии при наличии изменений или иных показателей выполняли КТ лёгких, клинический анализ крови, исследование концентрации D-димера; по показаниям – биохимический анализ крови с определением активности аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ), уровней креатинина, С-реактивного белка, тропонина I.

Для оценки влияния лечения учитывали число госпитализаций, летальных исходов, дополнительно – прогрессирование симптоматики к концу 1-й недели заболевания, определяли необходимость коррекции схемы стартовой терапии.

Сравнение показателей проводили с помощью программы Statistica v.12. Оценивали средние значения, стандартное отклонение, Z-критерий. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

При сопоставлении показателей возраста выявлены достоверные межгрупповые различия: в основной группе они составили  $74,8 \pm 14,64$  лет, а в группе контроля –  $66,7 \pm 14,66$  ( $p < 0,05$ ). По структуре соматической патологии и степени её компенсации в основной группе было достоверно больше больных с нарушениями ритма сердца, ишемической болезнью сердца (ИБС), клиническими признаками недостаточности кровообращения II стадии по Н.Д. Стражеско и В.Х. Василенко (II-III функционального класса по NYHA),

**Таблица 2. Стартовая лекарственная терапия, назначавшаяся пациентам сравниваемых групп**

**Table 2. Initial drug therapy had been prescribed to patients in the compared groups**

Препарат Medication	Основная группа Main group n (%)	Контрольная группа Control group n (%)
Умифеновир Umifenovir	5 (19)	6 (12)
Интерферон альфа-2b Interferon alpha-2b	0	5 (10)
Имидазолилэтанамид пентандиовой кислоты Imidazolyl ethanamide pentandioic acid	4 (15)	7 (14)
Интерферон альфа-2b + умифеновир Interferon alpha-2b + umifenovir	6 (23)	14 (28)
Интерферон альфа-2b + имидазолилэтанамид пентандиовой кислоты Interferon alpha-2b + imidazolyl ethanamide pentandioic acid	2 (8)	4 (8)
Лопинавир/Ритонавир Lopinavir/Ritonavir	2 (8)	5 (10)
Инозин пранобекс Inosine pranobex	3 (12)	3 (6)
Риамиловир Riamilovir	4 (15)	6 (12)
Азитромицин Azithromycin	6 (23)	4 (8)
Амоксициллина клавуланат Amoxicillin clavulanate	5 (19)	16 (32)
Амоксициллина клавуланат + азитромицин Amoxicillin clavulanate + azithromycin	3 (12)	5 (10)
Левофлоксацин Levofloxacin	6 (23)	15 (30)
Ацетилцистеин Acetylcysteine	13 (50)	28 (56)
Амброксол Ambroxol	4 (15)	6 (12)

**Примечание.**  $p > 0,05$ , использован двусторонний Z-критерий.

**Note.**  $p > 0.05$ , bilateral Z-test is used.

церебральным атеросклерозом и сахарным диабетом 2 типа, что представлено в табл. 3.

Большинство участников страдали сочетанной хронической соматической патологией, т.е. характеризовались мультиморбидностью. Наиболее часто одновре-

менно регистрировались церебральный атеросклероз, ИБС, сахарный диабет 2 типа – заболевания, которые могут быть взаимосвязаны в рамках патогенетического механизма. В основной группе наиболее частой нозологической формой была ФП, что служило показанием

Таблица 3. Хронические соматические заболевания у пациентов сравниваемых групп

Table 3. Chronic somatic diseases in patients of the compared groups

Сопутствующее заболевание Concomitant disease	Особенности заболевания: стадия/функциональный класс/форма Features of the disease: stage/functional class/form	Основная группа Main group n (%)	Контрольная группа Control group n (%)
Фибрилляция предсердий (ФП) Atrial fibrillation	Персистирующая Persistent	13 (50)*	0
	Пароксизмальная Paroxysmal	8 (31)	7 (14)
	Всего пациентов с ФП Total patients with atrial fibrillation	21 (81)*	7 (14)
Тромбофлебит вен нижних конечностей Thrombophlebitis of the veins of the lower extremities	Хронический Chronic	5 (19)*	0
	–	2 (8)	0
Тромбоэмболия лёгочной артерии в анамнезе History of pulmonary thromboembolism	1 стадия Stage 1	3 (12)	8 (16)
	2 стадия Stage 2	8 (31)	19 (38)
	3 стадия Stage 3	10 (38)	11 (22)
	Всего пациентов с гипертонической болезнью Total number of patients with hypertensive disease	21 (81)	38 (76)
Гипертоническая болезнь Hypertensive disease	1 стадия Stage 1	3 (12)	8 (16)
	2 стадия Stage 2	8 (31)	19 (38)
	3 стадия Stage 3	10 (38)	11 (22)
	Всего пациентов с гипертонической болезнью Total number of patients with hypertensive disease	21 (81)	38 (76)
	–	2 (8)	0
Ишемическая болезнь сердца (ИБС) Coronary heart disease (CHD)	Стенокардия напряжения I функционального класса Functional class I angina pectoris	1 (4)	4 (8)
	Стенокардия напряжения II функционального класса Functional class II angina pectoris	3 (12)	2 (4)
	Постинфарктный кардиосклероз Post-infarction cardiosclerosis	4 (15)	4 (8)
	Другие формы ИБС Other forms of CHD	6 (23)*	3 (6)
	Всего пациентов с ИБС Total number patients with coronary heart disease	14 (54)*	13 (26)
Недостаточность кровообращения Heart failure	I (NYHA)	5 (19)	11 (22)
	II (NYHA)	5 (19)*	2 (4)
	III (NYHA)	3 (12)*	0
Всего пациентов с сердечной недостаточностью Total number of patients with heart failure	13 (50)*	13 (26)	
Церебральный атеросклероз (атеросклеротическая энцефалопатия) Cerebral atherosclerosis (atherosclerotic encephalopathy)	I	2 (8)	4 (8)
	II	12 (46)*	11 (22)
	III	6 (23)	7 (14)
	Всего пациентов с церебральным атеросклерозом Total number of patients with cerebral atherosclerosis	20 (77)*	22 (44)
Церебральная спастическая тетраплегия Cerebral spastic tetraplegia	–	1 (4)	0
Сахарный диабет Diabetes mellitus	2 типа Type 2	11 (42)*	9 (18)
	–	0	0
Тиреотоксикоз Thyrotoxicosis	Медикаментозная компенсация Medicinal compensation	2 (8)	2 (4)
Гипотиреоз Hypothyroidism	Медикаментозная компенсация Medicinal compensation	5 (19)	9 (18)
Наследственные гемоглобинопатии Hereditary hemoglobinopathies	–	0*	9 (18)

Примечание. \* – различия достоверны,  $p < 0,05$ .

Note. \* – differences are significant,  $p < 0.05$ .

**Таблица 4. Особенности течения коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у пациентов сравниваемых групп****Table 4. Features of the course of coronavirus infection caused by SARS-CoV-2 in patients of the compared groups**

Исход Outcome	Основная группа Main group n (%)	Контрольная группа Control group n (%)
Выздоровление в амбулаторных условиях Recovery on an outpatient basis	21 (81)*	17 (34)
Госпитализация при ухудшении состояния или неэффективности стартовой терапии Hospitalization in case of deterioration or ineffectiveness of initial therapy	5 (19)*	33 (66)
Сохраняющиеся изменения, не требующие активной терапии Persistent changes that do not require active therapy	11 (42)	24 (48)
Сохраняющиеся тяжёлые нарушения, требующие продолжения кислородотерапии и/или гемодиализа спустя 1 мес Persistent severe disorders requiring continued oxygen therapy and/or hemodialysis after 1 month	0	5 (10)
Летальный исход Lethal outcome	0	2 (4)
Неблагоприятные исходы суммарно (летальные исходы, выраженная дыхательная и/или почечная недостаточность) Adverse outcomes in total (fatal outcomes, severe respiratory and/or renal failure)	0*	7 (14)

**Примечание.** \* – различия достоверны,  $p < 0,05$ .

**Note.** \* – differences are significant,  $p < 0.05$ .

к назначению антикоагулянтов в режиме непрерывного приёма [5]. У всех пациентов группы контроля также имелись заболевания, при которых необходимо постоянное назначение тех или иных медикаментов, в том числе пароксизмы ФП, требующие согласно современным рекомендациям антикоагулянтной терапии. Однако последняя не назначалась либо пациенты демонстрировали крайне низкую приверженность к лечению. В группе сравнения 14% исследуемых не принимали каких-либо препаратов, несмотря на наличие первоочередных показаний к применению антигипертензивных средств и статинов.

В целом в основной группе бóльшая выраженность нарушений способствовала более тщательному соблюдению рекомендаций лечащего врача (высокой комплаентности) в отношении как антикоагулянтной, так и иной назначенной терапии.

На фоне лечения COVID-19 в результате инициального медикаментозного вмешательства в амбулаторных условиях с мониторингом клинического состояния благоприятный исход (выздоровление) был достигнут в 21 (81%) случае (табл. 4). Госпитализированы 5 (19%) больных ввиду отсутствия положительной динамики на 5–7-е сут лечения, прогрессирования пневмонии по результатам КТ. Летальных исходов не зарегистрировано. Спустя 1 мес у всех пациентов отмечено выздоровление, при этом фиброзные изменения в лёгких сохранялись у 11 (40%) из них. Нежелательных явлений от приёма антикоагулянтов во время терапии новой коронавирусной инфекции не выявлено.

В группе контроля течение инфекционного процесса оказалось менее благоприятным. Из общего числа участников выздоровели на фоне стартового лечения 17 (34%) пациентов, 33 (66%) были госпитализированы в связи с неэффективностью терапии; 2 (4%) больных скончались. У 5 (10%) наблюдавшихся спустя 1 мес от начала медикаментозного воздействия сохранялись различные выраженные

клинические проявления COVID-19 (кашель, эпизоды повышения температуры тела, одышка с потребностью в кислородотерапии, слабость) с изменениями лабораторных показателей. В 2 (4%) случаях, несмотря на проводимую терапию, не отмечен регресс значительных изменений в лёгочной ткани (с поражением до 75% объёма) (КТ-3). Этим пациентам в течение 2-го месяца лечения была продолжена поддерживающая оксигенотерапия вследствие снижения сатурации до 90–88% на фоне отсутствия ингаляций кислорода. Ещё у 2 (4%) больных сохранялась необходимость в проведении гемодиализа с учётом выраженной почечной недостаточности (уровень креатинина сыворотки более 500 мкмоль/л, клиренс креатинина менее 15 мл/мин). В 1 (2%) случае персистировали выраженные симптомы дыхательной и почечной недостаточности, в связи с чем были продолжены кислородотерапия и гемодиализ.

Летальные исходы зарегистрированы на 3-и и 7-е сут от начала лечения. 1) Смерть пациентки А., 96 лет, наступила от повторного нарушения мозгового кровообращения на фоне нетяжёлого течения подтверждённой COVID-19. При первичном осмотре (на 1-е сут от момента появления симптомов) больная предъявляла жалобы на небольшую слабость, покашливание, при этом температура тела не поднималась выше 37 °С. По данным КТ выявлены изменения по типу «матового стекла» с поражением до 15% объёма лёгочной ткани с обеих сторон на фоне умеренно выраженного пневмосклероза. В тот же день отмечены эпизод потери сознания, нарушение речи, левосторонний гемипарез; осуществлена госпитализация. На 3-и сут, несмотря на проводимое интенсивное лечение в условиях отделения реанимации, зарегистрировано нарастание неврологической симптоматики с последующими остановкой дыхания и асистолией.

2) В другом случае у больного Ю., 58 лет, причиной смерти стала массивная тромбоэмболия ветвей лёгочной артерии. Пациент был госпитализирован

на 3-и сут от начала лечения в связи с нарастанием одышки и гипертермией до 39,6 °С. При КТ – поражение лёгочной ткани по типу «матового стекла» (до 25%), при повторном обследовании (на 6-е сут) – до 60% с обеих сторон. На фоне нарастания сердечно-лёгочной недостаточности и неэффективности ИВЛ наступил летальный исход.

Сравнение исходов новой коронавирусной инфекции в обеих группах представлено в **табл. 4**. Можно видеть, что на фоне ранее подобранной антикоагулянтной терапии заболевание в целом протекало благоприятно, несмотря на большое количество факторов риска тяжёлого течения и наличие летальных исходов вследствие респираторных инфекций. Среди участников основной группы не отмечено ни одного случая смерти и выраженной дыхательной и/или почечной недостаточности, требующих кислородотерапии и/или гемодиализа, что достоверно отличается от показателей в группе контроля ( $p < 0,05$ ). Этот факт подчёркивает высокую значимость подбора адекватного противотромботического медикаментозного вмешательства при сопутствующей соматической патологии у коморбидных пациентов с целью профилактики осложнений COVID-19.

Полученные результаты подтверждают существенный вклад нарушений механизмов коагуляции в патогенез инфекции, вызванной SARS-CoV-2, и роль гемореологических нарушений в её прогрессировании. В то же время данные наблюдения свидетельствуют о возможности амбулаторного ведения таких лиц и отсутствии необходимости коррекции доз и схем приёма антикоагулянтов при нетяжёлом течении COVID-19. В дальнейших исследованиях необходимо установить возможную роль антиагрегантной терапии и влияние каждой из составляющих поддерживающего лечения на течение инфекционного процесса у коморбидных больных. Учитывая риск кровотечений при приёме лекарственных средств этого класса, приведённые данные не могут свидетельствовать о необходимости и безопасности их профилактического приёма в других группах пациентов, не имеющих прямых показаний к нему. Очевидна важность индивидуального определения соотношения польза–риск при решении вопроса о назначении того или иного препарата, а также оценке его эффективности и безопасности.

Безусловно, во всех случаях наличия хронических заболеваний, особенно у людей старше 65 лет, требуются тщательный мониторинг клинической симптоматики, адекватная коррекция терапевтических схем с учётом особенностей течения инфекционной и соматической патологии с контролем за состоянием пациентов не реже 1 раза в сутки, в том числе и при амбулаторном ведении больных с нетяжёлой формой новой коронавирусной инфекции.

## Заключение

1. Приём ПОАК в соответствии с показаниями по сопутствующей соматической патологии снижает вероятность тяжёлого течения и неблагоприятных исходов при развитии новой коронавирусной инфекции, что указывает на существенный вклад нарушений в различных звеньях свёртывающей системы крови в патогенез COVID-19.

2. У пациентов, получавших в амбулаторных условиях адекватное лечение препаратами указанной фармакологической группы на фоне нетяжёлого течения инфекции, вызванной SARS-CoV-2, не выявлено показаний для замены лекарственных средств и коррекции схем антикоагулянтной терапии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Paranjpe I., Fuster V., Lala A., Russak A.J., Glicksberg B.S., Levin M.A., et al. Association of treatment dose anticoagulation with in-hospital survival among hospitalized patients with COVID-19. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2020; 76(1): 122–9. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.05.001>.
2. Lillicrap D. Disseminated intravascular coagulation in patients with 2019-nCoV pneumonia. *J. Thromb. Haemost.* 2020; 18(4): 786–7. <https://doi.org/10.1111/jth.14781>.
3. Tang N., Bai H., Chen X., Gong J., Li D., Sun Z. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J. Thromb. Haemost.* 2020; 18(5): 1094–9. <https://doi.org/10.1111/jth.14817>.
4. Wu J., Liu J., Zhao X., Liu C., Wang W., Wang D., et al. Clinical characteristics of imported cases of COVID-19 in Jiangsu Province: A multicenter descriptive study. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15): 706–12. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa199>.
5. Steffel J., Verhamme P., Potpara T.S., Albaladejo P., Antz M., Desteghe L., et al. The 2018 European Heart Rhythm Association Practical Guide on the use of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants in patients with atrial fibrillation. *Eur. Heart J.* 2018; 39(16): 1330–93. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy136>.

## REFERENCES

1. Paranjpe I., Fuster V., Lala A., Russak A.J., Glicksberg B.S., Levin M.A., et al. Association of treatment dose anticoagulation with in-hospital survival among hospitalized patients with COVID-19. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2020; 76(1): 122–9. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.05.001>.
2. Lillicrap D. Disseminated intravascular coagulation in patients with 2019-nCoV pneumonia. *J. Thromb. Haemost.* 2020; 18(4): 786–7. <https://doi.org/10.1111/jth.14781>.
3. Tang N., Bai H., Chen X., Gong J., Li D., Sun Z. Anticoagulant treatment is associated with decreased mortality in severe coronavirus disease 2019 patients with coagulopathy. *J. Thromb. Haemost.* 2020; 18(5): 1094–9. <https://doi.org/10.1111/jth.14817>.
4. Wu J., Liu J., Zhao X., Liu C., Wang W., Wang D., et al. Clinical characteristics of imported cases of COVID-19 in Jiangsu Province: A multicenter descriptive study. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15): 706–12. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa199>.
5. Steffel J., Verhamme P., Potpara T.S., Albaladejo P., Antz M., Desteghe L., et al. The 2018 European Heart Rhythm Association Practical Guide on the use of non-vitamin K antagonist oral anticoagulants in patients with atrial fibrillation. *Eur. Heart J.* 2018; 39(16): 1330–93. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy136>.



## Интерферон гамма в терапии пациентов с COVID-19 среднетяжёлого течения

Мясников А.Л.<sup>1</sup>, Бернс С.А.<sup>1</sup>, Талызин П.А.<sup>1</sup>, Ершов Ф.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ГБУЗ «Городская клиническая больница имени М.Е. Жадкевича Департамента здравоохранения города Москвы», 121374, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУ «Федеральный научный центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия

**Введение.** Интерфероны вырабатываются в ответ на внедрение патогена в клетку и отвечают за правильное формирование иммунного ответа. Предварительные исследования с участием пациентов с внебольничной пневмонией (в т.ч. бактериального генеза), острой респираторной вирусной инфекцией (ОРВИ), гриппом и новой коронавирусной инфекцией COVID-19 по изучению свойств рекомбинантного интерферона гамма (ИФН-γ) показали обнадеживающие результаты.

**Цель** данной работы – оценка влияния ИФН-γ при подкожном введении у лиц с вирусной пневмонией на динамику жизненно важных показателей и длительность госпитализации.

**Материал и методы.** В открытое рандомизированное малоинтервенционное исследование были включены пациенты старше 18 лет обоих полов с новой коронавирусной инфекцией среднетяжёлого течения. Препарат ИФН-γ назначался по 500 000 МЕ подкожно 1 раз в сутки ежедневно на протяжении 5 дней.

**Результаты.** Установлена более благоприятная динамика стабилизации жизненно важных показателей в сочетании с сокращением длительности лихорадки и продолжительности госпитализации на 2 сут при применении ИФН-γ в дополнение к комплексной терапии, что позволяет предположить позитивное влияние этого вещества на процессы восстановления больных со среднетяжёлой степенью COVID-19. Особого внимания заслуживает тот факт, что получавшие рекомбинантный ИФН-γ не имели прогрессирования дыхательной недостаточности и не требовали перевода в отделение интенсивной терапии (ОРИТ).

**Обсуждение.** Представленная работа подтверждает полученные ранее данные о положительном влиянии ИФН-γ на скорость клинической стабилизации и выздоровления лиц с внебольничными пневмониями и вирусными инфекциями. Результаты настоящего исследования ограничены небольшим количеством участников и требуют дальнейшего изучения свойств препарата в рамках пострегистрационных исследований.

**Заключение.** Прогресс в лечении больных среднетяжёлой формой COVID-19 путём дополнения комплексной терапии рекомбинантным ИФН-γ может обоснованно расширить ряд существующих методов лечения этой инфекции.

**Ключевые слова:** *интерферон гамма; COVID-19; новая коронавирусная инфекция; вирусная пневмония; жизненно важные показатели; длительность госпитализации*

**Для цитирования:** Мясников А.Л., Бернс С.А., Талызин П.А., Ершов Ф.И. Интерферон гамма в терапии пациентов с COVID-19 среднетяжёлого течения. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(1) 47-54. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-24>

**Для корреспонденции:** Бернс Светлана Александровна – д.м.н., профессор, научный консультант терапевтических отделений ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница имени М.Е. Жадкевича Департамента здравоохранения города Москвы», 121374, Москва, Россия. E-mail: [svberns@yandex.ru](mailto:svberns@yandex.ru)

**Участие авторов:** Мясников А.Л. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, утверждение окончательного варианта статьи; Бернс С.А. – концепция и дизайн исследования, написание и редактирование текста; Талызин П.А. – сбор и обработка материала, утверждение окончательного варианта статьи; Ершов Ф.И. – редактирование текста, утверждение окончательного варианта статьи.

**Финансирование.** Работа не имела спонсорской поддержки.

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

Поступила 05.10.2020

Принята в печать 12.11.2020

## Interferon gamma in the treatment of patients with moderate COVID-19

Alexander L. Myasnikov<sup>1</sup>, Svetlana A. Berns<sup>1</sup>, Pavel A. Talyzin<sup>1</sup>, Felix I. Ershov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Moscow SBIH «City Clinical Hospital named after M.E. Zhadkevich of the Moscow City Health Department», 121374, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>FSBI «National Research Centre of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia

**Introduction.** Interferons are produced in response to the presence of pathogens in cells and are responsible for the proper formation of immune reaction. Preliminary data obtained in studies of properties of recombinant

interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) that involved patients with community-acquired pneumonia (including bacterial), acute respiratory viral infection (ARVI), influenza and new coronavirus infection have shown promising results.

The **purpose** of the study was to assess the effect of subcutaneous administration of IFN- $\gamma$  in patients with viral pneumonia on the changes of vital signs and the duration of hospital stay.

**Material and methods.** An open-label, randomized, low-interventional study included patients with moderate new coronavirus infection COVID-19 over 18 years of age of both sexes. IFN- $\gamma$  500,000 IU was administered s/c, daily, once a day, during 5 days.

**Results.** IFN- $\gamma$  in addition to complex therapy of the disease resulted in more favorable changes in the stabilization of vital signs, as well as in reduced length of fever and hospital stay by 2 days what allows suggesting a positive effect of this substance on the recovery processes in patients with moderate COVID-19. Special emphasis should be made to the fact that patients who received recombinant IFN- $\gamma$  experienced no progression of respiratory failure and required no transfer to intensive care unit.

**Discussion.** This study confirms earlier obtained data on the positive effect of IFN- $\gamma$  on the rate of clinical stabilization and recovery of patients with community-acquired pneumonia and viral infections. Presented results are limited to a small number of patients; further study of drug properties in post-marketing studies is required.

**Conclusion.** Progress in the treatment of patients with moderate COVID-19 by adding recombinant IFN- $\gamma$  to the complex therapy may reasonably expand the range of existing treatment options for this infection.

**Key words:** *interferon gamma; COVID-19; coronavirus infections; viral pneumonia; vital signs; duration of hospital stay*

**For citation:** Myasnikov A.L., Berns S.A., Talyzin P.A., Ershov F.I. Interferon gamma in the treatment of patients with moderate COVID-19. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(1) 47-54 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-24>

**For correspondence:** Svetlana A. Berns, D.Sci. (Med.), Prof., Scientific Consultant of Therapeutic Departments Moscow SBIH «City Clinical Hospital named after M.E. Zhadkevich of the Moscow City Health Department», 121374, Moscow, Russia. E-mail: [svberns@yandex.ru](mailto:svberns@yandex.ru)

**Information about the authors:**

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

Myasnikov A.L., <http://orcid.org/0000-0003-2347-8317>

Berns S.A., <http://orcid.org/0000-0003-1002-1895>

Talyzin P.A., <http://orcid.org/0000-0001-8333-8354>

**Contribution:** Myasnikov A.L. – research concept and design, collection and analysis of the research data, approval of the final version of the article; Berns S.A. – research concept and design, writing of the text; Talyzin P.A. – collection and analysis of the research data, approval of the final version of the article; Ershov F.I. – editing of the text, approval of the final version of the article.

**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.

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

Received 5 October 2020

Accepted 12 November 2020

## Введение

По данным [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) – всемирной базы данных результатов исследований, проводимых при государственной и частной поддержке в США и других странах, на сегодняшний день зарегистрированы 154 (по состоянию на 16 декабря 2020 г.) исследовательские работы по изучению влияния интерферонов на заболеваемость и течение COVID-19. Около половины из них посвящены применению при данной нозологии экзогенных рекомбинантных лекарственных препаратов на основе интерферонов [1]. Таким образом, интерес к этой группе фармакологических средств не ослабевает и появляются новые доказательства роли системы рассматриваемых веществ в развитии иммунного ответа у инфицированных вирусом SARS-CoV-2 [2–4].

Симптомы ранней фазы инфекции значительно варьируют, представляя широкий спектр от лихорадки, усталости, сухого кашля и диареи до боли в горле и аносмии. В некоторых случаях заболевание может протекать полностью бессимптомно [5–7]. Однако главной особенностью новой коронавирусной ин-

фекции является высокая тропность её возбудителя к эпителиальным клеткам нижних дыхательных путей, что ассоциируется с высоким риском поражения бронхов и лёгких и развитием осложнений в форме вирусных пневмоний [8].

Большинство исследований, проведённых с участием страдающих тяжёлой формой COVID-19, указывают на вторичную распространённую воспалительную реакцию с высвобождением большого количества цитокинов в первичном очаге инфекции – тканях лёгких, а также в других органах (почках) и системах (сердечно-сосудистой, нервной). Этот феномен получил название цитокинового шторма [9]. Пока нет ответов на вопросы о том, что является катализатором развития данного синдрома, каков механизм его запуска и каким образом может повлиять на состояние пациента применение интерферонов.

Наиболее часто встречающимся последствием развития неконтролируемой воспалительной реакции, представляющим угрозу жизни больного и требующим перевода его в ОРИТ, является острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) [5].

В тканях верхних и нижних дыхательных путей происходит массивный выброс фибрина и тромбоз микрососудов, из-за чего развивается дыхательная недостаточность и возрастает риск летального исхода. У пациентов, умерших по причине COVID-19, гораздо чаще наблюдаются признаки микротромботических осложнений [10]. В наиболее тяжёлых случаях может присутствовать диссеминированный микрососудистый тромбоз сердца, мозга, почек и кожи [11, 12].

Сегодня научное сообщество постепенно начинает склоняться к представлению о том, что интерферонотерапия может быть наиболее эффективной при условии раннего назначения (в первые 5 дней поступления пациента) для комплексного лечения лёгкого и среднетяжёлого течения COVID-19 с целью ускорения элиминации инфекционного агента, предотвращения осложнений и снижения смертности непосредственно от заболевания [13, 14]. При тяжёлой форме болезни патогенез обусловлен не только самим патогеном, но и присоединившимся дисбалансом функционирования различных систем и органов пациента [15], что осложняет процесс терапии и представляет сложности для внедрения отдельных методов лечения и оценки их эффективности.

Интерфероны вырабатываются в ответ на внутриклеточное внедрение патогена и отвечают за правильное формирование иммунного ответа: активацию отдельных клонов клеток иммунной системы, выработку специфических иммуноглобулинов [16, 17]. Известно, что система интерферонов играет важнейшую роль в запуске реакций клеточного звена иммунитета при экспансии абсолютно любых вирусных агентов, в том числе смертельно опасных вирусов Эбола [18], SARS-CoV [19], гепатитов [20] и др. [21].

В ходе исследования GAMMACOVID-PROF получены данные, подтверждающие профилактическую эффективность ИФН- $\gamma$  в отношении COVID-19 [22]. Результаты изучения противовирусного действия этого вещества у пациентов с ОРВИ показали наличие эффекта при его терапевтическом применении, в том числе на фоне новой коронавирусной инфекции [23].

Предварительные результаты исследования IN/100000-317, проведённого при участии 114 пациентов с внебольничной пневмонией (в т.ч. бактериальной), показали некоторое ускорение процесса клинической стабилизации и сокращение периода выздоровления, а также большую частоту случаев полной эрадикации возбудителя или его персистенции с остановкой роста либо уменьшением титра микроорганизмов при применении ИФН- $\gamma$  по 500 000 МЕ подкожно 1 раз в сутки ежедневно в течение 5 дней по сравнению с контрольной группой. Наряду с более высокой терапевтической эффективностью препарат продемонстрировал сравнимый профиль безопасности [24].

В настоящей статье приводятся вторичные результаты исследования 2GAMMACOVID-19, отражающие влияние ИФН- $\gamma$  на жизненно важные показатели пациентов и длительность их госпитализации.

## Материал и методы

Исследование 2GAMMACOVID-19 имело статус открытого, рандомизированного, малоинтервенционного. В него вошли пациенты обоих полов старше 18 лет с новой коронавирусной инфекцией COVID-19 среднетяжёлого течения, способные ознакомиться с содержанием предстоящей работы, принять условия протокола и самостоятельно в письменном виде заверить форму информированного согласия. Сепсис, ОРДС, а также любые прочие заболевания или состояния, которые по мнению врача-исследователя могли исказить результаты исследования, ограничить участие пациента либо подвергнуть его большему риску, считались критериями невключения. Протокол не допускал изменение режима дозирования исследуемого препарата, применение экспериментальных средств или методов лечения, преднамеренное нарушение процедур исследовательской программы и продолжение участия в случае отказа пациента (отзыв информированного согласия).

Все участники были рандомизированы в 2 группы: основную, в которой назначался рекомбинантный ИФН- $\gamma$  на фоне базовой антибактериальной и симптоматической терапии, и контрольную – с использованием только базового (антибактериального, симптоматического) лечения. Назначение комплексной терапии осуществлялось на основании решения врачебной комиссии с оформлением протокола и внесением записей в первичную медицинскую документацию пациента.

Человеческий рекомбинантный ИФН- $\gamma$  (Ингарон) состоит из 144 аминокислотных остатков, получен микробиологическим синтезом в рекомбинантном штамме *Escherichia coli* и очищен колоночной хроматографией. Препарат применялся в форме лиофилизата для приготовления раствора для внутримышечного и подкожного введения и назначался в следующем режиме дозирования: по 500 000 МЕ п/к 1 раз в сутки ежедневно на протяжении 5 дней (в 1-й или следующий день с момента поступления в стационар).

Работа выполнена на базе ГБУЗ «ГКБ имени М.Е. Жадкевича ДЗМ» (г. Москва) в сопровождении локального этического комитета. Жизненно важные показатели измерялись ежедневно в течение 14 дней терапии. Общая длительность наблюдения за пациентами, включёнными в исследование, составила период времени до выписки из стационара или смерти.

Для количественных показателей вычислялись: число непропущенных значений; минимальное и максимальное значения; среднее арифметическое; стандартное отклонение; 95% доверительный интервал и медиана. В ходе анализа численных данных выполнялось предварительное тестирование переменных на нормальность распределения с помощью теста Шапиро–Уилка. При этом в случае нормального распределения данных внутригрупповое сравнение параметров проводилось с помощью парного t-теста, в противном случае использовался тест Манна–Уитни (U-критерий).

Для качественных переменных рассчитывались абсолютное количество в формате n/N, а также доля

в процентах. В процессе сравнительной оценки использованы  $\chi^2$ -критерий или точный тест Фишера, если ожидаемая частота в какой-либо из ячеек была менее 5.

С целью анализа данных применены стандартные методы, доступные в программе XLSTAT 2020.3. Во всех тестах использован уровень значимости ( $p$ ), равный 0,05.

При оценке параметров эффективности осуществлялось восполнение отсутствующих данных методом переноса последнего доступного наблюдения на следующую временную точку (last observation carried forward).

Все включённые в исследование пациенты завершили участие в программе. Целевой набор не был достигнут в связи с утратой учреждением инфекционного статуса.

В ходе работы проанализирована динамика изменения жизненно важных показателей пациентов в течение первых 2-х недель лечения, произведена сравнительная оценка длительности лихорадочного периода и общей продолжительности госпитализации больных с учётом времени пребывания в ОРИТ.

### Результаты

В исследование 2GAMMACOVID-19 вошли 37 пациентов со среднетяжёлой формой COVID-19 и установленным на основании данных компьютерной томографии (КТ) диагнозом вирусной пневмонии, из них 36 были рандомизированы в 2 группы терапии. 1 пациент был исключён на этапе скрининга по причине несоответствия критериям включения/невключения. Досрочно выбывших пациентов не зарегистрировано. Настоящая публикация представляет вторичные результаты исследовательского протокола.

Вирусологическое подтверждение диагноза получено у 75% участников с использованием методик полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или иммунофлуоресцентного анализа (ИФА). Характеристика включённых в исследование пациентов по основным демографическим и клиническим данным представлена в **табл. 1**.

По основным показателям обе группы были сопоставимы между собой ( $p > 0,05$ ). Не выявлено различий между ними по статусу курения, особенностям эпидемиологического анамнеза, сопутствующим заболеваниям и остальным клинически значимым параметрам. Статистически значимых отличий по основному диаг-

нозу, форме заболевания, а также по показателям оценки жизненно важных функций также не установлено.

Среди препаратов базовой терапии чаще всего назначались противовирусные (гидроксихлорохин), антибактериальные (азитромицин, цефтриаксон/цефоперазон, левофлоксацин/моксифлоксацин, ванкомицин, ампициллин), антикоагулянтные (соли эноксапарина/надропарина, гепарина) средства.

Результаты анализа средних значений уровня насыщения крови кислородом (**табл. 2**) демонстрируют наибольшую разницу между этими показателями и средними значениями с пограничной величиной коэффициента значимости на 4-й день терапии ( $p = 0,053$ ). Изменения уровня насыщения крови кислородом в сравнении с исходными данными, полученными на скрининге, не выявили статистически значимых отличий между группами исследования и контроля на протяжении 14 дней наблюдения.

Средние величины систолического и диастолического артериального давления (АД) также не продемонстрировали статистически значимых межгрупповых различий, за исключением показателей по окончании курсового лечения исследуемым препаратом – в 5-й день: для систолического АД показано значимое отличие ( $p = 0,049$ ), для диастолического – отмечена тенденция к достоверным различиям между группами ( $p = 0,098$ ) (**табл. 2**). В целом более высокие уровни как систолического, так и диастолического (в большинстве случаев) АД наблюдались у пациентов, получавших ИФН- $\gamma$ . Изменения этого показателя в сравнении с начальными параметрами, полученными на скрининге, не выявили статистически значимых отличий между группами.

Результаты анализа средних значений термометрии (**табл. 2**) выявили стабильное постепенное снижение их в основной группе начиная с 3-го дня терапии с установлением средней нормальной температуры тела (36,7 °C и менее) к 6-му дню. В контрольной группе средний нормализованный показатель (36,7 °C и менее) регистрировался с 11-го дня; при сопоставлении средних значений в 9-й день лечения выявлена статистически значимая разница ( $p = 0,027$ ). Динамика температуры тела в сравнении с исходными величинами, полученными на скрининге, не выявила статистически достоверных отличий между группами, которые к 13-му дню полностью сравнялись по показателям.

Результаты сравнительного анализа длительности лихорадки и продолжительности госпитализации показали, что у получавших ИФН- $\gamma$  гипертермия длилась на 2 сут меньше в сравнении с контрольной группой (9 и 7 сут соответственно) и выписывались они в среднем на 2 сут раньше. При этом ни один из пациентов не был переведён в реанимационное отделение, в то время как участники группы исследования проводили в ОРИТ свыше 50% общей длительности стационарного лечения (до 19 сут) (**табл. 3**).

Доля переведённых в ОРИТ пациентов в контрольной группе составила 15%. Статистически значимых межгрупповых различий по количеству таких больных также не выявлено ( $p = 0,165$ ).

**Таблица 1. Сравнительная характеристика пациентов**

**Table 1. Comparative characteristics of patients**

Параметры Parameters	Основная группа Study group (n = 18)	Контрольная группа Control group (n = 18)
Мужчины, n (%) Men, n (%)	8 (44)	8 (44)
Женщины, n (%) Women, n (%)	10 (56)	10 (56)
Возраст, лет (M $\pm$ SD) Age, years (M $\pm$ SD)	60 $\pm$ 12	66 $\pm$ 12

**Примечание.**  $p > 0,05$  для всех сравниваемых характеристик.

**Note.**  $p > 0.05$  for all compared characteristics.

Таблица 2. Динамика оценки жизненно важных показателей  
 Table 2. Evaluation dynamics of vital signs indicators

Параметры Parameters	Основная группа Study group (n = 18)			Контрольная группа Control group (n = 18)		
	SpO <sub>2</sub> (%)	T <sub>тела</sub> T <sub>body</sub> (°C)	АД (мм рт. ст.) BP (mm Hg)	SpO <sub>2</sub> (%)	T <sub>тела</sub> T <sub>body</sub> (°C)	АД (мм рт. ст.) BP (mm Hg)
День 1 Day 1	94,44 ± 2,89	36,92 ± 0,65	125 ± 12,5/74 ± 5,9	93,28 ± 6,14	36,94 ± 0,83	122 ± 9,0/73 ± 4,4
День 2 Day 2	93,28 ± 3,01	37,22 ± 0,76	122 ± 11,7/74 ± 6,5	94,89 ± 2,62	36,97 ± 0,77	121 ± 9,0/72 ± 6,3
День 3 Day 3	93,50 ± 3,76	36,88 ± 0,58	123 ± 10,8/75 ± 5,6	94,00 ± 3,50	36,87 ± 0,45	121 ± 8,5/72 ± 5,7
День 4 Day 4	95,06 ± 2,53 <sup>(*)</sup>	36,76 ± 0,36	125 ± 13,3/75 ± 8,6	91,78 ± 6,24 <sup>(*)</sup>	36,83 ± 0,28	120 ± 7,7/72 ± 5,7
День 5 Day 5	93,72 ± 2,08	36,75 ± 0,42	128 ± 14,6 <sup>*</sup> / 77 ± 9,6 <sup>(*,**)</sup>	93,61 ± 4,51	36,88 ± 0,63	119 ± 9,8 <sup>*</sup> /72 ± 7,6 <sup>(*,**)</sup>
День 6 Day 6	94,39 ± 3,16	36,74 ± 0,20	123 ± 13,3/74 ± 9,1	93,67 ± 4,62	36,97 ± 0,60	119 ± 10,4/72 ± 6,0
День 7 Day 7	94,94 ± 2,53	36,74 ± 0,34	122 ± 11,0/76 ± 8,1	94,11 ± 4,54	36,79 ± 0,58	119 ± 13,4/72 ± 8,6
День 8 Day 8	94,17 ± 2,99	36,63 ± 0,28	122 ± 7,9/74 ± 6,4	94,00 ± 2,89	36,79 ± 0,46	122 ± 10,7/75 ± 9,6
День 9 Day 9	95,39 ± 1,86	36,56 ± 0,21 <sup>*</sup>	123 ± 8,1/76 ± 5,6	94,50 ± 3,37	36,78 ± 0,32 <sup>*</sup>	121 ± 9,7/74 ± 9,2
День 10 Day 10	95,28 ± 2,10	36,60 ± 0,14	123 ± 9,9/76 ± 5,6	95,40 ± 3,18	36,76 ± 0,36	121 ± 6,5/73 ± 7,8
День 11 Day 11	95,39 ± 1,95	36,62 ± 0,18	122 ± 10,2/75 ± 5,6	96,06 ± 2,48	36,66 ± 0,25	121 ± 8,6/76 ± 7,4
День 12 Day 12	95,33 ± 1,86	36,59 ± 0,20	123 ± 10,6/76 ± 5,9	95,94 ± 2,04	36,70 ± 0,28	121 ± 6,6/74 ± 8,8
День 13 Day 13	95,44 ± 1,80	36,63 ± 0,16	123 ± 10,6/76 ± 5,9	95,72 ± 2,42	36,60 ± 0,23	122 ± 7,6/75 ± 7,9
День 14 Day 14	95,44 ± 1,80	36,64 ± 0,15	123 ± 10,6/76 ± 5,9	95,72 ± 2,56	36,63 ± 0,24	121 ± 6,1/74 ± 7,3

**Примечание.** \**p* < 0,05 – статистически значимые различия средних значений между группами;  
 (\**p* < 0,10 – тенденция к достоверным различиям средних значений между группами;  
 (\*\**p* < 0,10 – тенденция к достоверным различиям изменений по сравнению с исходным значением между группами;  
 SpO<sub>2</sub> – уровень насыщения крови кислородом;  
 T<sub>тела</sub> – температура тела;  
 АД – артериальное давление.  
**Note.** \**p* < 0,05 – statistically significant differences in mean values between groups;  
 \*\**p* < 0,05 – statistically significant differences in changes compared with the baseline value between groups;  
 (\**p* < 0,10 – tendency towards significant differences in mean values between groups;  
 (\*\**p* < 0,10 – tendency towards significant differences in changes compared with the baseline value between groups;  
 SpO<sub>2</sub> – oxygen saturation level;  
 T<sub>body</sub> – body temperature;  
 BP – blood pressure.

Таблица 3. Сравнительная оценка прогрессирования заболевания  
 Table 3. Comparative assessment of disease progression

Параметры Indicators	Основная группа Study group (n = 18)	Контрольная группа Control group (n = 18)
Переведено в ОРИТ Transferred to RICU n (%)	0 (0) <sup>(*)</sup>	3 (15) <sup>(*)</sup>
Не переведено в ОРИТ Not transferred to RICU n (%)	18 (100) <sup>(*)</sup>	15 (85) <sup>(*)</sup>

**Примечание.** *p* > 0,05 для всех сравниваемых характеристик;  
 (\**p* < 0,10 – тенденция к достоверным различиям средних значений между группами;  
 ОРИТ – отделение реанимации и интенсивной терапии.  
**Note.** *p* > 0,05 for all compared characteristics;  
 (\**p* < 0,10 – tendency towards significant differences in mean values between groups;  
 RICU – resuscitation and intensive care unit.

## Обсуждение

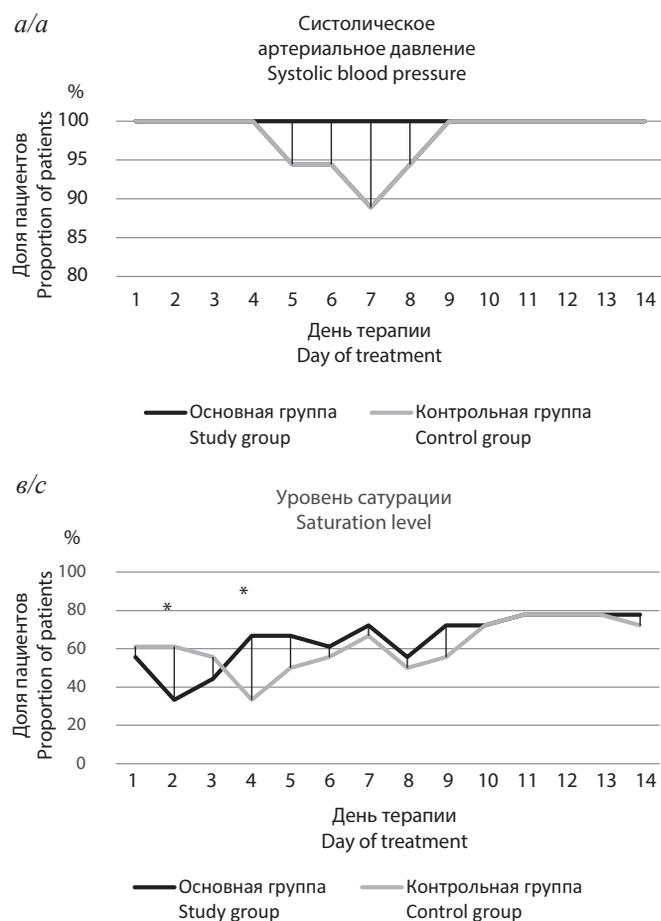
Несмотря на то что изначально в первые дни терапии количество исследуемых с отклонением по насыщенности кислородом (сатурации) крови (SpO<sub>2</sub>) в контрольной группе было меньше (во 2-й день выявлено статистически значимое различие по доле больных с нормальными значениями этого показателя в пользу группы контроля), к 4-му дню лечения это распределение кардинально изменилось. В основной группе более половины участников продемонстрировали нормальные значения SpO<sub>2</sub>, превышающие 94% [25]. Сравнительный анализ показал статистически значимую разницу между группами на 4-й день терапии (*p* = 0,03), а к 10-му дню они сравнялись по результатам (см. **рисунок, в**). Начиная с 11-го дня все пациенты обеих групп имели показатели пульсоксиметрии

трии выше 90%, при этом среди тех, кому назначался ИФН-γ, этот порог был достигнут на 9-й день лечения с сохранением на протяжении всего дальнейшего периода наблюдения.

Важно, что все участники в начале исследования в 89% случаев не требовали респираторной поддержки и дышали самостоятельно. В период терапии на 4–6-й дни отмечалось некоторое ухудшение состояния – около 1/3 больных (28%) в обеих группах были переведены на дополнительную оксигенотерапию через назальный катетер с разной скоростью потока (от 1 до 6 л/мин). На 7-й день доля пациентов, требующих респираторной поддержки, в обеих группах была одинаковой. Через 14 дней лечения в основной группе все пациенты имели самостоятельное дыхание, в контрольной – отмечено повышение доли находящихся на оксигенотерапии (66%). Таким образом, за период наблюдения достигнуты лучшие в сравнении с группой контроля динамические показатели оксигенации.

Кроме того, следует отметить, что пациенты обеих групп в начале исследования имели нормальные либо субнормальные уровни АД (выше 99/69 мм рт. ст.).

В период терапии на 4–6-й дни отмечено некоторое ухудшение этих показателей. На 7-й день в основной группе доля исследуемых со стабильным АД достигла исходной величины, а уже через 1 сут (9-й день лечения) все больные были стабилизированы. В контрольной группе исходные параметры достигнуты не были, но отмечено повышение доли стабилизированных пациентов с 11-го дня терапии (см. рисунок, а, б). Таким образом, отмечены лучшие в сравнении с контрольной группой показатели АД на протяжении периода наблюдения. Сравнительный анализ показал отсутствие статистически значимой разницы между группами, однако в 9-й и 10-й дни выявлена тенденция к появлению достоверных различий. Несмотря на то что имеются сведения в пользу прямой корреляции величины АД с частотой развития дыхательной недостаточности [26], полученные в исследовании 2GAM-MACOVID-19 данные говорят об обратной зависимости. Необходимо подчеркнуть, что группы были сопоставимы по количеству участников, принимающих блокаторы ангиотензиновых рецепторов и ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента ( $p = 0,206$  и  $0,814$  соответственно).



Динамика доли пациентов с нормализованными показателями жизненно важных функций.

(а) систолическое артериальное давление; (б) диастолическое артериальное давление; (в) уровень сатурации; (г) температура тела; \*статистически значимое отличие ( $p < 0,05$ ).

Dynamics of the proportion of patients with normalized indices of vital signs.

(a) systolic blood pressure; (b) diastolic blood pressure; (c) saturation level; (d) body temperature; \*statistically significant difference ( $p < 0.05$ ).

Хотя изначально количество лихорадящих пациентов среди получавших ИФН- $\gamma$  было бóльшим, к 4-му дню терапии у 67% (против 50% в контрольной группе) пациентов отмечены нормальные показатели температуры тела. В дальнейшем после 1-й недели группа исследования показала несколько лучшие результаты по сравнению с контролем. Выявлены достоверные межгрупповые различия в 8-й ( $p(f) = 0,040$ ), 9-й ( $p(f) = 0,038$ ) и 10-й дни ( $p(f) = 0,000$ ) (см. **рисунок, з**).

Несколько более благоприятная динамика стабилизации жизненно важных показателей оказалась ассоциированной с сокращённой длительностью периода лихорадки и продолжительности госпитализации, лучшими показателями общего состояния пациентов и их выживаемости в основной группе [27], что позволяет предположить позитивное влияние ИФН- $\gamma$  на процессы восстановления при среднетяжёлом течении новой коронавирусной инфекции. Особого внимания заслуживает тот факт, что получавшие препарат в дополнение к базовой комплексной терапии основного заболевания не отмечали ухудшения состояния, прогрессирования дыхательной недостаточности и не требовали перевода в ОРИТ.

Важно отметить, что результаты настоящего исследования ограничены небольшим количеством наблюдений (т.е. малой выборкой). При проведении анализа данных отмечено, что различия между группами стремились в части случаев к достижению статистической достоверности, которая может быть установлена при увеличении количества участников.

В данный протокол включались больные с вирусной пневмонией среднетяжёлой степени. С целью получения дополнительных сведений о влиянии ИФН- $\gamma$  на течение COVID-19 в лёгкой форме, когда предполагается наибольшая эффективность его терапевтического воздействия, рекомендовано дальнейшее изучение действия препарата в рамках пострегистрационных клинических исследований.

### Выводы

Добавление ИФН- $\gamma$  к комплексной терапии COVID-19 у пациентов со среднетяжёлой формой заболевания способствует лучшему насыщению крови кислородом и, как следствие, снижению риска потребности в оксигенотерапии к концу 2-й недели пребывания в стационаре. В свою очередь наблюдающаяся на этом фоне более быстрая нормализация температуры тела ведёт к сокращению длительности госпитализации, при этом не требуется перевод в ОРИТ.

Таким образом, результаты исследования 2GAM-MACoVID-19 продемонстрировали повышение эффективности комплексной терапии новой коронавирусной инфекции с использованием рекомбинантного ИФН- $\gamma$ . Положительное воздействие на динамику жизненно важных функций пациентов подтверждается уменьшением периода стационарного лечения. Кроме этого, ни один пациент из группы, где назначался данный препарат, не был переведён в ОРИТ.

Прогресс в лечении больных со среднетяжёлой формой COVID-19 путём дополнения комплексной

терапии рекомбинантным ИФН- $\gamma$  для подкожного и внутримышечного введения может обоснованно расширить ряд существующих методов лечения новой коронавирусной инфекции.

### ЛИТЕРАТУРА

1. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=COVID-19%2C+SARS-CoV-2&term=IFN&cntry=&state=&city=&dist=> (accessed December 16, 2020).
2. Dastan F., Nadji S.A., Saffaei A., Marjani M., Moniri A., Jamaati H., et al. Subcutaneous administration of interferon beta-1a for COVID-19: A non-controlled prospective trial. *Int. Immunopharmacol.* 2020; 85(106688): 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.in-timp.2020.106688>. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7275997/pdf/main.pdf> (accessed December 16, 2020).
3. Zhou Q., Chen V., Shannon C.P., Wei X.S., Xiang X., Wang X., et al. Interferon- $\alpha$ 2b Treatment for COVID-19. *Front. Immunol.* 2020; 11:1–6.
4. Koch T., Dahlke C., Fathi A., Kupke A., Krähling V., Okba N.M.A., et al. Safety and immunogenicity of a modified vaccinia virus Ankara vector vaccine candidate for Middle East respiratory syndrome: an open-label, phase 1 trial. *Lancet Infect. Dis.* 2020; 20(7): 827–38.
5. Rodriguez-Morales A.J., Cardona-Ospina J.A., Gutiérrez-Ocampo E., Villamizar-Peña R., Holguin-Rivera Y., Escalera-Antezana J.P., et al. Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med. Infect. Dis.* 2020; 34: 101623.
6. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020; 395(10223): 497–506.
7. Hu Z., Song C., Xu C., Jin G., Chen Y., Xu X., et al. Clinical characteristics of 24 asymptomatic infections with COVID-19 screened among close contacts in Nanjing, China. *Sci. China Life Sci.* 2020; 63(5): 706–11.
8. Rockx B., Kuiken T., Herfst S., Bestebroer T., Lamers M.M., Oude Munnink B.B., et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science.* 2020; 368(6494): 1012–5. [cited 2020 Jun 22] Available from: <https://science.sciencemag.org/content/368/6494/1012> (accessed December 16, 2020).
9. Moore J.B., June C.H. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science (80-)*. 2020; 368(6490): 473–4.
10. Wang J., Hajizadeh N., Moore E.E., McIntyre R.C., Moore P.K., Veress L.A., et al. Tissue plasminogen activator (tPA) treatment for COVID-19 associated acute respiratory distress syndrome (ARDS): A case series. *J. Thromb. Haemost.* 2020; 18(7): 1752–5.
11. Felsenstein S., Herbert J.A., McNamara P.S., Hedrich C.M. COVID-19: Immunology and treatment options. *Clin. Immunol.* 2020; 215: 108448. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108448> (accessed December 16, 2020).
12. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020; 395(10229): 1054–62. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3) (accessed December 16, 2020).
13. Wang N., Zhan Y., Zhu L., Hou Z., Liu F., Song P., et al. Retrospective Multicenter Cohort Study Shows Early Interferon Therapy Is Associated with Favorable Clinical Responses in COVID-19 Patients. *Cell Host Microbe.* 2020; 28(3): 455–64.e2. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.07.005> (accessed December 16, 2020).
14. Hung I.F.N., Lung K.C., Tso E.Y.K., Liu R., Chung T.W.H., 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. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31042-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31042-4) (accessed December 16, 2020).
15. Torres Acosta M.A., Singer B.D. Pathogenesis of COVID-19-induced ARDS: implications for an ageing population. *Eur. Respir. J.* 2020; 56(3): 2002049. Available from: <http://dx.doi.org/10.1183/13993003.02049-2020> (accessed December 16, 2020).
16. Lee A.J., Ashkar A.A. The dual nature of type I and type II interferons. *Frontiers in Immunology*. Vol. 9. Frontiers Media S.A.; 2018. [cited 2020 Jun 23] Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30254639/> (accessed December 16, 2020).
17. Costa-Pereira A.P., Williams T.M., Strobl B., Watling D., Briscoe J., Kerr I.M. The Antiviral Response to Gamma Interferon. *J. Virol.* 2002; 76(18): 9060–8. [cited 2020 Jun 23] Available from: <https://jvi.asm.org/content/76/18/9060> (accessed December 16, 2020).
18. Rhein B.A., Powers L.S., Rogers K., Anantpadma M., Singh B.K., Sakurai Y., et al. Interferon- $\gamma$  Inhibits Ebola Virus Infection. *PLoS*

- Pathog.* 2015; 11(11): e1005263. [cited 2020 Jun 23] Available from: <https://pmc/articles/PMC4643030/?report=abstract> (accessed December 16, 2020).
19. Sainz B., Mossel E.C., Peters C.J., Garry R.F. Interferon-beta and interferon-gamma synergistically inhibit the replication of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV). *Virology*. 2004; 329(1): 11–7.
  20. Сологуб Т.В., Токин И.И., Цветков В.В., Деева Э.Г. Возможности использования интерферона-гамма в комплексной терапии больных хроническим гепатитом С. *Инфекционные болезни*. 2013; 11(2): 74–80.
  21. Shan L., Fu F., Xue M., Zhu X., Li L., Feng L., et al. Interferon gamma inhibits transmissible gastroenteritis virus infection mediated by an IRF1 signaling pathway. *Arch. Virol.* 2019; 164(11): 2659–69. [cited 2020 Jun 23] Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-019-04362-2> (accessed December 16, 2020).
  22. Myasnikov A., Berns S., Zverev K., Lartseva O., Talyzin P. Efficacy of Interferon Gamma in the Prevention of SARS-CoV-2 Infection (COVID-19): Results of a Prospective Controlled Trial. *Int. J. Biomed.* 2020; 10(3): 182–8.
  23. Tokin I., Nikiforov V., Shabalkin P., Pimanchev P., Isakova J., Tsvetkov V. Randomized Controlled Parallel-Design Clinical Study of the Efficacy and Safety of Intranasal Interferon gamma in Treatment of Influenza-Like Infections. *Int. J. Biomed.* 2018; 8(4): 327–32.
  24. Белевский А.С., Бернс С.А., Ларцева О.А., Мясников А.Л., Надарая В.М., Тальзин П.А. Эффективность и безопасность гамма-интерферона при лечении внебольничной пневмонии: результаты открытого рандомизированного исследования IN/100000-317. *Медицина*. 2019; 4: 110–25. doi: 10.29234/2308-9113-2019-7-4-110-125.
  25. Shenoy N., Luchtel R., Gulani P. Considerations for target oxygen saturation in COVID-19 patients: Are we under-shooting? *BMC Med.* 2020; 18(1): 1–6.
  26. Vicenzi M., Di Cosola R., Ruscica M., Ratti A., Rota I., Rota F., et al. The liaison between respiratory failure and high blood pressure: Evidence from COVID-19 patients. *Eur. Respir. J.* 2020; 56(1): 2001157.
  27. Мясников А.Л., Бернс С.А., Ершов Ф.И. Опыт клинического применения интерферона гамма в комплексной терапии пациентов с новой коронавирусной инфекцией COVID-19. *Российский медицинский журнал*. 2020; 26(6): 394-401. DOI: <http://doi.org/10.17816/0869-2106-2020-26-5-394-401>.
- ### REFERENCES
1. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=COVID-19%2C+SARS-CoV-2&term=IFN&cntry=&state=&city=&dist=> (accessed December 16, 2020).
  2. Dastan F., Nadji S.A., Saffaei A., Marjani M., Moniri A., Jamaati H., et al. Subcutaneous administration of interferon beta-1a for COVID-19: A non-controlled prospective trial. *Int. Immunopharmacol.* 2020; 85(106688): 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106688>. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7275997/pdf/main.pdf> (accessed December 16, 2020).
  3. Zhou Q., Chen V., Shannon C.P., Wei X.S., Xiang X., Wang X., et al. Interferon- $\alpha$ 2b Treatment for COVID-19. *Front. Immunol.* 2020; 11:1–6.
  4. Koch T., Dahlke C., Fathi A., Kupke A., Krähling V., Okba N.M.A., et al. Safety and immunogenicity of a modified vaccinia virus Ankara vector vaccine candidate for Middle East respiratory syndrome: an open-label, phase 1 trial. *Lancet Infect. Dis.* 2020; 20(7): 827–38.
  5. Rodriguez-Morales A.J., Cardona-Ospina J.A., Gutiérrez-Ocampo E., Villamizar-Peña R., Holguin-Rivera Y., Escalera-Antezana J.P., et al. Clinical, laboratory and imaging features of COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Travel Med. Infect. Dis.* 2020; 34: 101623.
  6. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020; 395(10223): 497–506.
  7. Hu Z., Song C., Xu C., Jin G., Chen Y., Xu X., et al. Clinical characteristics of 24 asymptomatic infections with COVID-19 screened among close contacts in Nanjing, China. *Sci. China Life Sci.* 2020; 63(5): 706–11.
  8. Rockx B., Kuiken T., Herfst S., Bestebroer T., Lamers M.M., Oude Munnink B.B., et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science.* 2020; 368(6494): 1012–5. [cited 2020 Jun 22] Available from: <https://science.sciencemag.org/content/368/6494/1012> (accessed December 16, 2020).
  9. Moore J.B., June C.H. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science (80-)*. 2020; 368(6490): 473–4.
  10. Wang J., Hajizadeh N., Moore E.E., McIntyre R.C., Moore P.K., Veress L.A., et al. Tissue plasminogen activator (tPA) treatment for COVID-19 associated acute respiratory distress syndrome (ARDS): A case series. *J. Thromb. Haemost.* 2020; 18(7): 1752–5.
  11. Felsenstein S., Herbert J.A., McNamara P.S., Hedrich C.M. COVID-19: Immunology and treatment options. *Clin. Immunol.* 2020; 215: 108448. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108448> (accessed December 16, 2020).
  12. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020; 395(10229): 1054–62. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3) (accessed December 16, 2020).
  13. Wang N., Zhan Y., Zhu L., Hou Z., Liu F., Song P., et al. Retrospective Multicenter Cohort Study Shows Early Interferon Therapy Is Associated with Favorable Clinical Responses in COVID-19 Patients. *Cell Host Microbe.* 2020; 28(3): 455–64.e2. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.07.005> (accessed December 16, 2020).
  14. Hung I.F.N., Lung K.C., Tso E.Y.K., Liu R., Chung T.W.H., 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. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31042-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31042-4) (accessed December 16, 2020).
  15. Torres Acosta M.A., Singer B.D. Pathogenesis of COVID-19-induced ARDS: implications for an ageing population. *Eur. Respir. J.* 2020; 56(3): 2002049. Available from: <http://dx.doi.org/10.1183/13993003.02049-2020> (accessed December 16, 2020).
  16. Lee A.J., Ashkar A.A. The dual nature of type I and type II interferons. *Frontiers in Immunology*. Vol. 9. Frontiers Media S.A.; 2018. [cited 2020 Jun 23] Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30254639/> (accessed December 16, 2020).
  17. Costa-Pereira A.P., Williams T.M., Strobl B., Watling D., Briscoe J., Kerr I.M. The Antiviral Response to Gamma Interferon. *J. Virol.* 2002; 76(18): 9060–8. [cited 2020 Jun 23] Available from: <https://jvi.asm.org/content/76/18/9060> (accessed December 16, 2020).
  18. Rhein B.A., Powers L.S., Rogers K., Anantpadma M., Singh B.K., Sakurai Y., et al. Interferon- $\gamma$  Inhibits Ebola Virus Infection. *PLoS Pathog.* 2015; 11(11): e1005263. [cited 2020 Jun 23] Available from: <https://pmc/articles/PMC4643030/?report=abstract> (accessed December 16, 2020).
  19. Sainz B., Mossel E.C., Peters C.J., Garry R.F. Interferon-beta and interferon-gamma synergistically inhibit the replication of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV). *Virology*. 2004; 329(1): 11–7.
  20. Sologub T.V., Tokin I.I., Tsvetkov V.V., Deyeva E.G. Possibilities of using interferon-gamma in the complex therapy of patients with chronic hepatitis C. [*Vozможности ispol'zovaniya interferona-gamma v kompleksnoy terapii bol'nykh khronicheskim gepatitom CJ. Infektsionnye bolezni.* 2013; 11 (2): 74–80 (in Russian)].
  21. Shan L., Fu F., Xue M., Zhu X., Li L., Feng L., et al. Interferon gamma inhibits transmissible gastroenteritis virus infection mediated by an IRF1 signaling pathway. *Arch. Virol.* 2019; 164(11): 2659–69. [cited 2020 Jun 23] Available at: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00705-019-04362-2> (accessed December 16, 2020).
  22. Myasnikov A., Berns S., Zverev K., Lartseva O., Talyzin P. Efficacy of Interferon Gamma in the Prevention of SARS-CoV-2 Infection (COVID-19): Results of a Prospective Controlled Trial. *Int. J. Biomed.* 2020; 10(3): 182–8.
  23. Tokin I., Nikiforov V., Shabalkin P., Pimanchev P., Isakova J., Tsvetkov V. Randomized Controlled Parallel-Design Clinical Study of the Efficacy and Safety of Intranasal Interferon gamma in Treatment of Influenza-Like Infections. *Int. J. Biomed.* 2018; 8(4): 327–32.
  24. Belevsky A.S., Burns S.A., Lartseva O.A., Myasnikov A.L., Nadaraya V.M., Talyzin P.A. Efficacy and safety of interferon gamma in the treatment of community-acquired pneumonia: results of an open-label randomized trial IN/100000-317. [*Effektivnost' i bezopasnost' gamma-interferona pri lechenii vnebol'nichnoy pnevmonii: rezultaty otkrytogo randomizirovannogo issledovaniya IN/100000-317. Meditsina.* 2019; 4: 110–25. doi: 10.29234/2308-9113-2019-7-4-110-125 (in Russian)].
  25. Shenoy N., Luchtel R., Gulani P. Considerations for target oxygen saturation in COVID-19 patients: Are we under-shooting? *BMC Med.* 2020; 18(1): 1–6.
  26. Vicenzi M., Di Cosola R., Ruscica M., Ratti A., Rota I., Rota F., et al. The liaison between respiratory failure and high blood pressure: Evidence from COVID-19 patients. *Eur. Respir. J.* 2020; 56(1): 2001157.
  27. Myasnikov A.L., Berns S.A., Ershov F.I. Clinical application of interferon gamma in comprehensive therapy of patients with coronavirus infection. *Rossiiskii meditsinskii zhurnal (Medical Journal of the Russian Federation, Russian journal)*. 2020; 26(6): 394-401 (in Russ.) DOI: <http://doi.org/10.17816/0869-2106-2020-26-5-394-401>.



## Синтез и характеристика вирусоподобных частиц ротавируса A (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*) человека

Черепушкин С.А.<sup>1</sup>, Цибезов В.В.<sup>1</sup>, Южаков А.Г.<sup>1</sup>, Латышев О.Е.<sup>1</sup>, Алексеев К.П.<sup>1</sup>, Алтаева Э.Г.<sup>2</sup>, Хаметова К.М.<sup>1</sup>, Воркунова Г.К.<sup>1</sup>, Южакова К.А.<sup>1</sup>, Гребенникова Т.В.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>ООО «Ветбиохим», 105120, Москва, Россия

**Введение.** Ротавирусная инфекция (РВИ) является основной причиной острого гастроэнтерита у детей до 5 лет. Проблема разработки новых вакцин против ротавируса (РВ) А до настоящего времени актуальна, так как возбудитель имеет множество генотипов, часть из которых представлена только в определённых регионах. Один из перспективных путей создания эффективных и безопасных вакцинных препаратов в настоящее время – использование вирусоподобных частиц (ВпЧ).

**Цель** данного исследования – разработать технологию получения ВпЧ на основе белков РВ VP4, VP7, генотипы которых наиболее представлены на территории Российской Федерации, а также VP2 и VP6; дать их молекулярно-генетическую и вирусологическую характеристику.

**Материал и методы.** В работе использовали вирулентный штамм Wa G1P[8] РВ А человека, адаптированный к клеточной культуре MARC-145, который культивировали и очищали по описанной авторами ранее методике. Применяли стандартные молекулярно-генетические и цитологические методы: синтез генов, клонирование в трансферные плазмиды, получение рекомбинантных бакуловирусов; производство ВпЧ с помощью бакуловирусной системы экспрессии Vac-to-Vac в клетках насекомых; центрифугирование в растворе сахарозы; иммуноферментный анализ (ИФА); электронная микроскопия (ЭМ); электрофорез (ЭФ) в полиакриламидном геле с додецилсульфатом (лаурилсульфатом) натрия (ПААГ-ДСН); иммуноблоттинг.

**Результаты.** Для включения в состав ВпЧ выбраны 6 наиболее распространённых в России генотипов РВ А по белкам VP4 и VP7 (G1, G2, G4, G9, P4, P8), а также VP2 и VP6. Получены рекомбинантные бакуловирусы, содержащие оптимизированные для экспрессии в клетках насекомых последовательности выбранных генов. Клетки совки (*Trichoplusia ni*) коинфицированы различными сочетаниями указанных вирусов с получением ВпЧ, состоящих из 2–4 белков. Эти частицы очищены центрифугированием в растворе сахарозы. По результатам ЭМ морфология и размер частиц соответствовали вириону РВ А. Присутствие в них белков данного патогена подтверждено методами ИФА, электрофореза в ПААГ-ДСН и последующего иммуноблоттинга.

**Заключение.** Разработана и оптимизирована технология синтеза 3-слойных ВпЧ, состоящих из белков РВ А VP2, VP4, VP6, VP7. Полученные частицы содержат белки VP4 и VP7 6 генотипов, наиболее представленных на территории России, и могут быть использованы для создания вакцинных препаратов против РВ А.

**Ключевые слова:** ротавирус А человека; вирусоподобные частицы; бакуловирусная система экспрессии; вакцина на основе ВпЧ

**Для цитирования:** Черепушкин С.А., Цибезов В.В., Южаков А.Г., Латышев О.Е., Алексеев К.П., Алтаева Э.Г., Хаметова К.М., Воркунова Г.К., Южакова К.А., Гребенникова Т.В. Синтез и характеристика вирусоподобных частиц ротавируса А (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*) человека. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(1): 55–64. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-27>

**Для корреспонденции:** Черепушкин Станислав Андреевич, научный сотрудник лаборатории прикладной вирусологии и биотехнологии, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия. E-mail: [cherpushkin1@gmail.com](mailto:cherpushkin1@gmail.com)

**Участие авторов:** Черепушкин С.А. – проведение экспериментальных исследований, написание текста; Цибезов В.В. – проведение экспериментальных исследований, написание текста; Южаков А.Г., Латышев О.Е., Алексеев К.П., Алтаева Э.Г. – проведение экспериментальных исследований; Хаметова К.М. – сбор и обработка материалов; Воркунова Г.К. – проведение экспериментальных исследований; Южакова К.А. – сбор и обработка материалов; Гребенникова Т.В. – написание резюме, заключения, общая редакция текста.

**Финансирование.** Работа финансирована Государственной тематикой Министерства здравоохранения Российской Федерации «Разработка подходов для создания вакцины против инфекции, вызванной ротавирусом типа А» (регистрационный номер АААА-А18-118051490143-3).

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

Поступила 24.10.2020

Принята в печать 12.11.2020

## Synthesis and characterization of human rotavirus A (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*) virus-like particles

Stanislav A. Cherepushkin<sup>1</sup>, Valeriy V. Tsibezov<sup>1</sup>, Anton G. Yuzhakov<sup>1</sup>, Oleg E. Latyshev<sup>1</sup>, Konstantin P. Alekseev<sup>1</sup>, Erzhen G. Altayeva<sup>2</sup>, Kizkhalum M. Khametova<sup>1</sup>, Galina K. Vorkunova<sup>1</sup>, Ksenia A. Yuzhakova<sup>1</sup>, Tatyana V. Grebennikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FSBI «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya», 123098, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>LLC «Vetbiochem» 105120, Moscow, Russia

**Introduction.** Rotavirus infection is the leading cause of acute gastroenteritis among infants. The development of new vaccines against rotavirus A is urgent because the virus has many genotypes, some of which have regional prevalence. Virus-like particles (VLP) is a promising way to create effective and safe vaccine preparations.

**The purpose** of the study is to develop the technology for the production of VLP, containing VP2, VP4, VP6 and VP7 of viral genotypes prevalent on the territory of the Russian Federation, and to give its molecular genetic and virological characteristics.

**Material and methods.** The virulent strain Wa G1P[8] of human RV A adapted to MARC-145 cell culture has been used. It was cultured and purified according to the method described by the authors earlier. Standard molecular genetic and cytological methods were used: gene synthesis; cloning into transfer plasmids; recombinant baculoviruses production in Bac-to-Bac expression system; VLP production in the insect cells; centrifugation in sucrose solution; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); electron microscopy (EM); polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot analysis.

**Results.** VP4 and VP7 of the six most represented in Russia genotypes: G1, G2, G4, G9, P4, P8, as well as VP2 and VP6 were selected for VLP production. Recombinant baculoviruses were obtained with codon frequencies optimized for insect cells. Cabbage looper (*Trichoplusia ni*) cell culture was coinfecting with different combinations of baculoviruses, and VLP consisting of 2–4 proteins were produced. VLP were purified by centrifugation. The size and morphology of the particles matched the rotavirus A virion (by EM). The presence of rotavirus A proteins in VLP was confirmed by the ELISA, SDS-PAGE and western blot analysis.

**Conclusion.** The technology for the synthesis of three-layer VLP consisting of VP2, VP4, VP6 and VP7 has been developed and optimized. The resulting VLP composition represents 6 serotypes of VP4 and VP7, which are most represented on the territory of Russia, and can be used for vaccine development.

**Key words:** human rotavirus A; virus-like particles; baculovirus expression system; VLP-based vaccine

**For citation:** Cherepushkin S.A., Tsibezov V.V., Yuzhakov A.G., Latyshev O.E., Alekseev K.P., Altayeva E.G., Khametova K.M., Vorkunova G.K., Yuzhakova K.A., Grebennikova T.V. Synthesis and characterization of human rotavirus A (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*) virus-like particles. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(1): 55-64 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-27>

**For correspondence:** Stanislav A. Cherepushkin, Researcher, Laboratory of Applied Virology and Biotechnology, FSBI «National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia. E-mail: [cherepushkin1@gmail.com](mailto:cherepushkin1@gmail.com)

### Information about the authors:

Cherepushkin S.A., <https://orcid.org/0000-0002-1734-5369>

Tsibezov V.V., <https://orcid.org/0000-0003-2150-5764>

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

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

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

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

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

Vorkunova G. K., <https://orcid.org/0000-0003-1346-3744>

Yuzhakova K.A., <https://orcid.org/0000-0003-3130-5029>

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

**Contribution:** Cherepushkin S.A. – performing the experiments, writing of the text; Tsibezov V.V. – performing the experiments, writing of the text; Yuzhakov A.G., Latyshev O.E., Alekseev K.P., Altayeva E.G. – performing the experiments; Khametova K.M. – material collection and processing; Vorkunova G.K. – performing the experiments; Yuzhakova K.A. – material collection and processing; Grebennikova T.V. – writing of the summary, conclusion, editing of the text.

**Acknowledgments.** The study was supported by state task of the Ministry of Health of Russia «Development of approaches to create a vaccine against rotavirus type A infection» No. AAAA-A18-118051490143-3.

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

Received 24 October 2020  
Accepted 12 November 2020

### Введение

Ротавирусный гастроэнтерит – высококонтагиозное острое кишечное заболевание, особенно тяжело про-

текающее у детей младше 5 лет. Возбудителем инфекции является ротавирус (РВ) (род *Rotavirus* семейства *Reoviridae*). Ежегодно ротавирусная инфекция (РВИ)

приводит к смерти более 200 тыс. детей во всём мире [1]. В России заболеваемость ей в 2019 г. составила 70,26 на 100 тыс. населения (в 2018 г. – 81,3) [2, 3].

Основным и наиболее эффективным методом специфической профилактики РВИ считается вакцинация [1]. Более чем в 100 странах мира для иммунизации детей используются 2 живые ослабленные вакцины: моновалентная Rotarix® («GlaxoSmithKline», Бельгия) и пентавалентная RotaTeq® («Merck & Co», США). Первый препарат разработан на основе аттенуированного штамма человеческого возбудителя, циркулировавшего в США с 1988 по 1998 г., который был клонирован и ослаблен путём многократных пассажей в культуре [4]. 5-валентная вакцина RotaTeq® создана из штамма РВ крупного рогатого скота (КРС), модифицированного посредством реассортации (смешения генетического материала) с несколькими возбудителями РВИ человека; в результате получена комбинация из 5 вирусных штаммов с полным набором основных антигенов (АГ) человеческого инфекционного агента. С 2012 г. эта вакцина зарегистрирована в Российской Федерации. Помимо этого на международном уровне доступны преквалифицированные ВОЗ моновалентная вакцина Rotavac® («Bharat Biotech», Индия) и 5-валентная RotaSiil® (Serum Institute of India, Индия) [4, 5].

Однако, несмотря на высокую протективную эффективность живых вакцинных препаратов, при их применении возможно возникновение серьёзных осложнений, включая инвагинацию кишечника [6]. Кроме того, всегда сохраняется риск восстановления вирулентности штаммов вакцин вследствие реассортации с вирулентными полевыми штаммами РВ [7]. В связи с этим продолжают исследования в области поиска и апробации новых подходов к вакцинации, исключающих или ограничивающих использование живого инфекционного агента. Подобные методики предполагают, в частности, применение в качестве АГ рекомбинантных вирусных белков [4] и вирусоподобных частиц (ВпЧ) на их основе [8–10].

Вирион РВ состоит из 6 структурных белков: VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 и VP7. Из них первые 3 формируют внутренний слой оболочки вируса. Белок VP6, на долю которого приходится около 80% всей белковой массы вириона, является основной группоспецифичной антигенной детерминантой РВ. Наибольший интерес в качестве возможных АГ для включения в состав вакцин представляют белки VP4 и VP7, образующие внешнюю часть оболочки, поскольку именно они индуцируют образование вируснейтрализующих антител (АТ) и обуславливают серотипические отличия вируса [1]. На сегодняшний день известно 36 серотипов гликозилированного белка VP7 (G-протеина), из которых 13 обнаружены в человеческих образцах. Наиболее распространены в мире 6 серотипов (G1, G2, G3, G4, G9 и G12) [11]. Для чувствительного к протеиназе белка VP4 (P-протеин) к настоящему времени выявлен 51 P-серотип (16 встречаются в образцах тканей человека) [12]. Всего из клинических образцов выделены 73 G/P-комбинации, однако ва-

рианты генотипов G4[P8], G1[P8], G3[P8], G2[P4], G9[P8] составляют свыше 90% от всех известных [13]. Таким образом, именно они должны использоваться в качестве потенциальных кандидатов при создании эффективной вакцины на основе рекомбинантных белковых элементов.

Рекомбинантные белки РВ VP2, VP4, VP6 и VP7 в различных сочетаниях, полученные с использованием бакуловирусной системы экспрессии, обладают способностью к спонтанной самосборке с образованием ВпЧ. При этом VP2 и VP6 формируют «базовые» структуры, на основе которых возможно образование более сложных 3- и 4-компонентных частиц с участием VP4 и VP7. Конформация рекомбинантных белков в таких структурах близка к нативной, что обуславливает их специфическую иммуногенность, а отсутствие генетического материала исключает инфекционность ВпЧ. Таким образом, подобные частицы могут быть использованы в качестве альтернативных АГ при вакцинации [8, 10].

Цель настоящего исследования – разработать технологию производства ВпЧ на основе белков РВ А VP2, VP6, а также VP4 и VP7 – наиболее представленных на территории Российской Федерации генотипов; дать их молекулярно-генетическую и вирусологическую характеристику.

#### Материал и методы

**Вирус.** В работе использовали вирулентный штамм РВ А человека Wa G1P[8], адаптированный к культуре клеток MARC-145, который культивировали и очищали по ранее описанной авторами методике [14, 15].

**Генно-инженерные конструкции.** Синтетический ген, кодирующий кодон-оптимизированную последовательность гена VP6 актуального эпидемического изолята РВ А человека RVA/Human-wt/GR/Ath146/2010/G4P[8] (KC890881 в базе данных GenBank), изготовлен по нашему заказу (ЗАО «Евроген», Россия) и клонирован в трансферную плазмиду для бакуловирусной системы экспрессии pFastBacDual (под промотором полиэдрина) из набора Bac-to-Bac («Invitrogen», США). В ту же плазмиду под промотором p10 клонирован ген белка VP2, слитый с зелёным флуоресцентным белком (eGFP): на основе гена VP2 [16] создана конструкция, представляющая собой его делеционный вариант, в котором вместо удалённых первых 276 нуклеотидов на N-конце вставлена последовательность, кодирующая eGFP [17] и соединённая с VP2 нейтральным спейсером Ser-Arg-Gly-Ser (eGFP-Delta92-VP2). Ген eGFP-Delta92-VP2 был синтезирован по нашему заказу (ЗАО «Евроген»).

Кодирующие белки VP4 и VP7 гены также синтезированы по нашему заказу («Synbio Technologies», США) и клонированы в трансферные плазмиды pFastBacHTa для бакуловирусной системы экспрессии Bac-to-Bac («Invitrogen»). Использованы генотипы (P4, P8, G1, G2, G4, G9) актуальных для России эпидемических изолятов: RVA/Hu-wt/RUS/Novosibirsk/Nov10-N404/P[4]/2010/G2G4P[4]P[8] (KF648975.2

в базе данных GenBank); RVA/Hu-wt/RUS/Novosibirsk/Nov10-N344/2010/G2G4P[8] (JQ613159.2 в GenBank); Human rotavirus A isolate Nov10-N327 (HQ537514.2 в GenBank); Human rotavirus A isolate Hu/RUS/Nov10-N539/2010/G2P[4] (JX110838); RVA/Hu-wt/RUS/Novosibirsk/Nov11-N2735/2011/G4P[8]b (MK060169.1); Hu/RUS/Nov04-H672/2007/G9P[8] (FJ529386.2 в базе данных GenBank). Рекомбинантные бакуловирусы (VP2-GFP/VP6, VP4(P4), VP4(P8), VP7(G1), VP7(G2), VP7(G4), VP7(G9)) получены с помощью системы экспрессии Vac-to-Vac («Invitrogen») по методике производителя с использованием компетентных клеток DH10Vac<sup>o</sup>.

**Получение и очистка вируса и ВпЧ.** Трансфекцию перевиваемой линии клеток кукурузной лиственной совки (*Spodoptera frugiperda*) Sf-21 осуществляли очищенными препаратами бакмидной ДНК (бак-RVA) с применением катионного липосомного агента Cellfectin («Invitrogen»); для каждой конструкции использовали по 2 клон (посевная концентрация клеток  $5 \times 10^5$ /мл, 10 мкл бакмиды). После трансфекции проводили ещё 2 пассажа на клетках Sf-21, после чего выполняли коинфекцию перевиваемой клеточной культуры совки (*Trichoplusia ni*), культивируемой на протяжении 7 сут после заражения.

Культуральную жидкость, содержащую вирус или ВпЧ, подвергали низкоскоростному центрифугированию, освобождая от клеток и клеточного дебриса при 1000 об/мин на протяжении 5 мин и при 6000 об/мин 20 мин соответственно (4 °С, ротор Sorval<sup>®</sup> SS34, «Thermo Scientific»). Полученные осветлённые суспензии наслаивали на 6 мл 25 или 35% (w/v) сахарозы, приготовленной на буфере TNC (10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>; pH 7,4), затем центрифугировали в течение 2 ч при 28 000 об/мин (4 °С; центрифуга Optima XE-100, ротор SW 32Ti, «Beckman Coulter», США). Полученные осадки ресуспендировали в буфере TNC и хранили при той же температуре.

**Непрямой иммуноферментный анализ (ИФА).** Для оценки иммунохимической активности рекомбинантных белков в лунки иммунологического планшета («Greiner», Германия) вносили 0,1 мл клеточного лизата или очищенного препарата в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере, pH = 9,5. Планшет инкубировали 18 ч при 4 °С, после этого удаляли избыток АГ 5-кратной отмывкой ФСБТ (0,01 М фосфатный буфер, 170 mM NaCl, 0,1% твин-20; pH 7,4). Свободные участки пластика блокировали 1% желатином («Gerbu», Германия) в ФСБТ (1 ч при 37 °С), удаляли блокирующий раствор и вносили в лунки 0,1 мл моноклональных антител (МКАТ) к белку VP6 («Ingenasa», Испания) или полигистидиновому фрагменту («Sigma», США) в ФСБТ с добавлением 0,5% бычьего сывороточного альбумина. Далее повторно инкубировали планшет в течение 1 ч при 37 °С, промывали ФСБТ и добавляли в лунки по 0,1 мл раствора меченных пероксидазой АТ к иммуноглобулину IgG мыши («Sigma»). Через 1 ч инкубации при 37 °С планшет отмывали ФСБТ и вносили в лунки 100 мкл суб-

стратного раствора с тетраметилбензидином (ООО «Хема», Россия), после чего инкубировали 15 мин при комнатной температуре (20–25 °С) и останавливали реакцию добавлением 0,1 мл 1 М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Интенсивность окраски в лунках определяли на спектрофотометре с вертикальным лучом («Multiskan EX», Thermo, США) при длине волны 450 нм.

**Электрофорез.** Степень чистоты препаратов оценивали методом электрофореза (ЭФ) белков в полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат (лаурилсульфат) натрия (ПААГ-ДСН). Процедуру проводили в пластинах полиакриламидного геля размером 70 × 100 × 0,75 на приборе Mini-PROTEAN II («Bio-Rad», США) в восстанавливающих условиях при постоянном напряжении 200 В.

**Иммуноблоттинг.** После электрофоретического разделения белки из геля переносили на мембрану Immobilon-P («Millipore», США) на приборе Trans-Blot SD («Bio-Rad») при постоянной силе тока 200 мА в течение 1 ч при комнатной температуре (20–25 °С). После электропереноса не связавшиеся с белками участки мембраны блокировали 1% желатином («Gerbu») в ФСБТ 1 ч при 37 °С. Далее мембрану отмывали 4 раза ФСБТ и 4 раза – ФСБ (0,01 М фосфатный буфер, 170 mM NaCl; pH 7,4) и инкубировали с МКАТ к белку VP6 («Ingenasa»), АТ к eGFP или полигистидиновому фрагменту («Sigma») на протяжении 1 ч при 37 °С, после чего повторно промывали ФСБТ и инкубировали в таких же условиях. Затем добавляли меченные пероксидазой АТ к иммуноглобулину IgG мыши («Sigma»); мембрану повторно отмывали (по 4 раза последовательно ФСБТ и ФСБ) и окрашивали смесью 3,3'-диаминобензидина и 4-хлоронафтола с 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Окрашивание останавливали промыванием мембраны в воде.

**Определение концентрации белка.** Концентрацию белка в растворах определяли с использованием коммерческого набора Micro BCA Protein Assay Kit («Thermo», США).

**Электронная микроскопия (ЭМ).** 3 мкл препарата с концентрацией 12–30 мг/мл наносили на медную сетку, покрытую углеродной подложкой («Ted Pella») и обработанную в атмосфере тлеющего разряда, инкубировали 30 с при комнатной температуре (20–25 °С). Затем на сетку наносили 1 каплю (50 мкл) 2% раствора ацетата урана, после чего выдерживали 30 с; излишки раствора удаляли с сетки фильтровальной бумагой. Окрашенные сетки хранили в пластиковых контейнерах до использования. Исследование образцов производили в просвечивающем электронном микроскопе JEOL 2100 («JEOL», Япония), снабжённом катодом из гексаборида лантана (LaB<sub>6</sub>), при ускоряющем напряжении 200 кВ. Изображения получали с увеличением ×25 000 при помощи ПЗС-камеры Gatan X100 («Gatan», США) с размером матрицы 2000 × 2000 пикселей.

## Результаты

Ранее нами изучено генетическое разнообразие РВ А на территории г. Москвы [18] и на основании по-

лученных, а также литературных данных [19] определены наиболее представленные в Центральной части России генотипические варианты с учётом первичной последовательности генов, кодирующих белки VP4 и VP7. Более 90% образцов принадлежали к генотипам G9P[8], G4P[8], G2P[4], G1P[8]. Таким образом, для включения в состав ВпЧ выбраны белки внешнего слоя 6 генотипов (G1, G2, G4, G9, P4, P8), а также VP2 и VP6, необходимые для сборки этих частиц.

В целях создания белковой конструкции VP2/VP6 последовательность соответствующих генов оптимизирована для экспрессии в клетках насекомых, получена синтетическим путём, затем клонирована в соответствующие участки вектора rFastBacDual. Этот вектор, в свою очередь, предназначен для создания рекомбинантного бакуловируса, экспрессирующего одновременно 2 разных клонированных гена. Согласно литературным данным [17] добавление eGFP к VP2 не влияет на способность химерного белка участвовать в формировании ВпЧ; при этом контроль за наращиванием рекомбинантного белка в клеточной культуре значительно облегчается возможностью визуального наблюдения за процессом с помощью флуоресцентного микроскопа в режиме реального времени.

Нуклеотидные последовательности, кодирующие выбранные генотипы белков VP4 и VP7, также оптимизированы для наработки в клетках насекомых и получены синтетически, затем клонированы в трансферный вектор rFastBacHTa. Особенностью последнего является наличие последовательности полигистидинового фрагмента на участке, кодирующем N-конец белка, с целью возможности очистки продукта методом металлоаффинной хроматографии и детекции с применением специфических антигистидиновых МКАТ. Каждая последовательность клонирована в отдельный трансферный вектор, при помощи которых гены белков РВ А перенесены в бакуловирусный генотип. После трансфекции клеток Sf-21 бакмидами, содержащими гены белков VP6 и eGFP-Delta92-VP2, последующий пассаж вируса проводили на клеточной культуре *T. ni* и наблюдали за появлением флуоресценции, сравнивая заражённые бакуловирусом дикого типа и инфицированные eGFP-Delta92-VP2/VP6 клетки. Результаты представлены на рис. 1, а–в.

Кинетику накопления базовых ВпЧ eGFP-Delta92-VP2/VP6 оценивали по характеру флуоресценции на инвертированном микроскопе Olympus («Olympus», Япония) и методом непрямого ИФА с МКАТ к полигистидину. В результате установлено, что максимальное накопление АГ наблюдалось на 2-е сут после заражения. Однако в случаях коинфицирования рекомбинантным бакуловирусом со вставкой VP2/VP6 и 1 или 2 другими (VP4, VP7) происходило значительное снижение количества инфицированных клеток, что могло быть связано с межвирусной интерференцией. Снижение дозы рекомбинантных продуктов со вставкой VP4 и VP7 позволило решить эту проблему и добиться необходимого уровня экспрессии генов, кодирующих VP2/VP6 при коинфицировании, сопоставимого с таковым при моноинфекции (рис. 1, г–и).

В результате оптимизированы следующие варианты коинфекции:

1. VP2/VP6;
2. VP2/VP6 + VP4(P4);
3. VP2/VP6 + VP4(P8);
4. VP2/VP6 + VP7(G1);
5. VP2/VP6 + VP7(G2);
6. VP2/VP6 + VP7(G4);
7. VP2/VP6 + VP7(G9);
8. VP2/VP6 + VP4(P8) + VP7(G1).

После очистки центрифугированием полученных сочетаний рекомбинантных продуктов методом ЭМ показано, что во всех исследованных вариантах формируются ВпЧ: из 2 белков VP2/VP6 (рис. 2, а), из 3 – VP2/VP6 + разные генотипы VP4 или VP7 (рис. 2, б–ж) и из всех 4 белков (рис. 2, з). Все частицы по морфологии и размеру соответствовали вириону РВ А (рис. 2, и). Получены как 2-слойные (рис. 2, а), так и 3-слойные ВпЧ (рис. 2, б–з).

Белковый состав полученных частиц подтверждали методами ИФА и ЭФ в ПААГ-ДСН с последующим иммуноблоттингом. Блот окрашивали АТ к полигистидиновой метке (детекция VP4, VP6, VP7) и к eGFP (детекция VP2) (рис. 3). Молекулярные массы белков соответствовали приведённым в литературе данным [20]. Генотип белков VP4 и VP7 не оказывал существенного влияния на соотношение разных белковых составляющих в соответствующих вирусоподобных структурах.

Содержание ВпЧ в полученных после очистки субстанциях оценивалось по общей концентрации белка. Поскольку по результатам ЭМ более 90% частиц были собраны правильно и не разрушены, общую концентрацию белка можно принять за концентрацию белка в данных структурах. Количества синтезированных ВпЧ, полученных из 1 л культуральной жидкости (при расчёте на 1 мг белка), представлены в таблице (из 1 л культуральной жидкости получено от 24 до 64 мг частиц).

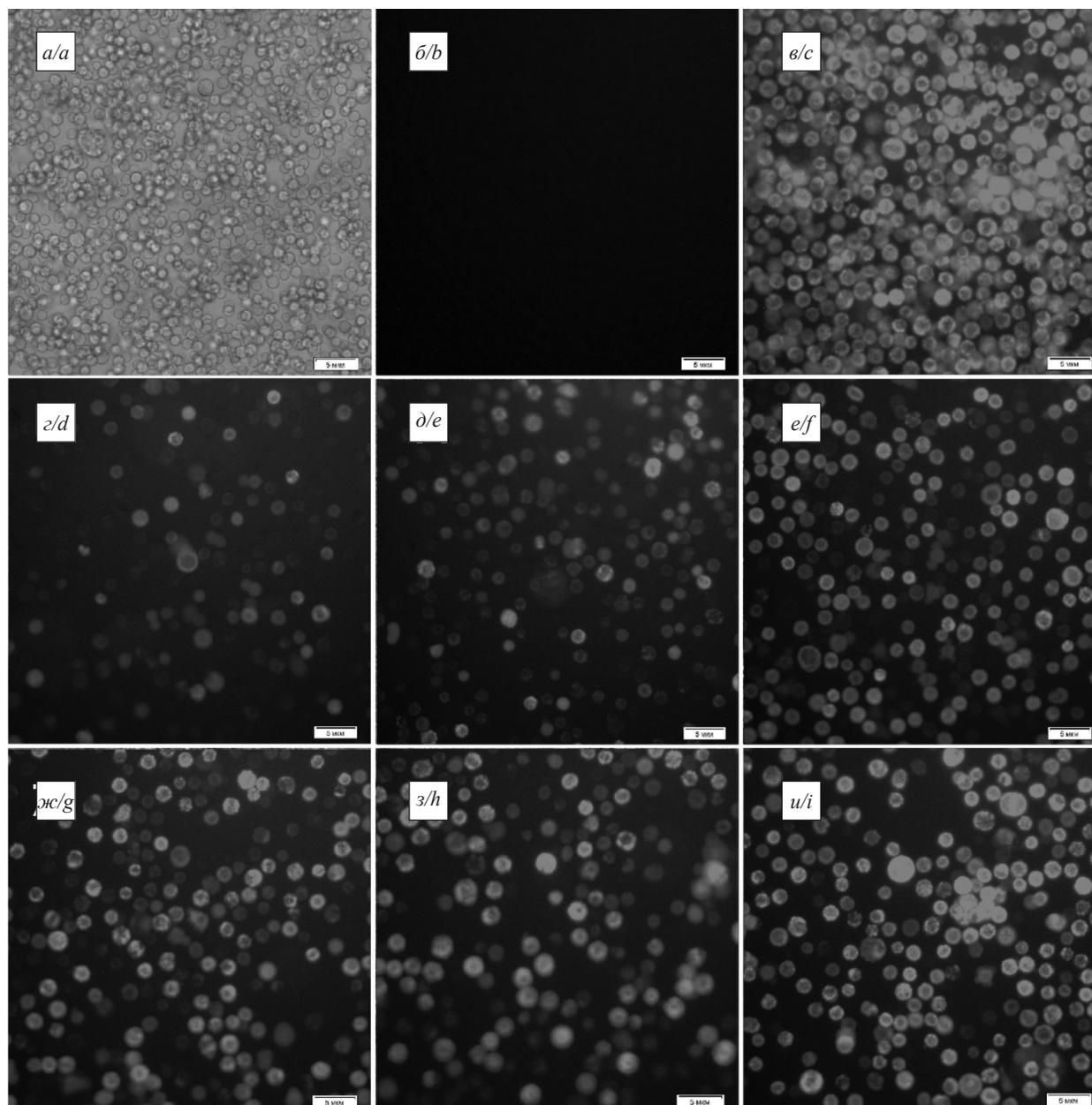
### Обсуждение

Проблема разработки новых вакцинных препаратов против РВИ остаётся актуальной, несмотря на наличие на рынке давно используемых вакцин

#### Количество полученных ВпЧ

#### Amount of obtained VLP

Состав ВпЧ Composition of VLP	Количество ВпЧ, полученное из 1 л культуральной жидкости, мг белка Amount of VLP obtained from 1 liter of culture media, mg of total protein
VP2/6	53,0
VP2/6 + VP7(G1)	24,9
VP2/6 + VP7(G2)	24,1
VP2/6 + VP7(G4)	32,3
VP2/6 + VP7(G9)	64,4
VP2/6 + VP4(P4)	37,2
VP2/6 + VP4(P8)	58,7
VP2/6 + VP7(G1) + VP4(P8)	58,0



**Рис. 1.** Заражение бакуловирусом eGFP-Delta92-VP2 суспензионной культуры клеток совки (*T. ni*).

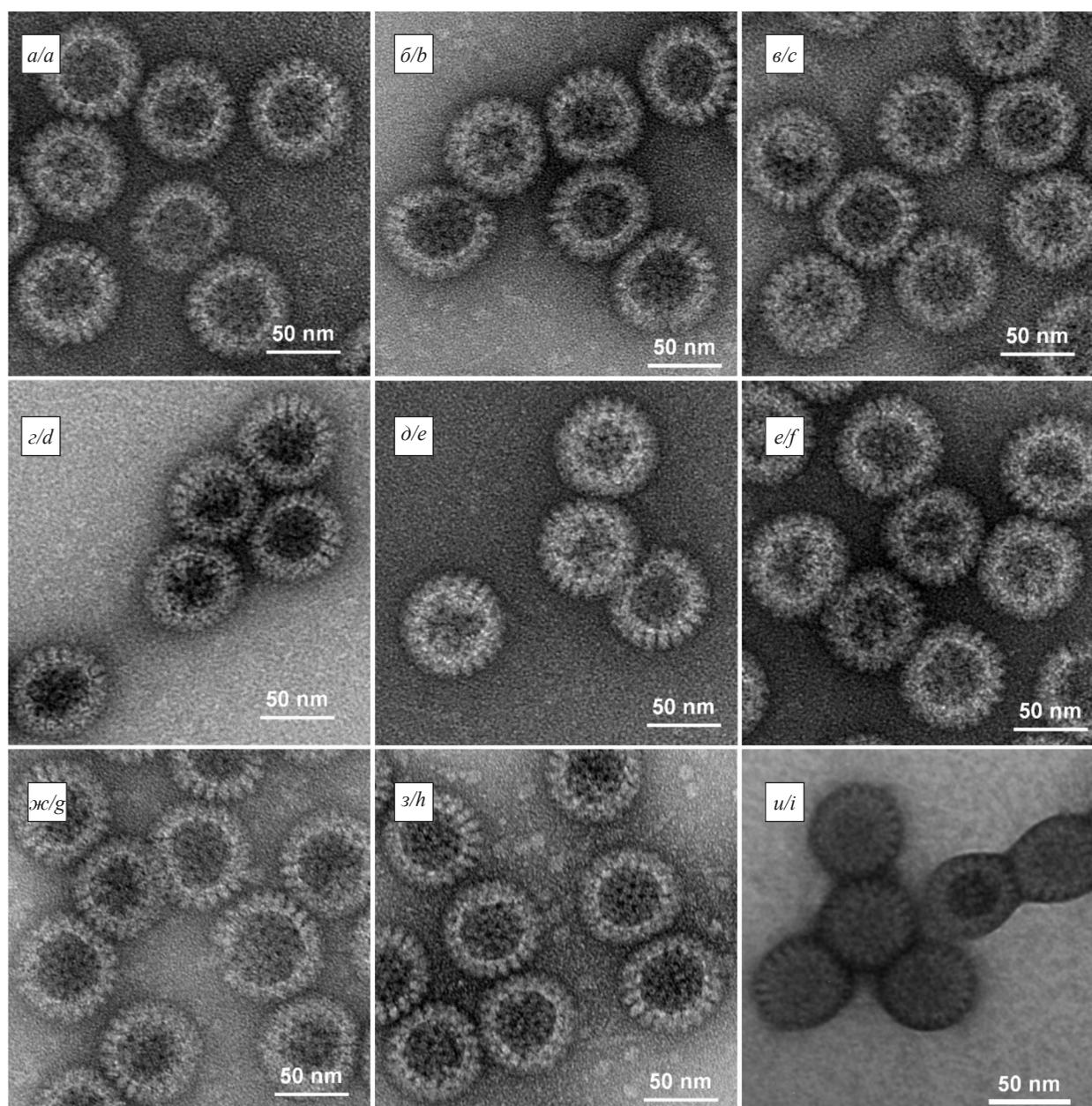
*a* – культура клеток *T. ni* в проходящем свете; *b* – культура клеток *T. ni*, заражённых бакуловирусом дикого типа, в флуоресцентном поле; *c* – культура клеток *T. ni*, инфицированных бакуловирусом eGFP-Delta92-VP2/VP6, в флуоресцентном поле. Результаты коинфекции культуры клеток насекомых *T. ni* рекомбинантными бакуловирусами с различными вставками в одинаковых (*d–e*) и оптимизированных дозах (*ж–и*): *d, ж* – VP2/VP6+VP7(G1)+VP4(P8); *д, з* – VP2/VP6+VP7; *e, u* – VP2/VP6+VP4. Микрофотографии, увеличение  $\times 100$ . Длина линии 5 мкм.

**Fig. 1.** Transfection of Cabbage looper (*T. ni*) cell suspension culture with eGFP-Delta92-VP2 baculovirus.

*a* – *T. ni* cells, transmitted light microscopy; *b* – *T. ni* cells transfected with wild-type baculovirus, fluorescence microscopy; *c* – *T. ni* cells transfected with eGFP-Delta92-VP2 baculovirus, fluorescence microscopy. Results of *T. ni* cell culture coinfection with different recombinant baculoviruses with the same (*d–f*) and with optimized doses (*g–i*): *d, g* – VP2/VP6+VP7(G1)+VP4(P8); *e, h* – VP2/VP6+VP7; *f, i* – VP2/VP6+VP4. Microphotographs, magnification  $\times 100$ . The line length is 5  $\mu\text{m}$ .

RotaTeq® и Rotarix®, преквалифицированных ВОЗ 2 вакцин производства Индии, а также ещё 2 препаратов, зарегистрированных на национальном уровне. Все они являются живыми, и по сравнению с ними потенциальная ВпЧ-вакцина обладает рядом преимуществ. РВ А относится к быстро эволюционирующим вирусам, и исполь-

зование подобных вакцинных препаратов позволит более гибко и точно адаптироваться к текущей эпидемиологической ситуации, зависящей от региона и сезона. Кроме того, исключается возможность реассортации с вирулентными полевыми штаммами [10]. В настоящей работе получены вирусоподобные структуры, содержащие белки внешнего слоя вири-



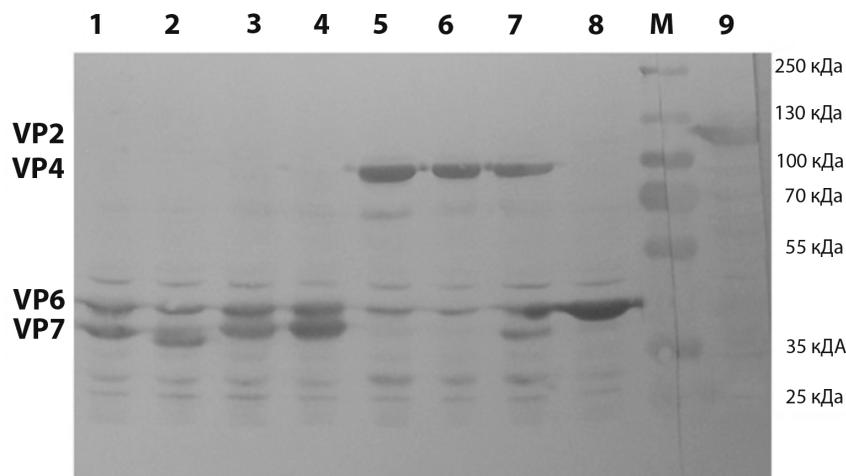
**Рис. 2.** Вирусоподобные (*a–h*) и вирусные (*i*) частицы ротавируса А (указаны бакуловирусы, которыми были коинфицированы клетки *T. ni*. *a* – VP2/VP6; *b* – VP2/VP6+VP4(P8); *c* – VP2/VP6+VP4(P8); *d* – VP2/VP6+VP7(G1); *e* – VP2/VP6+VP7(G2); *f* – VP2/VP6+VP7(G4); *g* – VP2/VP6+VP7(G9); *h* – VP2/VP6+VP4(P8)+VP7(G1); *i* – ротавирус А. Электронные микрофотографии, увеличение  $\times 25\,000$ .

**Fig 2.** Rotavirus A virus-like (*a–h*) and viral (*i*) particles produced in insect cells, coinfecting with 1, 2 or 3 baculoviruses (electron microscopy). *a* – VP2/VP6; *b* – VP2/VP6+VP4(P8); *c* – VP2/VP6+VP4(P8); *d* – VP2/VP6+VP7(G1); *e* – VP2/VP6+VP7(G2); *f* – VP2/VP6+VP7(G4); *g* – VP2/VP6+VP7(G9); *h* – VP2/VP6+VP4(P8)+VP7(G1); *i* – rotavirus A. Electronic microphotographs, magnification  $\times 25\,000$ .

она наиболее представленная на территории России генотипов: G1, G2, G4, G9, P4, P8.

Производство нереплицирующихся ВпЧ – достаточно известная и разработанная технология. На рынке представлены несколько зарегистрированных вакцин на их основе, ещё несколько препаратов находятся на разных стадиях клинических испытаний [21]. Впервые ВпЧ РВ А получены в конце 1980-х гг. [22]. Для этого использовались различные системы экспрессии: бакуловирусы в клетках и личинках

насекомых; экспрессия в клетках млекопитающих, растений, дрожжей и бактерий [10]. Показано, что для сборки 1-слойных частиц достаточно только белка VP2 [23]. Совместная экспрессия (коэкспрессия) VP2 и VP6 приводит к сборке 2-слойных частиц, полученных и в настоящем исследовании. Белок VP6 обладает высокой иммуногенностью, благодаря чему 2-слойные структуры могут быть использованы для производства вакцин. Тем не менее для лучшей иммуногенности против конкретных вирусных



**Рис. 3.** Контроль наработки рекомбинантных белков при получении ВпЧ методом коинфекции в иммуноблоттинге с антигистидиновыми антителами (1–8) или антителами к eGFP (9).

1–4 – коинфекция культуры клеток *T. ni* бакуловирусами VP2/VP6 и VP7 генотипов G1, G2, G4, G9 соответственно; 5–6 – коинфекция клеток *T. ni* бакуловирусами VP2/VP6 и VP4 генотипов P1, P8 соответственно; 7 – коинфекция клеточной культуры *T. ni* бакуловирусами VP2/VP6, а также VP7(G1) и VP4(P8); 8 – коинфекция культуры клеток *T. ni* бакуловирусом VP2/VP6; M – маркер молекулярной массы Thermo Scientific #26620; 9 – заражение той же культуры бакуловирусом VP2/VP6.

**Figure 3.** Control of the production of recombinant proteins during VLP synthesis by western blot analysis with anti-histidine antibodies (1–8) and anti-eGFP antibodies (9).

1–4 – coinfection of *T. ni* cell culture with VP2/VP6 and VP7 baculoviruses (genotypes G1, G2, G4, G9 respectively); 5–6 – coinfection of *T. ni* cells with VP2/VP6 and VP4 baculoviruses (genotypes P1, P8 respectively); 7 – coinfection of *T. ni* cell culture with VP2/VP6, VP7(G1) and VP4(P8) baculoviruses; 8 – coinfection of *T. ni* cells with VP2/VP6 baculoviruses; M – Thermo Scientific #26620 molecular weight markers; 9 – transfection of the same cell culture with VP2/VP6 baculovirus.

штаммов ВпЧ должны включать переменные белки внешнего слоя VP4 и VP7. 3-слойные частицы могут быть получены как из 3 (VP2/6 + VP4, VP2/6 + VP7), так и из всех 4 белков [8, 10].

В настоящей работе применялась бакуловирусная система экспрессии в клетках насекомых как наиболее изученная и эффективная для производства ротавирусных ВпЧ. Экспрессия в клетках *T. ni* показала хорошие результаты, сравнимые с таковыми в чаще используемых клеточных культурах Sf9 и H5 [10]. Для сборки «базовых» 2-слойных частиц клетки трансфицировали рекомбинантным бакуловирусом, содержащим оба гена, причём белок VP6, необходимый для сборки в большем количестве [24], клонирован под более сильным полиэдриновым промотором, а белок VP2 – под промотором p10. Белки внешнего слоя клонированы каждый в отдельную бакмиду; помещение VP4 и VP7 в одну конструкцию, подобно тому как было выполнено в некоторых работах [20], не использовали. 3-слойные ВпЧ получены как из 3 белков (коинфекция 2 бакуловирусами), так и из 4 (заражение 3 бакуловирусами). В обеих схемах они обладали правильной морфологией и содержали все необходимые белки. Был выбран вариант с использованием ВпЧ из 3 белков, поскольку в этом случае проще оптимизировать стадию коинфекции и контролировать правильность сборки частиц. При такой технологии вирусоподобные структуры, содержащие белки внешнего слоя 6 различных генотипов, производятся независимо, и очищенные субстанции затем объединяются в финальную композицию в равном со-

отношении. Смесь 6 различных ВпЧ может быть использована для определения иммуногенности в опыте *in vivo*, а при положительном его результате – для производства вакцины.

Рассмотренный метод очистки ВпЧ (центрифугирование в растворе сахарозы) часто используется для этой цели; чистоты препарата, полученного этим способом, достаточно для проверки иммуногенности на животных моделях. При необходимости более тщательной очистки данных структур от белков клеток насекомых и других неродственных примесей возможно применение хроматографических методик, разработанных для очистки ВпЧ, в том числе ротавирусных [25]. Основные методы контроля полученных частиц – электронная микроскопия, ИФА, электрофорез в ПААГ-ДСН и иммуноблоттинг – также использованы в большинстве работ [10, 26].

Иммуногенные свойства ротавирусных ВпЧ показаны ранее в ряде исследований при разных способах их введения (внутримышечный, ректальный, назальный, внутрибрюшинный, оральный) как с адьювантами, так и без них. Несмотря на то что ни одна потенциальная ВпЧ-вакцина против РВИ не была тестирована на людях, иммуногенность, эффективность и безопасность этих препаратов продемонстрированы на животных моделях с использованием мышей, кроликов и поросят-гнотобионтов [9, 27–29].

### Заключение

В результате выполненной работы получены 7 рекомбинантных бакуловирусов, содержащих оптими-

зированные для экспрессии в клетках насекомых последовательности генов РВ А VP2, VP6 а также 6 генотипов VP4 и VP7 (G1, G2, G4, G9, P4, P8), наиболее представленных на территории России. Разработана и оптимизирована технология получения 3-слойных ВпЧ, состоящих из 3 белков, в клетках *T. ni* с последующей очисткой путём центрифугирования в растворе сахарозы. Полученные частицы по размеру и морфологии соответствуют вириону РВ А, по результатам ИФА и иммуноблоттинга содержат все экспрессированные белковые структуры. Комбинация из 6 субстанций ВпЧ, содержащая вариабельные белки внешнего слоя 6 различных генотипов данного вируса, может быть использована для изучения иммуногенности *in vivo*.

### ЛИТЕРАТУРА

- Crawford S.E., Ramani S., Tate J.E., Parashar U.D., Svensson L., Hagbom M., et al. Rotavirus infection HHS Public Access. *JAMA Pediatrics*. 2018; 172(Suppl. 3): 50–3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>. Rotavirus.
- Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году». Москва; 2019. Available at: <https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/798/gosudarstvennyy-doklad-o-sostoyanii-sanitarno-epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-rossiyskoy-federatsii-v-2018-godu.pdf> (accessed January 28, 2021).
- Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году». Москва; 2020. Available at: [https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/8e4/gosdoklad-za-2019\\_seb\\_29\\_05.pdf](https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/8e4/gosdoklad-za-2019_seb_29_05.pdf) (accessed January 28, 2021).
- Burke R.M., Tate J.E., Kirkwood C.D., Steele A.D., Parashar U.D. Current and new rotavirus vaccines. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2019; 32(5): 435–44. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000572>.
- Wang Y., Li J., Liu P., Zhu F. The performance of licensed rotavirus vaccines and the development of a new generation of rotavirus vaccines: a review. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2020; 1–17. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1801071>.
- Yen C., Healy K., Tate J.E., Parashar U.D., Bines J., Neuzil K., et al. Rotavirus vaccination and intussusception – Science, surveillance, and safety: A review of evidence and recommendations for future research priorities in low- and middle-income countries. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2016; 12(10): 2580–9. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1197452>.
- Perez N. Rotavirus gastroenteritis: why to back up the development of new vaccines? *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 31(2-3): 253–69. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.07.005>.
- Crawford S.E., Labbe M., Cohen J., Burroughs M.H., Zhou Y.J., Estes M.K. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J. Virol.* 1994; 68(9): 5945–52. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.9.5945-5952.1994>.
- Azevedo M.P., Vlasova A.N., Saif L.J. Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *Expert Rev. Vaccines*. 2013; 12(2): 169–81. <https://doi.org/10.1586/erv.13.3>.
- Changotra H., Vij A. Rotavirus virus-like particles (RV-VLPs) vaccines: An update. *Rev. Med. Virol.* 2017; 27(6). <https://doi.org/10.1002/rmv.1954>.
- Doro R., Laszlo B., Martella V., Leshem E., Gentsch J., Parashar U., et al. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: Is there evidence of strain selection from vaccine pressure? *Infect. Genet. Evol.* 2014; 28: 446–61. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.08.017>.
- Matthijnsens J., Ciarlet M., Rahman M., Attoui H., Estes M.K., Gentsch J.R., et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 2008; 153(8): 1621–9. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>.
- Matthijnsens J., Bilcke J., Ciarlet M., Martella V., Banyai K., Rahman M., et al. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol.* 2009; 4(10): 1303–16. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.96>.
- Хаметова К.М., Алексеев К.П., Южаков А.Г., Костина Л.В., Раев С.А., Мусиенко М.И., и др. Молекулярно-биологические свойства клонированного штамма Wa ротавируса А человека. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(1): 16–22. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-16-22>.
- Латышев О.Е., Елисеева О.В., Костина Л.В., Алексеев К.П., Хаметова К.М., Алтаева Е.Г., и др. Оценка иммуногенной активности клонированного штамма WA ротавируса А человека. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(4): 156–64. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-156-164>.
- Kumar A., Charpilienne A., Cohen J. Nucleotide sequence of the gene encoding for the RNA binding protein (VP2) of RF bovine rotavirus. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17(5): 2126. <https://doi.org/10.1093/nar/17.5.2126>.
- Charpilienne A., Nejmeddine M., Berois M., Perez N., Neumann E., Hewat E., et al. Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(31): 29361–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101935200>.
- Ivashechkin A.A., Yuzhakov A.G., Grebennikova T.V., Yuzhakova K.A., Kulikova N.Y., Kisteneva L.B., et al. Genetic diversity of group A rotaviruses in Moscow in 2018–2019. *Arch. Virol.* 2020; 165(3): 691–702. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04534-5>.
- Kiseleva V., Faizuloev E., Meskina E., Marova A., Oksanich A., Samartseva T., et al. Molecular-genetic characterization of human rotavirus A strains circulating in Moscow, Russia (2009–2014). *Virol. Sin.* 2018; 33(4): 304–13. <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0043-0>.
- Jere K.C., O'Neill H.G., Potgieter A.C., Van Dijk A.A. Chimaeric virus-like particles derived from consensus genome sequences of human rotavirus strains co-circulating in Africa. *PLoS One.* 2014; 9(9): e105167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105167>.
- Donaldson B., Lateef Z., Walker G.F., Young S.L., Ward V.K. Virus-like particle vaccines: immunology and formulation for clinical translation. *Expert Rev. Vaccines*. 2018; 17(9): 833–49. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1516552>.
- Estes M.K., Crawford S.E., Penaranda M.E., Petrie B.L., Burns J.W., Chan W.K., et al. Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system. *J. Virol.* 1987; 61(5): 1488–94. <https://doi.org/10.1128/jvi.61.5.1488-1494.1987>.
- Labbe M., Charpilienne A., Crawford S.E., Estes M.K., Cohen J. Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. *J. Virol.* 1991; 65(6): 2946–52. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.6.2946-2952.1991>.
- Vieira H.L.A., Estevo C., Roldao A., Peixoto C.C., Sousa M.F.Q., Cruz P.E., et al. Triple layered rotavirus VLP production: Kinetics of vector replication, mRNA stability and recombinant protein production. *J. Biotechnol.* 2005; 120(1): 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.03.026>.
- Vicente T., Sousa M.F.Q., Peixoto C., Alves P.M., Mota J.P., Carondo M.J.T. Anion-exchange membrane chromatography for purification of rotavirus-like particles. *J. Memb. Sci.* 2008; 311(1–2): 270–83. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.12.021>.
- Kim Y., Chang K., Kim W., Saif L.J. Production of hybrid double- or triple-layered virus-like particles of group A and C rotaviruses using a baculovirus expression system. *Virology.* 2002; 302(1): 1–8. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1610>.
- O'Neal C.M., Crawford S.E., Estes M.K., Conner M.E. Rotavirus virus-like particles administered mucosally induce protective immunity. *J. Virol.* 1997; 71(11): 8707–17. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.11.8707-8717.1997>.
- Ciarlet M., Crawford S.E., Barone C., Bertolotti-Ciarlet A., Ramig R.F., Estes M.K., et al. Subunit rotavirus vaccine administered parenterally to rabbits induces active protective immunity. *J. Virol.* 1998; 72(11): 9233–46. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.11.9233-9246.1998>.
- Gonzalez A.M., Azevedo M.S.P., Jung K., Vlasova A., Zhang W., Saif L.J. Innate immune responses to human rotavirus in the neonatal gnotobiotic piglet disease model. *Immunology.* 2010; 131(2): 242–56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03298.x>.

### REFERENCES

- Crawford S.E., Ramani S., Tate J.E., Parashar U.D., Svensson L., Hagbom M., et al. Rotavirus infection HHS Public Access. *JAMA Pediatrics*. 2018; 172(Suppl. 3): 50–3. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.83>. Rotavirus.

2. State report «On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2018». Moscow; 2019 (in Russian). Available at: <https://www.rosпотреbnadzor.ru/upload/iblock/798/gosudarstvennyy-doklad-o-sostoyanii-sanitar-no-epidemiologicheskogo-blagopoluchiya-naseleniya-v-rossiyskoy-federatsii-v-2018-godu.pdf> (accessed January 28, 2021).
3. State report «On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2019». Moscow; 2020 (in Russian). Available at: [https://www.rosпотреbnadzor.ru/upload/iblock/8e4/gosdoklad-za-2019\\_seb\\_29\\_05.pdf](https://www.rosпотреbnadzor.ru/upload/iblock/8e4/gosdoklad-za-2019_seb_29_05.pdf) (accessed January 28, 2021).
4. Burke R.M., Tate J.E., Kirkwood C.D., Steele A.D., Parashar U.D. Current and new rotavirus vaccines. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2019; 32(5): 435–44. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000572>.
5. Wang Y., Li J., Liu P., Zhu F. The performance of licensed rotavirus vaccines and the development of a new generation of rotavirus vaccines: a review. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2020; 1–17. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1801071>.
6. Yen C., Healy K., Tate J.E., Parashar U.D., Bines J., Neuzil K., et al. Rotavirus vaccination and intussusception – Science, surveillance, and safety: A review of evidence and recommendations for future research priorities in low- and middle-income countries. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2016; 12(10): 2580–9. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1197452>.
7. Parez N. Rotavirus gastroenteritis: why to back up the development of new vaccines? *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 31(2-3): 253–69. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2007.07.005>.
8. Crawford S.E., Labbe M., Cohen J., Burroughs M.H., Zhou Y.J., Estes M.K. Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J. Virol.* 1994; 68(9): 5945–52. <https://doi.org/10.1128/jvi.68.9.5945-5952.1994>.
9. Azevedo M.P., Vlasova A.N., Saif L.J. Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *Expert Rev. Vaccines.* 2013; 12(2): 169–81. <https://doi.org/10.1586/erv.13.3>.
10. Changotra H., Vij A. Rotavirus virus-like particles (RV-VLPs) vaccines: An update. *Rev. Med. Virol.* 2017; 27(6). <https://doi.org/10.1002/rmv.1954>.
11. Doro R., Laszlo B., Martella V., Leshem E., Gentsch J., Parashar U., et al. Review of global rotavirus strain prevalence data from six years post vaccine licensure surveillance: Is there evidence of strain selection from vaccine pressure? *Infect. Genet. Evol.* 2014; 28: 446–61. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.08.017>.
12. Matthijnssens J., Ciarlet M., Rahman M., Attoui H., Estes M.K., Gentsch J.R., et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 2008; 153(8): 1621–9. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>.
13. Matthijnssens J., Bilcke J., Ciarlet M., Martella V., Banyai K., Rahman M., et al. Rotavirus disease and vaccination: impact on genotype diversity. *Future Microbiol.* 2009; 4(10): 1303–16. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.96>.
14. Khametova K.M., Alekseev K.P., Yuzhakov A.G., Kostina L.V., Raev S.A., Musienko M.I., et al. Evaluation of the molecular-biological properties of human rotavirus A strain Wa [Molekulyarno-biologicheskiye svoystva klonirovannogo shtamma Wa rotavirusa A cheloveka]. *Voprosy virusologii.* 2019; 64(1): 16–22. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-16-22> (in Russian).
15. Latyshev O.E., Eliseeva O.V., Kostina L.V., Alekseev K.P., Khametova K.M., Altaeva E.G., et al. Assessment of immunogenic activity of the cloned human rotavirus A Wa strain [Otsenka immunogennoy aktivnosti klonirovannogo shtamma WA rotavirusa A cheloveka]. *Voprosy virusologii.* 2019; 64(4): 156–64. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-156-164> (in Russian).
16. Kumar A., Charpilienne A., Cohen J. Nucleotide sequence of the gene encoding for the RNA binding protein (VP2) of RF bovine rotavirus. *Nucleic Acids Res.* 1989; 17(5): 2126. <https://doi.org/10.1093/nar/17.5.2126>.
17. Charpilienne A., Nejmeddine M., Berois M., Parez N., Neumann E., Hewat E., et al. Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(31): 29361–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101935200>.
18. Ivashchkin A.A., Yuzhakov A.G., Grebennikova T.V., Yuzhakova K.A., Kulikova N.Y., Kisteneva L.B., et al. Genetic diversity of group A rotaviruses in Moscow in 2018–2019. *Arch. Virol.* 2020; 165(3): 691–702. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04534-5>.
19. Kiseleva V., Faizuloev E., Meskina E., Marova A., Oksanich A., Samartseva T., et al. Molecular-genetic characterization of human rotavirus A strains circulating in Moscow, Russia (2009–2014). *Virolog. Sin.* 2018; 33(4): 304–13. <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0043-0>.
20. Jere K.C., O'Neill H.G., Potgieter A.C., Van Dijk A.A. Chimaeric virus-like particles derived from consensus genome sequences of human rotavirus strains co-circulating in Africa. *PLoS One.* 2014; 9(9): e105167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105167>.
21. Donaldson B., Lateef Z., Walker G.F., Young S.L., Ward V.K. Virus-like particle vaccines: immunology and formulation for clinical translation. *Expert Rev. Vaccines.* 2018; 17(9): 833–49. <https://doi.org/10.1080/14760584.2018.1516552>.
22. Estes M.K., Crawford S.E., Penaranda M.E., Petrie B.L., Burns J.W., Chan W.K., et al. Synthesis and immunogenicity of the rotavirus major capsid antigen using a baculovirus expression system. *J. Virol.* 1987; 61(5): 1488–94. <https://doi.org/10.1128/jvi.61.5.1488-1494.1987>.
23. Labbe M., Charpilienne A., Crawford S.E., Estes M.K., Cohen J. Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. *J. Virol.* 1991; 65(6): 2946–52. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.6.2946-2952.1991>.
24. Vieira H.L.A., Esteveo C., Roldao A., Peixoto C.C., Sousa M.F.Q., Cruz P.E., et al. Triple layered rotavirus VLP production: Kinetics of vector replication, mRNA stability and recombinant protein production. *J. Biotechnol.* 2005; 120(1): 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.03.026>.
25. Vicente T., Sousa M.F.Q., Peixoto C., Alves P.M., Mota J.P., Carondo M.J.T. Anion-exchange membrane chromatography for purification of rotavirus-like particles. *J. Memb. Sci.* 2008; 311(1–2): 270–83. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.12.021>.
26. Kim Y., Chang K., Kim W., Saif L.J. Production of hybrid double- or triple-layered virus-like particles of group A and C rotaviruses using a baculovirus expression system. *Virology.* 2002; 302(1): 1–8. <https://doi.org/10.1006/viro.2002.1610>.
27. O'Neal C.M., Crawford S.E., Estes M.K., Conner M.E. Rotavirus virus-like particles administered mucosally induce protective immunity. *J. Virol.* 1997; 71(11): 8707–17. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.11.8707-8717.1997>.
28. Ciarlet M., Crawford S.E., Barone C., Bertolotti-Ciarlet A., Ramig R.F., Estes M.K., et al. Subunit rotavirus vaccine administered parenterally to rabbits induces active protective immunity. *J. Virol.* 1998; 72(11): 9233–46. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.11.9233-9246.1998>.
29. Gonzalez A.M., Azevedo M.S.P., Jung K., Vlasova A., Zhang W., Saif L.J. Innate immune responses to human rotavirus in the neonatal gnotobiotic piglet disease model. *Immunology.* 2010; 131(2): 242–56. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03298.x>.



## Разработка метода количественного определения вирусной РНК для контроля специфической активности вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом

Егорова М.С.<sup>1</sup>, Курашова С.С.<sup>1</sup>, Ишмухаметов А.А.<sup>1,2</sup>, Баловнева М.В.<sup>1</sup>, Девяткин А.А.<sup>3</sup>, Сафонова М.В.<sup>4</sup>, Ожерелков С.В.<sup>1</sup>, Хапчаев Ю.Х.<sup>1</sup>, Балкина А.С.<sup>1</sup>, Белякова А.В.<sup>1</sup>, Дзагурова Т.К.<sup>1</sup>, Ткаченко Е.А.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Институт трансляционной медицины и биотехнологии, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Москва, Россия;

<sup>3</sup>Институт молекулярной медицины, ФГАОУ ВО Первый Московский государственный университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119991, Москва, Россия;

<sup>4</sup>ФКУЗ «Противочумный центр» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 119121, Москва, Россия

**Введение.** Геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) занимает ведущее место среди природно-очаговых болезней человека в Российской Федерации. Этиотропная терапия заболевания в настоящее время отсутствует. Наиболее действенным методом контроля этой инфекции может стать вакцинопрофилактика. Основными критериями оценки инактивированной вакцины являются её иммуногенность и специфическая активность.

**Цель** исследования – разработка чувствительной и специфичной методики проведения ПЦР в реальном времени с целью количественного определения вирусной РНК в инактивированной вакцине, а также установление корреляции между содержанием генетического материала вируса и выраженностью иммуногенности.

**Материал и методы.** В качестве диагностической мишени для олигонуклеотидов и флуоресцентных зондов выбраны фрагменты L-сегмента вакцинных штаммов вирусов ГЛПС Пуумала, Хантаан, Сочи. Иммуногенность экспериментальных вакцин контролировали по индукции нейтрализующих антител (нАТ) в ответ на иммунизацию мышей линии BALB/c.

**Результаты.** Разработана высокоспецифичная, чувствительная методика проведения ПЦР в реальном времени, имеющая высокий показатель воспроизводимости. Аналитическая чувствительность составила для вирусов Пуумала  $1,24 \pm 1,5 \times 10^2$  копий/мл, Хантаан –  $1,16 \pm 1,4 \times 10^2$  копий/мл, Сочи –  $1,32 \pm 1,8 \times 10^2$  копий/мл при содержании вируса  $1,5 \pm 0,5$ ,  $1,8 \pm 0,5$  и  $2,2 \pm 0,5$  Ig ФОЕ/мл соответственно. Показано, что количество вирусной РНК в составе экспериментальных вакцинных препаратов, инактивированных β-пропиолактоном (β-ПЛ), пропорционально титру нАТ в ответ на иммунизацию.

**Обсуждение.** Установлено, что способ инаktivирования вируса влияет на выявляемое количество копий РНК, не оказывая при этом воздействия на иммуногенность, что указывает на равнозначное повреждение белков-иммуногенов при разной степени повреждения вирусной РНК. Прямая зависимость между содержанием копий нуклеиновой кислоты вируса и иммуногенностью позволяет использовать этот критерий для дозирования вакцинного препарата.

**Заключение.** Разработанная система оценки количественного содержания вирусной РНК делает перспективным её применение для контроля специфической активности вакцины против ГЛПС.

**Ключевые слова:** геморрагическая лихорадка с почечным синдромом; инактивированная вакцина; полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ); формалин; β-пропиолактон (β-ПЛ); ультрафиолет

**Для цитирования:** Егорова М.С., Курашова С.С., Ишмухаметов А.А., Баловнева М.В., Девяткин А.А., Сафонова М.В., Ожерелков С.В., Хапчаев Ю.Х., Балкина А.С., Белякова А.В., Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А. Разработка метода количественного определения вирусной РНК для контроля специфической активности вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66 (1): 65-73. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-30>

**Для корреспонденции:** Егорова Мария Сергеевна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории геморрагических лихорадок, ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», 108819, Москва, Россия. E-mail: [centrglps@yandex.ru](mailto:centrglps@yandex.ru)

**Участие авторов:** Егорова М.С. – разработка концепции и дизайна исследования, анализ данных, эксперименты с животными, статистический анализ, написание текста; Курашова С.С. – разработка концепции и дизайна исследования, анализ данных, эксперименты с животными, статистический анализ, написание текста; Ишмухаметов А.А. – разработка концепции и утверждение окончательного варианта статьи; Баловнева М.В. – получение очищенного вирусного материала, анализ иммунного статуса; Девяткин А.А. – полногеномное секвенирование штаммов, подбор праймеров и зондов; Сафонова М.В. – подбор праймеров и зондов; Ожерелков С.В. – получение очищенного вирусного материала, анализ иммунного статуса; Хапчаев Ю.Х. – получение очищенного вирусного материала, анализ

иммунного статуса; Балкина А.С. – техническая поддержка и редактирование текста; Белякова А.В. – техническая поддержка и редактирование текста; Дзагурова Т.К. – разработка концепции и дизайна исследования, анализ данных, написание текста; Ткаченко Е.А. – разработка концепции и утверждение окончательного варианта статьи.

**Финансирование.** Исследование выполнено по теме Госзадания № 0837-2019-0006.

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

Поступила 12.11.2020

Принята в печать 18.02.2021

## Real-time PCR assay development for the control of vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome

Maria S. Egorova<sup>1</sup>, Svetlana S. Kurashova<sup>1</sup>, Aydar A. Ishmukhametov<sup>1,2</sup>, Maria V. Balovneva<sup>1</sup>, Andrei A. Deviatkin<sup>3</sup>, Maria V. Safonova<sup>4</sup>, Sergei V. Ozherelkov<sup>1</sup> Yusuf Kh. Khapchaev<sup>1</sup>, Alexandra S. Balkina<sup>1</sup>, Alla V. Belyakova<sup>1</sup>, Tamara K. Dzagurova<sup>1</sup>, Evgeniy A. Tkachenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FSBSI «M.I. Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences», 108819, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Institute for Translational Medicine and Biotechnology, FSAEI HE I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of the Health of Russia, 119991, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Institute of Molecular Medicine, FSAEI HE I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of the Health of Russia, 119991, Moscow, Russia;

<sup>4</sup>FSHI «Plague Control Center» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), 119121, Moscow, Russia

**Introduction.** Hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) holds a leading place among natural focal human diseases in Russian Federation. There is no etiotropic therapy for the disease now. The vaccine prophylaxis is the most effective method to control this infection. The main criteria for inactivated vaccines evaluation are its immunogenicity and specific activity.

The study **purposes** were to develop a sensitive and specific real-time PCR method for viral RNA quantification in the inactivated vaccine and to study the correlation between the viral RNA amount and vaccine immunogenicity.

**Material and methods.** L-segment fragments of the Puumala, Hantaan, and Sochi vaccine strains were selected as diagnostic targets for oligonucleotides and fluorescent probes. The immunogenicity of experimental vaccines was determined by the induction of neutralizing antibodies in BALB/c mice.

**Results.** A highly specific, sensitive and reproducible real-time PCR method has been developed. The analytical sensitivity was  $1.24 \pm 1.5 \times 10^2$  copies/ml for Puumala virus;  $1.16 \pm 1.4 \times 10^2$  copies/ml for Hantaan;  $1.32 \pm 1.8 \times 10^2$  copies/ml for Sochi, with a virus content of  $1.5 \pm 0.5$  lg FFU/ml;  $1.8 \pm 0.5$  lg FFU/ml and  $2.2 \pm 0.5$  lg FFU/ml, respectively. The viral RNA amount in experimental vaccine preparations inactivated with  $\beta$ -propiolactone was proportional to the neutralizing antibodies titer observed in mice following the immunization.

**Discussion.** It was found that different virus inactivators differently affects the detected viral RNA amount, but not the vaccine immunogenicity, which indicates the same degree of the immunogenic proteins damage. The direct relationship between the viral RNA copy number and vaccine immunogenicity makes it possible to use this criterion for vaccine dosage preparation.

**Conclusion.** The developed method for viral RNA quantification is a promising tool for the specific activity control of the HFRS vaccine.

**Key words:** *hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS); inactivated vaccine; real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR); formalin;  $\beta$ -propiolactone ( $\beta$ -PL); ultraviolet*

**For citation:** Egorova M.S., Kurashova S.S., Ishmukhametov A.A., Balovneva M.V., Deviatkin A.A., Safonova M.V., Ozherelkov S.V., Khapchaev Yu.Kh., Balkina A.S., Belyakova A.V., Dzagurova T.K., Tkachenko E.A. Real-time PCR assay development for the control of vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(1): 65-73 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-30>

**For correspondence:** Maria S. Egorova, Ph.D. (Biol.), Senior Researcher of the Laboratory of Hemorrhagic Fevers, FSBSI «M.I. Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences», 108819, Moscow, Russia. E-mail: [centrglps@yandex.ru](mailto:centrglps@yandex.ru)

### Information about the authors:

Egorova M.S., <https://orcid.org/0000-0002-6416-2573>

Kurashova S.S., <https://orcid.org/0000-0001-9934-699X>

Ishmukhametov A.A., <https://orcid.org/0000-0001-6130-4145>

Balovneva M.V., <https://orcid.org/0000-0003-2198-7521>

Deviatkin A.A., <https://orcid.org/0000-0003-0789-4601>

Safonova M.V., <https://orcid.org/0000-0002-5579-5694>

Ozherelkov S.V., <https://orcid.org/0000-0001-9778-0485>

Khapchaev Yu.Kh., <https://orcid.org/0000-0003-1613-5228>

Balkina A.S., <https://orcid.org/0000-0002-9704-7774>

Belyakova A.V., <https://orcid.org/0000-0003-4363-6399>

Dzagurova T.K., <https://orcid.org/0000-0002-6656-1682>

Tkachenko E.A., <https://orcid.org/0000-0002-6829-1241>

**Contribution:** Egorova M.S. – concept and design of the study, data analysis, experiments with animals, statistical analysis, writing of the text; Kurashova S.S. – concept and design of the study, data analysis, experiments with animals, statistical analysis, writing of the text; Ishmukhametov A.A. – concept and approval of the final version of the article; Balovneva M.V. – purified viral material obtaining, analysis of the immune status; Deviatkin A.A. – full genome sequencing of the vaccine strains, selection of the primers and probes; Safonova M.V. – selection of the primers and probes; Ozherelkov S.V. – purified viral material obtaining, analysis of the immune status; Khapchaev Yu.Kh. – purified viral material obtaining, analysis of the immune status; Balkina A.S. – technical support and editing of the text; Belyakova A.V. – technical support and editing of the text; Dzagurova T.K. – concept and approval of the final version of the article; Tkachenko E.A. – concept and approval of the final version of the article.

**Acknowledgment.** The study was performed under the topic of Government Order No. 0837-2019-0006.

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

Received 12 November 2020  
Accepted 18 February 2020

## Введение

Возбудители геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), относящиеся к роду *Orthohantavirus* (семейство *Hantaviridae*, отряд *Bunyavirales*), представляют собой группу оболочечных РНК-вирусов с негативным геномом. Они вызывают заболевание человека, известные как геморрагическая лихорадка с почечным синдромом (ГЛПС) в Европе и Азии и хантавирусный пульмональный синдром (ХПС) на территории Северной и Южной Америки [1–3].

Геном хантавирусов состоит из односпиральной 3-сегментированной РНК отрицательной полярности: большой L-сегмент кодирует вирусную РНК-полимеразу, средний (M-сегмент) кодирует 2 поверхностных гликопротеина Gn/Gc и малый S-сегмент – вирусный нуклеокапсидный белок (N) [4–6].

ГЛПС занимает ведущее место среди природно-очаговых болезней в Российской Федерации. Около 98% случаев ассоциировано с вирусом Пуумала (ПУУ), остальные – с вирусами Хантаан (ХТН), Сочи (СОЧИ), Амур, Сеул и Куркино [7].

Специфического лечения хантавирусных инфекций, способствующего эффективной элиминации возбудителя, на сегодняшний день нет; средства неспецифической профилактики часто малоэффективны [8]. В этой связи вакцинопрофилактика этих заболеваний остаётся актуальной задачей. К настоящему времени коммерческие инактивированные цельновирионные вакцины против ГЛПС производятся в Китайской Народной Республике (КНР) и Республике Корея на основе разновидностей Хантаан и Сеул [9], однако они не обладают перекрестной защитой против вируса Пуумала, ответственного за подавляющее большинство случаев болезни в Европе и России. Вследствие одновременной циркуляции на территории РФ хантавирусов ПУУ, ХТН и СОЧИ (генотип ортохантавируса Добрава/Белград) [7] наиболее эффективным может стать поливалентный инактивированный цельновирионный вакцинный препарат.

Специфическая активность и иммуногенность служат важнейшими критериями оценки инактивированной вакцины. В технологическом цикле производства после инактивирования возбудителя специфическую активность контролируют, как правило, по количественному содержанию целевого белка-иммуногена либо по числу копий РНК в единице объёма [10].

Цель исследования состояла в разработке чувствительного и специфичного количественного метода обнаружения РНК вакцинных штаммов в инактивированных вакцинах против ГЛПС, а также установлении корреляции между содержанием вирусного генетического материала и иммуногенностью.

## Материал и методы

**Характеристика вакцинного материала. Культура клеток и вирусы.** Для получения вирусосодержащего субстрата использовали линию перевиваемых клеток почек зелёной мартышки (*Cercopithecus aethiops*) Vero, полученную из клеточного банка Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) (WHO Vero cell bank ECACC, Accession number 991042), аттестованную и рекомендованную ВОЗ и Государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича (ГИСК) ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России в качестве возможного субстрата для производства инактивированных цельновирионных вакцинных препаратов.

Разработку контроля вирусной РНК методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) осуществляли на препаратах экспериментальных моновакцин (далее – вакцины), приготовленных на основе вакцинных штаммов вирусов Пуумала (PUU-TKD/VERO) – ВАК-ПУУ, Хантаан (HTN-P88/VERO) – ВАК-ХТН и Сочи (DOB-SOCHI/VERO) – ВАК-СОЧИ по ранее описанной методике [11] с применением различных способов инактивирования: формалин (Ф) в конечном разведении 1 : 4000 в течение 35 сут; β-пропиолактон (β-ПЛ) в конечном разведении 1 : 6000 на протяжении 180 мин; ультрафиолетовое (УФ) излучение при толщине слоя 0,3 см на расстоянии 24 см от источника коротковолновых УФ-лучей с длиной волны 253,7 нм в течение 3 мин [12].

Полногеномные сиквенсы указанных штаммов зарегистрированы в базе данных GenBank под номерами: PUU-TKD/VERO: S – MH251331, M – MH251332, L – MH251333; HTN-P88/VERO: S – MH251328, M – MH251329, L – MH251330 и DOB-SOCHI/VERO: S – MH251334, M – MH251335, L – MH251336.

Оценку количественного содержания вирусного генетического материала выполняли на следующих этапах: 1-й – очищенный концентрат моновалентных препаратов до инактивирования, 2-й – аналогичный

концентрат после инактивирования и 3-й – полуфабрикат трёхвалентной вакцины.

**Контроль содержания вирусной РНК методом ПЦР-РВ.** В качестве диагностической мишени для олигонуклеотидов и флуоресцентных зондов выбраны фрагменты L-сегментов вакцинных штаммов вирусов ПУУ, ХТН и СОЧИ. При выборе праймеров и зондов проводили анализ полногеномных сиквенсов вакцинных штаммов, а также геномов вирусов ПУУ, ХТН и СОЧИ, представленных в GenBank NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), при помощи программы MEGA-X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) с применением стандартных требований. Параметры праймеров рассчитывали в онлайн-сервисе OligoCalc: Oligonucleotide Properties Calculator (<http://biotoools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>); термодинамические характеристики флуоресцентных зондов и их вторичные структуры оценивали с помощью The mfold Web Server (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>). Олигонуклеотиды содержали флуоресцентную метку карбоксифлуоресцеин (FAM) на 5'- и гаситель флуоресценции (BHQ2) – на 3'-конце.

Синтез праймеров и зондов проводили в ЗАО «Евроген» (Россия). Разработанные зонды и праймеры представлены в **табл. 1**.

**Выделение РНК и проведение ПЦР-РВ.** РНК выделяли из хроматографически очищенного вирусного концентрата до инактивирования (контроль), а также после инактивации (Ф, β-ПЛ, УФ) методом хлороформ-фенольной экстракции [13] с применением коммерческого препарата TRI Reagent® («Sigma-Aldrich», США). Комплементарную ДНК (кДНК) получали путём обратной транскрипции в общем объёме реакционной смеси 20 мкл, содержащей 5× Reverse Transcription (RT) Buffer («Thermo Fisher Scientific», США), 2,5 мМ смеси 4-х немодифицированных высокоочищенных 2'-дезоксинуклеозид-5'-трифосфатов – dNTPs («СибЭнзим», Россия), 20 пМ праймера N6 Random («СибЭнзим»), 1 U обратной транскриптазы Maxima Reverse Transcriptase 200 е.а./мкл («Thermo Fisher Scientific») и 10 мкл раствора РНК. Реакцию проводили при следующих условиях: 10 мин при 25 °С, 30 мин при 42 °С и 6 мин – при 96 °С. Объём реакционной смеси для ПЦР-РВ был

равен 25 мкл и включал 10× Hot Start Buffer («Thermo Fisher Scientific»), 2,5 мМ dNTPs, 5 пМ каждого праймера и зонда («Евроген», Россия) (**табл. 1**), 2 е.а. ДНК-полимеразы HS Taq («Thermo Fisher Scientific»), 2 мкл кДНК и стерильную воду. Режим проведения реакции был следующим: 2 мин при 95 °С и затем 40 циклов по 15 с при 95 °С, 40 с при 55 °С и 30 с – при 72 °С. Амплификацию и детекцию в реальном времени выполняли на амплификаторе AriaMx 96 Bioanalyzer («Agilent Technologies», США).

**Стандартная кривая.** При постановке ПЦР-РВ осуществляли количественное определение целевой РНК в образце. Метод основан на построении стандартной кривой, которая отражает линейное отношение между значением порогового цикла (C<sub>q</sub>) и исходным количеством РНК (копий/мл) (**рис. 1**). Данные кривые получены амплификацией серии 10-кратных серийных разведений стандарта со средними значениями C<sub>q</sub> с учётом отрицательных и положительных контролей. Подобным же образом РНК из исходного материала серийно разводили для установления корреляции между C<sub>q</sub> и концентрацией вируса, выраженной в фокусобразующих единицах (ФОЕ) на 1 мл. Стандарты готовились из предельных 10-кратных разведений генетического материала вакцинных штаммов ПУУ, ХТН и СОЧИ с известной концентрацией возбудителя (ФОЕ/мл). В ходе исследования определяли количество вирусной нуклеиновой кислоты в 1 мл разведённого препарата и соотносили с величиной ФОЕ/мл.

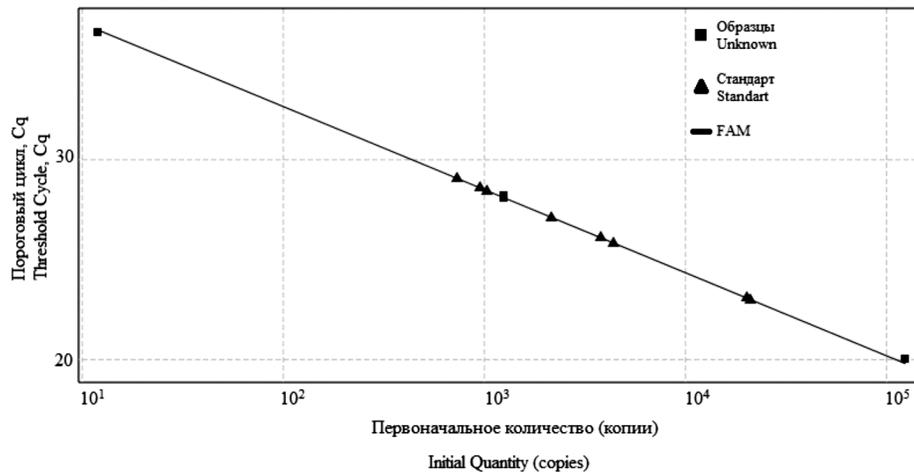
Концентрацию стандарта (число копий/мл) устанавливали методом цифровой ПЦР (droplet-digital PCR, ddPCR) в системе QX200 Droplet Digital PCR System («Bio-Rad Laboratory», США), затем проводили пересчёт на количество копий/мл, полученное при ПЦР-РВ. Далее инактивированные образцы анализировали с помощью стандартных кривых для количественного определения целевой РНК вируса.

**Специфичность системы.** Специфичность выбранных зондов и праймеров оценивали посредством тестирования РНК, выделенной из исходного раствора моновакцины, с другими патогенными для человека хантавирусами: Пуумала (штаммы CG-Kazan-79, Halnaas 83-L20 и Sotkamo); Хантаан (штаммы Ли 83-

Таблица 1. Праймеры и зонды

Table 1. Primers and probes

Штамм Strain	Название праймера/зонда Name of the primer/probe	Последовательность 5'→3' 5'→3' sequence
PUU-TKD/VERO	Ufa_Z 3780	BHQ1-TGC TCC TGG GAT GGT AAA TAA CCC AAC T-FAM
	Ufa_F 3760	GTA TTA TGT ACG AGT AAA GTT GAG AGA
	Ufa_R 3800	CCT AAA GGT ATA GGG ATT AAA CTC CT
DOB-SOCHI/VERO	Sochi_Z 4500	BHQ1-ATC CCA GCT GTG ATT GGG TAC AAG T-FAM
	Sochi_F 4480	TCA CTG TGA GAG AGA AGG ATC GA
	Sochi_R 4530	TAG AAC ATC TGA CAT TTC ATC AAC TGT
HTN-P88/VERO	Hantaan_Z 3770	BHQ1-TAC AGC ACC AGG TAT GGT GAA CCA-FAM
	Hantaan_F 3750	GTG TAC TAG TAA AGT TGA ACG GTT GT
	Hantaan_R 3790	GTG TAT CAG CAT GCT TGA CTT GCA



**Рис. 1.** Стандартная кривая зависимости порогового цикла от исходной концентрации РНК вируса Пуумала. Угол наклона (slope)  $y = -3,44x + 39,59$ , коэффициент корреляции ( $R^2$ ) = 0,998, эффективность ( $E$ ) = 110% линейной регрессии кривой. FAM – карбокси-флуоресцеин (флуоресцентная метка).

**Fig. 1.** Standard curve of the threshold cycle dependence on the initial concentration of Puumala virus RNA. The slope  $y = -3.44x + 39.59$ , correlation coefficient ( $R^2$ ) = 0.998, and efficiency ( $E$ ) = 110% of the linear regression curve. FAM is carboxyfluorescein (fluorescent tag).

61 и 76-118); Добрава (Белград-1); Сеул (SR-11 и A9); Sin Nombre (штамм CC/107), а также представителями других семейств: вирусами Крымской-Конго геморрагической лихорадки (штамм IbAg 10200); Денге (штаммы 8356/10, 4397/11, 3140/09 и 3274/09); японского энцефалита (Накаяма); клещевого энцефалита (Hochosterwitz); Западного Нила (MgAn 786/6/1995); Зика (MR766); Усуту (G39); жёлтой лихорадки (Asibi); Чикунгунья (23161) и Ласса (штамм Josiah).

**Контроль специфической активности методом иммуноферментного анализа (ИФА).** Для определения антигенов хантавирусов использовали тест-системы «ХАНТАГНОСТ» (ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», ФНЦИРИП) в соответствии с инструкцией производителя, а также разработанную «in-house» ХАНТА-N [14].

**Титрование фокусобразующих единиц вируса.** ФОЕ выявляли на монослое клеток Vero E6 по описанному ранее методу [15]. Количество инфицированных колоний подсчитывали визуально и выражали титр вируса в lg ФОЕ/мл.

**Контроль иммуногенности.** Иммуногенность экспериментальных вакцинных препаратов против ГЛПС с разными способами инаktivирования контролировали в опытах на клинически здоровых половозрелых мышах-самках линии BALB/c массой тела 18–20 г, полученных из филиала «Андреевка» ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства (ФМБА) России. Исследования на животных проводили в соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных и этическим комитетом ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН.

Животным опытных групп вводили исследуемый препарат в дозе 0,5 мл готовой формы экспериментальных вакцин в неразведённом виде (н/р) и в раз-

дениях 3-кратно внутримышечно с 2-недельными интервалами. Животным контрольной группы вводили в том же объёме 0,9% раствор натрия хлорида (К-ФР).

Мыши BALB/c были распределены по группам в соответствии с вводимыми экспериментальными препаратами:

1 – ВАК-ПУУ-Ф, 2 – ВАК-ПУУ-β-ПЛ, 3 – ВАК-ПУУ-УФ;

4 – ВАК-ХТН-Ф, 5 – ВАК-ХТН-β-ПЛ, 6 – ВАК-ХТН-УФ;

7 – ВАК-СОЧИ-Ф, 8 – ВАК-СОЧИ-β-ПЛ, 9 – ВАК-СОЧИ-УФ.

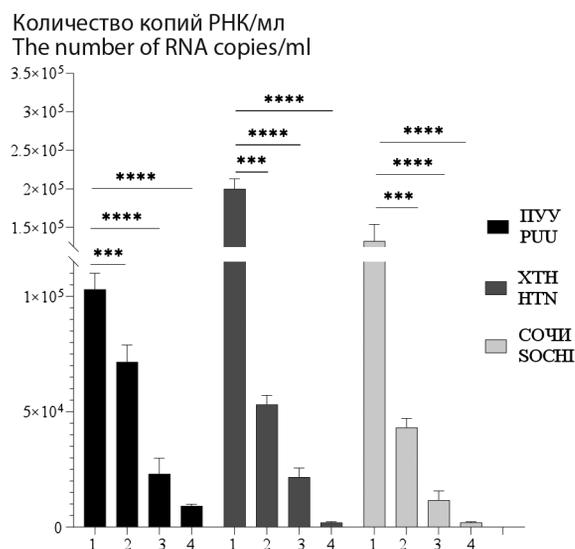
**Реакция нейтрализации (РН/ФОЕ<sub>50</sub>).** Нейтрализующие антитела (нАТ) определяли в реакции нейтрализации по 50%-ному подавлению фокусобразующих единиц (РН/ФОЕ<sub>50</sub>) в клеточной культуре Vero E6 по описанной ранее методике [15].

**Статистический анализ.** Достоверность результатов исследования оценивали в 3-х сериях экспериментов в идентичных условиях. Все данные проанализированы в программе GraphPad Prism v. 8.2.0. Статистическую значимость определяли с использованием одностороннего дисперсионного анализа (ANalysis Of VAriance, ANOVA) при помощи теста множественных сравнений Тьюка для сравнения средних значений каждого набора данных, при этом величины  $p < 0,05$  были отнесены к категории значимых. Статистическая достоверность указывалась как ns (несущественно);  $p < 0,05$ ;  $p < 0,01$ ;  $p < 0,005$  и  $p < 0,0001$ .

### Результаты

Флуоресценция по FAM регистрировалась только при исследовании РНК вакцинных штаммов ПУУ, ХТН и СОЧИ. При тестировании остальных возбудителей (включая другие штаммы ПУУ, ХТН и СОЧИ) зафиксирован отрицательный результат, что свидетельствует об отсутствии ложноположительных результатов и высокой специфичности метода.

Для сравнения чувствительности ПЦР-РВ и ИФА использованы образцы последовательных разведений вакцинных штаммов вирусов ПУУ, ХТН и СОЧИ. Чувствительность ПЦР-РВ составила для ПУУ –  $1,2 \pm 1,5 \times 10^2$  копий/мл, что соответствует  $1,5 \pm 0,5$  lg



**Рис. 2.** Анализ зависимости количества копий РНК от инактивирующего агента/мл. Представлены совокупные результаты 3-х независимых экспериментов с использованием одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с тестом множественных сравнений Тьюка. 1 – контроль; 2 – β-пропиолактон; 3 – формалин; 4 – УФ-излучение.

**Примечание.** \*\*\* –  $p < 0,005$ , \*\*\*\* –  $p < 0,0001$ .

**Fig. 2.** Analysis of the dependence of the number of RNA copies on the inactivating agent/ml. The combined results of 3 independent experiments using a one-sided analysis of variance (ANOVA) with Tukey’s multiple comparisons test are shown. 1 – control; 2 – β-propiolactone; 3 – formalin; 4 – UV radiation.

**Note.** \*\*\* –  $p < 0.005$ , \*\*\*\* –  $p < 0.0001$ .

ФОЕ/мл; для ХТН –  $1,16 \pm 1,4 \times 10^2$  копий/мл, что соответствует  $1,8 \pm 0,5$  lg ФОЕ/мл и для СОЧИ –  $1,32 \pm 1,8 \times 10^2$  копий/мл ( $2,2 \pm 0,5$  lg ФОЕ/мл). Чувствительность метода ИФА была существенно ниже: для вируса ПУУ – 1 : 256, соответствуюя 3,5 lg ФОЕ/мл, для ХТН – 1 : 128, соответствуюя 2,8 lg ФОЕ/мл, и для СОЧИ – 1 : 128 (3,2 lg ФОЕ/мл) (табл. 2). Показатели  $C_q$  были линейными и коррелировали с концентрацией РНК вирусов ПУУ, ХТН и СОЧИ; значение коэффициента корреляции  $R^2 = 0,99$ . Сравнение результатов ПЦР-РВ, ИФА и ФОЕ продемонстрировало, что разработанный метод молекулярно-генетического определения присутствия вируса обладает большей чувствительностью относительно ИФА. Эксперимент выполняли в 3-х повторах с соответствующими отрицательными контролями, измеряя величину стандартного отклонения ( $M \pm m$ , где  $M$  – среднее арифметическое,  $m$  – стандартная ошибка среднего). На основании этих данных выявлена корреляция между количеством ФОЕ/мл и числом копий РНК/мл.

**Количественный контроль содержания вирусной РНК в инактивированной вакцине методом ПЦР-РВ.** Результаты оценки количественного содержания РНК вирусов ПУУ, ХТН и СОЧИ показали совпадение концентрации возбудителя в образцах со стандартами, содержащими известное количество РНК этих агентов (рис. 1). Данная кривая использована для определения уровня количества копий РНК в вакцинном полуфабрикате после инактивирования (табл. 3).

На фоне воздействия инактиваторов на РНК вирусов ПУУ, ХТН и СОЧИ была выявлена статистически значимая разница между контрольными образцами (до инактивирования) и образцами, инактивированными разными способами ( $p < 0,0001$ ) (рис. 2). Максимальные потери РНК наблюдались после воздействия УФ, минимальные – после β-ПЛ. Следует отметить, что данные потери неизбежны и обусловлены механизмом действия инактивирующих агентов.

**Таблица 2.** Сравнение чувствительности методов ПЦР-РВ и ИФА

**Table 2.** Comparison of sensitivity of real-time qPCR and ELISA

Пуумала Puumala			Хантаан Hantaan			Сочи Sochi		
Титр вируса, lg ФОЕ/мл Virus titer, lg FFU/ml	ИФА ELISA	ПЦР-РВ qPCR	Титр вируса, lg ФОЕ/мл Virus titer, lg FFU/ml	ИФА ELISA	ПЦР-РВ qPCR	Титр вируса, lg ФОЕ/мл Virus titer, lg FFU/ml	ИФА ELISA	ПЦР-РВ qPCR
	Титр антигена* Antigen titer	копии/мл copies/ml		Титр антигена** Antigen titer	копии/мл copies/ml		Титр антигена** Antigen titer	копии/мл copies/ml
5,5	1 : 2048	$1,24 \times 10^5$	5,8	1 : 4096	$3,06 \times 10^5$	5,2	1 : 2048	$1,01 \times 10^5$
4,5	1 : 1024	$3,55 \times 10^4$	4,8	1 : 1024	$2,16 \times 10^4$	4,2	1 : 1024	$2,25 \times 10^4$
3,5	1 : 256	$6,91 \times 10^3$	3,8	1 : 1024	$9,53 \times 10^3$	3,2	1 : 128	$5,01 \times 10^3$
2,5	н.о. n.d.	$8,58 \times 10^2$	2,8	1 : 128	$3,39 \times 10^2$	2,2	н.о. n.d.	$1,32 \times 10^2$
1,5	н.о. n.d.	$1,24 \times 10^2$	1,8	н.о. n.d.	$1,16 \times 10^2$	1,2	н.о. n.d.	n.s.
0,5	н.о. n.d.	n.s.	0,8	н.о. n.d.	n.s.	0,2	н.о. n.d.	n.s.

**Примечание.** \* – использована ИФА тест-система «ХАНТАГНОСТ»; \*\* – использована ИФА тест-система «ХАНТА-N»; н.о. – не определялось; n.s. – отсутствует сигнал флюоресценции

**Note.** \* – ELISA test system «HANTAGNOST» was used; \*\* – ELISA test system «HANTA-N» was used; n.d. – not defined; n.s. – no fluorescence signal

**Контроль иммуногенности.** Для контроля иммуногенности экспериментальных вакцинных препаратов исходно использовали 1 пул вирусного сбора с известным титром, инактивированный различными способами.

После иммунизации мышей линии BALB/c препаратами вакцин, инактивированными формалином, β-ПЛ и УФ-лучами, побочных эффектов (как локальных, так и общих) не наблюдалось. При определении иммуногенности методом РН/ФОЕ<sub>50</sub> в группах отрицательного контроля титр нАТ не превышал 2,32 log<sub>2</sub> и был установлен в качестве предела отсечения. За приемлемый уровень индукции нАТ принимали показатель со средним геометрическим титром (СГТ) выше 4,32 log<sub>2</sub>.

Не было статистически значимой разницы в титрах нАТ после иммунизации животных моновакцинами, инактивированными формалином, β-ПЛ и УФ-лучами (табл. 3). Несмотря на различное количество копий РНК, выявляемых в дозе инактивированной разными способами вакцины, иммунный ответ не имел существенных отличий (титры нАТ статистически значимо не различались), что свидетельствует о сохранности иммуногенных эпитопов при испытанных способах инактивирования.

С целью выявления корреляции между количеством копий РНК и иммуногенностью мыши BALB/c были иммунизированы ВАК-ПУУ, инактивированной β-ПЛ

(ВАК-ПУУ-β-ПЛ), в соответствующих разведениях. В каждом из них определяли количество копий генетического материала на 1 мл и соотносили с титром выявленных после иммунизации нАТ. Результаты опытов показали прямую зависимость между содержанием копий РНК и титром нАТ (табл. 4).

### Обсуждение

Ранее контроль специфической активности вакцин осуществлялся посредством определения вирусных антигенов методом ИФА с использованием моноклональных антител к N- и/или G-белкам хантавирусов [14]. В данном исследовании представлена более чувствительная и технологичная методика оценки данной характеристики – ПЦР-РВ на основе полногеномного сиквенса вакцинных штаммов, которая продемонстрировала высокие показатели специфичности, чувствительности и повторяемости для количественного определения соответствующих штаммов в образцах инактивированного вакцинного препарата. В отличие от традиционных методов (ИФА) ПЦР-РВ обеспечивает высокую воспроизводимость количественного измерения.

Показана достоверная разница в числе копий РНК до и после инактивирования вакцинного полуфабриката различными способами, включая применение формалина, β-ПЛ и УФ-лучей. При этом иммуногенность этих препаратов не имела существенных разли-

**Таблица 3. Контроль специфической активности вакцинного полуфабриката вирусов Пуумала, Хантаан и Сочи**  
**Table 3. Control specific activity of the vaccine prefabricated Puumala, Hantaan and Sochi viruses products**

Вакцинный материал Vaccine material	Способ инактивирования Method of inactivation	Титр вируса, lg ФОЕ/мл Virus titer, lg FFU/ml	ПЦР-РВ ( $M \pm m$ ), копии/мл qPCR ( $M \pm m$ ), copies/ml	ИФА, титр антигена*** ELISA, antigen titer***	СГТ нАТ ( $M \pm m$ ), log <sub>2</sub> ** GMT nAb ( $M \pm m$ ), log <sub>2</sub> **
ВАК-ПУУ VAC-PUU	Контроль* Control*	5,50	$1,2 \pm 0,3 \times 10^5$	1:2048	–
	Формалин Formalin	–	$2,3 \pm 0,4 \times 10^4$	1:1024	$8,8 \pm 0,1$
	β-пропиолактон β-propiolactone	–	$7,0 \pm 0,3 \times 10^4$	1:2048	$8,8 \pm 0,1$
	УФ-излучение UV radiation	–	$9,2 \pm 0,4 \times 10^3$	1:2048	$8,8 \pm 0,1$
ВАК-ХТН VAC-HTN	Контроль* Control*	5,80	$3,0 \pm 0,3 \times 10^5$	1:4096	–
	Формалин Formalin	–	$2,2 \pm 0,4 \times 10^4$	1:2048	$9,4 \pm 0,1$
	β-пропиолактон β-propiolactone	–	$5,3 \pm 0,4 \times 10^4$	1:4096	$9,6 \pm 0,1$
	УФ-излучение UV radiation	–	$2,0 \pm 0,3 \times 10^3$	1:4096	$9,3 \pm 0,1$
ВАК-СОЧИ VAC-SOCHI	Контроль* Control*	5,20	$1,0 \pm 0,3 \times 10^5$	1:2048	–
	Формалин Formalin	–	$1,2 \pm 0,4 \times 10^4$	1:1024	$6,7 \pm 0,1$
	β-пропиолактон β-propiolactone	–	$4,3 \pm 0,4 \times 10^4$	1:2048	$6,9 \pm 0,1$
	УФ-излучение UV radiation	–	$2,0 \pm 0,3 \times 10^3$	1:2048	$6,8 \pm 0,1$

**Примечание.** \*Контроль – исходный вакцинный полуфабрикат до инактивирования; \*\*СГТ – средний геометрический титр нейтрализующих антител, log<sub>2</sub>; \*\*\* – использованы ИФА тест-системы «ХАНТАГНОСТ» и «ХАНТА-N».

**Note.** \*The control is the initial vaccine prefabricated product before inactivation; \*\*GMT is geometric mean titer of neutralizing antibodies, log<sub>2</sub>; \*\*\* – ELISA test systems «HANTAGNOST» and «HANTA-N» were used.

**Таблица 4. Корреляция количества копий вирусной РНК с титром нАТ в сыворотках крови мышей линии BALB/c после иммунизации ВАК-ПУУ-β-ПЛ**

**Table 4. Correlation between RNA copy number and nAB titer in the blood of BALB/c mice following VAC-PUU-β-PL immunization**

Разведение вакцины Vaccine dilution	ПЦР-РВ ( $M \pm m$ ), копии/мл qPCR ( $M \pm m$ ), copies/ml	Титр нАТ (СГТ), log <sub>2</sub> nAB titer, log <sub>2</sub>
n/p* u/d*	$7,0 \pm 0,3 \times 10^4$	$8,8 \pm 0,1$
1/2	$4,3 \pm 0,4 \times 10^4$	$6,3 \pm 0,1$
1/8	$7,6 \pm 0,3 \times 10^3$	$5,4 \pm 0,1$

**Примечание.** \*n/p – неразведённый вакцинный препарат

**Note.** \*u/d – undiluted vaccine preparation

чий по количеству индуцируемых нАТ, что указывает на равнозначное повреждение белков-иммуногенов при разной степени разрушения вирусной РНК тестируемыми инактиваторами. В расширенных исследованиях по разработке контроля специфической активности вакцин методом ПЦР-РВ было решено остановиться на β-ПЛ-инактивированных вакцинных препаратах, основное преимущество которых по сравнению с инактивированными формалином и УФ-лучами заключается в снижении содержания балластных белков за счёт уменьшения их агрегации. Это ведёт к более эффективной очистке вируса на этапах осветляющей фильтрации и гель-фильтрации, а также снижению потерь целевого компонента вакцины в результате стерилизующей фильтрации. Полученные результаты корреляции количества копий РНК с титром нАТ в сыворотках крови мышей линии BALB/c после иммунизации позволяют рассчитать иммунизирующую дозу вакцины по количественному содержанию копий вирусной нуклеиновой кислоты в единице объёма. Согласно данным настоящей работы минимальная иммунизирующая доза инактивированного β-ПЛ вакцинного препарата, индуцирующая нАТ в титре  $4,32 \log_2$  у 10 из 10 иммунизированных мышей BALB/c, соответствует  $7,5 \pm 0,2 \times 10^2$  копий РНК/мл. Метод обладает высокой специфичностью и надёжной воспроизводимостью, что делает перспективным его применение для контроля специфической активности вакцин против ГЛПС.

**Соблюдение этических стандартов.** На момент начала исследования животные находились в одинаковых условиях содержания и кормления. Исследования на экспериментальных моделях проводили в соответствии с международными и национальными положениями по уходу за животными и их использованию. Указанные положения основаны на этических принципах, установленных Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, принятой там же 18 марта 1986 г. и подтверждённой в Страсбурге 1 июня 2006 г. (ETS N 123), ([https://www.coe.int/t/e/legal\\_affairs/legal\\_cooperation/biological\\_safety\\_and\\_use\\_of\\_animals/laboratory\\_animals/](https://www.coe.int/t/e/legal_affairs/legal_cooperation/biological_safety_and_use_of_animals/laboratory_animals/)

GT123(2002)63%20E%20PART%20B%20Ferrets%20rev2.pdf), соответствующих принципам этического комитета ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН, а также правилах надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice, GLP) (<http://docs.cntd.ru/document/1200101144>, <https://www.nc3rs.org.uk/the-3rs>) (ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики»).

## Заключение

Вакцинопрофилактика любого инфекционного заболевания требует адекватного контроля качества вакцинных препаратов. Разработанная система определения количественного содержания вирусной РНК на основе ПЦР-РВ благодаря своим характеристикам представляется перспективной для применения с целью оценки специфической активности вакцины против ГЛПС.

## ЛИТЕРАТУРА

- Kruger D.H., Figueiredo L.T., Song J.W., Klempa B. Hantaviruses – globally emerging pathogens. *J. Clin. Virol.* 2014; 64: 128–36. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.033>.
- Lähdevirta J. Nephropathia epidemica in Finland. A clinical, histological and epidemiological study. *Ann. Clin. Res.* 1971; 3(Suppl. 8): 1–154.
- Schmaljohn C., Hjelle B. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerg. Infect. Dis.* 1997; 3(2): 95–104. <https://doi.org/10.3201/eid0302.970202>.
- Maes P., Li S., Verbeeck J., Keyaerts E., Clement J., Van Ranst M. Evaluation of the efficacy of disinfectants against Puumala hantavirus by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 2007; 141(1): 111–5. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.037>.
- Plyusnin A., Vapalahti O., Vaheri A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *J. Gen. Virol.* 1996; 77(Pt. 11): 2677–87. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-11-2677>.
- Schmaljohn C.S., Dalrymple J.M. Analysis of Hantaan virus RNA: evidence for a new genus of Bunyaviridae. *Virology.* 1983; 131(2): 482–91. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(83\)90514-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(83)90514-7).
- Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Bernshstein A.D., Morozov V.G., Sinyugina A.A., et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(12): 2325–8. <https://doi.org/10.3201/eid2512.181649>.
- Liu R., Ma H., Shu J., Zhang Q., Han M., Liu Z., et al. Vaccines and therapeutics against hantaviruses. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 2989. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02989>.
- Бархалева О.А., Воробьева М.С., Ладьяженская И.П., Ткаченко Е.А., Дзагурова Т.К. Вакцина против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2011; (1): 27–30.
- Jiang W., Ma N., Hui Q., Chen B., Qiu Y., Sun H., et al. Type inactivated bivalent hantavirus vaccines using dual fluorescence quantitative real time PCR: Establishment and evaluation. *J. Med. Virol.* 2017; 89(1): 10–6. <https://doi.org/10.1002/jmv.24599>.
- Ткаченко Е.А., Ишмухаметов А.А., Дзагурова Т.К., Сinyugina A.A., Коротина Н.А., Набаткина П.А., и др. Разработка экспериментально-промышленной технологии производства вакцины для профилактики геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской технике.* 2015; (6): 47–53.
- Курашова С.С., Ишмухаметов А.А., Егорова М.С., Баловнева М.В., Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А. Сравнительная характеристика инактивирующих агентов для создания вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2018; 17(4): 26–8. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-4-26-29>.
- Епринцев А.Т., Попов В.Н., Федорин Д.Н. *Идентификация и исследование экспрессии генов: Учебно-методическое пособие для вузов.* Воронеж; 2008: 14–5.
- Дзагурова Т.К., Солопова О.Н., Свешников П.Г., Коротина Н.А., Баловнева М.В., Леонович О.А., и др. Разработка иммунофер-

ментной тест-системы на основе моноклональных антител для определения специфической активности вакцины против геморрагической лихорадки с почечным синдромом. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(1): 40–4.

15. Дзагурова Т.К., Ткаченко Е.А., Башкирцев В.Н., Окулова Н.М., Апекина Н.С., Коротина Н.А., и др. Выделение и идентификация штаммов хантавирусов – возбудителей ГЛПС в Европейской части России. *Медицинская вирусология*. 2008; 25: 142–50.

## REFERENCES

- Kruger D.H., Figueiredo L.T., Song J.W., Klempa B. Hantaviruses – globally emerging pathogens. *J. Clin. Virol.* 2014; 64: 128–36. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.033>.
- Lähdevirta J. Nephropathia epidemica in Finland. A clinical, histological and epidemiological study. *Ann. Clin. Res.* 1971; 3(Suppl. 8): 1–154.
- Schmaljohn C., Hjelle B. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerg. Infect. Dis.* 1997; 3(2): 95–104. <https://doi.org/10.3201/eid0302.970202>.
- Maes P., Li S., Verbeeck J., Keyaerts E., Clement J., Van Ranst M. Evaluation of the efficacy of disinfectants against Puumala hantavirus by real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods.* 2007; 141(1): 111–5. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.11.037>.
- Plyusnin A., Vapalahti O., Vaheri A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *J. Gen. Virol.* 1996; 77 (Pt. 11): 2677–87. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-11-2677>.
- Schmaljohn C.S., Dalrymple J.M. Analysis of Hantaan virus RNA: evidence for a new genus of Bunyaviridae. *Virology.* 1983; 131(2): 482–91. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(83\)90514-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(83)90514-7).
- Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Bernshstein A.D., Morozov V.G., Sinyugina A.A., et al. Hemorrhagic fever with renal syndrome, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(12): 2325–8. <https://doi.org/10.3201/eid2512.181649>.
- Liu R., Ma H., Shu J., Zhang Q., Han M., Liu Z., et al. Vaccines and therapeutics against hantaviruses. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 2989. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02989>.
- Barkhaleva O.A., Vorob'eva M.S., Ladyzhenskaya I.P., Tkachenko E.A., Dzagurova T.K. Vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome [*Vaktsina protiv gemorragicheskoi likhoradki s pochechnym sindromom*]. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie.* 2011; (1): 27–30 (in Russian).
- Jiang W., Ma N., Hui Q., Chen B., Qiu Y., Sun H., et al. Type inactivated bivalent hantavirus vaccines using dual fluorescence quantitative real time PCR: Establishment and evaluation. *J. Med. Virol.* 2017; 89(1): 10–6. <https://doi.org/10.1002/jmv.24599>.
- Tkachenko E.A., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Sinyugina A.A., Korotina N.A., Nabatnikov P.A., et al. Manufacturing techniques and methods of control of the inactivated vero cell-derived vaccine against HFRS has been developed in Russia [*Razrabotka eksperimental'no-promyshlennoi tekhnologii proizvodstva vaktsiny dlya profilaktiki gemorragicheskoi likhoradki s pochechnym sindromom*]. *Remedium. Zhurnal o rossiyskom rynke lekarstv i meditsinskoj tekhnike.* 2015; (6): 47–53 (in Russian).
- Kurashova S.S., Ishmukhametov A.A., Egorova M.S., Balovneva M.V., Dzagurova T.K., Tkachenko E.A. Comparative characteristics of inactivation agents for HFRS vaccine development [*Sravnitel'naya kharakteristika inaktiviruyushchikh agentov dlya sozdaniya vaktsiny protiv gemorragicheskoi likhoradki s pochechnym sindromom*]. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika.* 2018; 17(4): 26–8. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-4-26-29> (in Russian).
- Eprintsev A.T., Popov V.N., Fedorin D.N. *Identification and Study of Gene Expression: A Teaching Aid for Universities [Identifikatsiya i issledovanie ekspressii genov: Uchebno-metodicheskoe posobie dlya vuzov]*. Voronezh; 2008: 14–5 (in Russian).
- Dzagurova T.K., Solopova O.N., Sveshnikov P.G., Korotina N.A., Balovneva M.V., Leonovich O.A., et al. Development of ELISA on the basis of monoclonal antibodies for detecting specific activity of the vaccine against hemorrhagic fever with renal syndrome [*Razrabotka immunofermentnoi test-sistemy na osnove monoklona'nyh antitel dlya opredeleniya specificheskoi aktivnosti vaktsiny protiv gemorragicheskoi likhoradki s pochechnym sindromom*]. *Voprosy virusologii.* 2013; 58(1): 40–4 (in Russian).
- Dzagurova T.K., Tkachenko E.A., Bashkirtsev V.N., Okulova N.M., Apekina N.S., Korotina N.A., et al. Isolation and identification of strains of hantavirus-causative agents of HFRS in the European part of Russia [*Vydelenie i identifikatsiya shtammov khantavirusov – vozбудitelei GLPS v Evropeiskoi chasti Rossii*]. *Meditsinskaya virusologiya.* 2008; 25: 142–50 (in Russian).



## Течение и исходы хронического вирусного гепатита D у жителей Республики Тыва как эндемичного региона

Исаева О.В.<sup>1,2</sup>, Ильченко Л.Ю.<sup>1,3,4</sup>, Сарыглар А.А.<sup>5</sup>, Карлсен А.А.<sup>1,2</sup>, Кюрегян К.К.<sup>1,2</sup>, Михайлов М.И.<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993, Москва, Россия;

<sup>3</sup>ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН», 108819, Москва, Россия;

<sup>4</sup>ФГАУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, Москва, Россия;

<sup>5</sup>ГБУЗ РТ «Инфекционная больница», 667003, Кызыл, Республика Тыва, Россия

**Введение.** Гепатит D (дельта,  $\delta$ ) вызывается РНК-содержащим вирусом (вирус гепатита D, hepatitis D virus – HDV), выделенным в род *Deltavirus*, и представляет собой наиболее тяжёлое и трудно поддающееся лечению заболевание как среди вирусных гепатитов, так и инфекционных болезней в целом. Развитие HDV-инфекции в организме-хозяине возможно только при наличии вируса гепатита В (HBV). Двойное инфицирование HBV и HDV по сравнению с моноинфекцией первым из них в большей степени связано с ускоренным прогрессированием хронического гепатита, трансформацией его в цирроз печени (ЦП) и неблагоприятным прогнозом. Данные о влиянии клинко-биохимических и вирусологических факторов на профиль инфекционного процесса у больных хроническим вирусным гепатитом (ХВГ) D в настоящее время ограничены в силу недостаточного количества исследований по этой тематике.

**Цель работы** – определить демографические, клинко-биохимические и вирусологические факторы, влияющие на течение и прогрессирование ХВГ D у наблюдавшихся на протяжении 10 лет пациентов, проживающих на территории одного из эндемичных регионов РФ – Республики Тыва.

**Материал и методы.** Проанализированы изменения клинко-лабораторных показателей в динамике у 121 инфицированного HDV пациента с различным течением заболевания, находившихся под наблюдением с 2009 по 2019 г. Среди участников выделены 3 группы: 1-я группа – 61 человек с прогрессированием ХВГ до ЦП (класс В-С по Чайлд–Пью), 2-я – 49 больных с непрогрессирующим ХВГ и 3-я – 11 пациентов, имевших медленно прогрессирующий ЦП (класс А). Изучались демографические данные, наличие детектируемой ДНК HBV, показатели функционального состояния печени: активность аланиновой (АЛТ) и аспарагиновой (АСТ) аминотрансфераз, щелочной фосфатазы (ЩФ), гамма-глутамилтранспептидазы (гамма-глутамилтранспептидазы) (ГГТП) и содержание общего билирубина (ОБ). Степень выраженности печёночной энцефалопатии (ПЭ) оценивали по длительности выполнения теста связи чисел (ТСЧ).

**Результаты.** Все исследуемые принадлежали к одной этнической группе (тувинцы), были инфицированы HDV с одинаковым генотипом и сохраняли положительную РНК HDV на протяжении всего периода наблюдения. Достоверные различия по гендерному соотношению и среднему возрасту на момент включения в исследование между группами отмечены не были. В 1-й группе среднее количество лет от начала наблюдения до формирования ЦП составило  $3,65 \pm 2,3$  года, до летального исхода –  $4,5 \pm 3,0$  года. Достоверно более высокие значения активности АСТ, ЩФ, ГГТП, содержания ОБ и длительности выполнения ТСЧ выявлены в 1-й группе по сравнению со 2-й; показатели активности АЛТ в них значимо не различались. При сравнении участников с прогрессированием заболевания и медленно прогрессирующим ЦП (1-я и 3-я группы) не выявлено статистически достоверных различий ни по одному из клинко-биохимических параметров. Показатели активности АЛТ, ГГТП, уровня ОБ и выполнения ТСЧ были достоверно выше у страдавших медленно прогрессирующим ЦП (3-я группа) по сравнению со 2-й группой; различия по активности АСТ и ЩФ между ними не выявлены. Положительный результат обнаружения ДНК HBV достоверно чаще отмечен у имевших прогрессирующее течение болезни и у пациентов с ХВГ, чем у больных с медленно прогрессирующим ЦП. Не было значимых различий в частоте выявления этого маркера у исследуемых 1-й и 2-й групп.

**Заключение.** Полученные на относительно однородной выборке результаты показали, что возраст и пол не являются факторами, влияющими на прогрессирование ХВГ D в ЦП; отсутствие детектируемой ДНК HBV связано с медленным прогрессированием последнего. Выявленные различия клинко-биохимических параметров отражают степень функционального поражения печени при ХВГ D и HDV-ассоциированном циррозе.

**Ключевые слова:** вирус гепатита D (HDV); хронический вирусный гепатит D; цирроз печени; клинко-биохимические показатели, Республика Тыва

**Для цитирования:** Исаева О.В., Ильченко Л.Ю., Сарыглар А.А., Карлсен А.А., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Течение и исходы хронического вирусного гепатита D у жителей Республики Тыва как эндемичного региона. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66 (1): 74-83. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-29>

**Для корреспонденции:** Исаева Ольга Владиславовна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник научно-исследовательского института молекулярной и персонализированной медицины, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993, Москва, Россия; ведущий научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия. E-mail: isaeva.06@mail.ru

**Участие авторов:** Исаева О.В. – дизайн исследования, анализ результатов, написание текста; Ильченко Л.Ю. – проведение клинических исследований; Сарыглар А.А. – организация сбора материала для лабораторных исследований; Карлсен А.А. – проведение лабораторных исследований; Кюрегян К.К. – разработка концепции и дизайна исследования; Михайлов М.И. – организация выполнения исследования.

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

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

Поступила 11.11.2020

Принята в печать 30.12.2020

## Clinical course and outcomes of chronic viral hepatitis D in patients from Republic of Tuva as endemic region

Ol'ga V. Isaeva<sup>1,2</sup>, Lyudmila Yu. Il'chenko<sup>1,3,4</sup>, Anna A. Saryglar<sup>5</sup>, Anastasiya A. Karlsen<sup>1,2</sup>, Karen K. Kyuregyan<sup>1,2</sup>, Mikhail I. Mikhailov<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>FSBEI FPE «Russian Medical Academy of Continuous Professional Education» of the Ministry of Health of Russia, 125993, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>FSBSI «M.P. Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences», 108819, Moscow, Russia;

<sup>4</sup>FSAEI HE «N.I. Pirogov Russian Research Medical University» of the Ministry of Health of Russia, 117997, Moscow, Russia;

<sup>5</sup>SBHI RT «Infectious Diseases Hospital», 667003, Kyzyl, the Tuva Republic, Russia

**Introduction.** Hepatitis D (delta,  $\delta$ ) is caused by an RNA virus (hepatitis D virus, HDV) from genus *Deltavirus*, and is the most severe and difficult to treat disease among both viral hepatitis and infectious diseases in general. The development of HDV infection in the host organism is possible only in the presence of hepatitis B virus (HBV). Coinfection with HBV and HDV is associated with a more rapid progression of chronic viral hepatitis (CVH) to liver cirrhosis (LC) and an unfavorable outcome in comparison with HBV mono-infection. Data on the influence of clinical, biochemical and virological factors on the infectious process in patients with hepatitis D are limited due to the insufficient amount of research on this theme.

The study aimed to determine demographic, clinical, biochemical, and virological factors influencing the course and progression of CVH D in patients followed during 10 years, residing in the territory of the Tuva Republic, one of the endemic regions of the Russian Federation.

**Material and methods.** Changes in clinical and laboratory parameters were analyzed in dynamics in 121 HDV infected patients with a different course of the disease, who were under observation from 2009 to 2019. Three groups of patients were identified: group 1 – 61 patients with disease progression of chronic hepatitis to LC (Child–Pugh class B–C), group 2 – 49 patients with non-progressive chronic hepatitis, and group 3 – 11 patients with slowly progressive LC (class A). Demographic data, the presence of detectable HBV DNA, indicators of the functional state of the liver: alanine aminotransferase (ALT/GPT), aspartate aminotransferase (AST/GOT), alkaline phosphatase (ALP), gamma-glutamyltransferase (GGT), and total bilirubin content were analyzed. The severity of hepatic encephalopathy was assessed by the duration of the numbers connection test (NCT).

**Results.** All patients belonged to the same ethnic group (Tuvians), were infected with HDV genotype 1 and were positive for HDV RNA throughout the entire follow-up period. There were no significant differences in sex ratio and mean age at the time of inclusion in the study between the groups. In group 1, the average number of years from inclusion in the study to the formation of LC was  $3.65 \pm 2.3$  years, years to the lethal outcome:  $4.5 \pm 3$  years. Significantly higher levels of AST/GOT, ALP, GGT, total bilirubin (TB) and NCT grade were found in group 1 compared to group 2. ALT/GPT levels did not differ significantly in these groups. When comparing groups with disease progression and slowly progressive LC (groups 1 and 3), no significant differences were found in any of the clinical and biochemical parameters. ALT/GPT, GGT, TB and NCT values were significantly higher in patients with slowly progressive LC (group 3) compared to group 2. No differences in AST/GOT and ALP levels were found between these groups. Detectable HBV DNA was significantly more frequent in patients with progressive disease and with chronic viral hepatitis than in patients with slowly progressive LC. There were no significant differences in the frequency of HBV DNA detection in patients from groups 1 and 2.

**Conclusion.** The results obtained on a relatively homogeneous cohort demonstrated that age and gender are not the factors influencing the progression of chronic viral hepatitis D to cirrhosis. The lack of detectable HBV DNA is associated with the slow progression of LC. The revealed differences in clinical and biochemical parameters reflect the degree of functional liver damage in chronic viral hepatitis D and HDV-associated cirrhosis.

**Key words:** hepatitis D virus (HDV); chronic viral hepatitis D; liver cirrhosis; clinical and biochemical parameters, Republic of Tuva

**For citation:** Isaeva O.V., Il'chenko L.Yu., Saryglar A.A., Karlsen A.A., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I. Clinical course and outcomes of chronic viral hepatitis D in patients from Republic of Tuva as endemic region. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(1): 74-83 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-29>

**For correspondence:** Ol'ga V. Isaeva, Ph.D. (Biol.), Lead Researcher of the Research Institute of Molecular and Personalized Medicine, FSBEI FPE «Russian Medical Academy of Continuous Professional Education» of the Ministry of Health of Russia, 125993, Moscow, Russia; Lead Researcher, Laboratory of Viral Hepatitis, FSBSI «I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 105064, Moscow, Russia. E-mail: [isaeva.06@mail.ru](mailto:isaeva.06@mail.ru)

**Information about the authors:**

Isaeva O.V., <https://orcid.org/0000-0002-2656-3667>

Il'chenko L.Yu., <http://orcid.org/0000-0001-6029-1864>

Saryglar A.A., <http://orcid.org/0000-0002-2116-9839>

Karlsen A.A., <https://orcid.org/0000-0002-6013-7768>

Kyuregyan K.K., <http://orcid.org/0000-0002-3599-117X>

Mikhailov M.I., <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>

**Contribution:** Isaeva O.V. – design of the study, analysis of results, writing of the text; Il'chenko L.Yu. – conducting clinical studies; Saryglar A.A. – organization of collecting material for laboratory studies; Karlsen A.A. – conducting laboratory studies; Kyuregyan K.K. – concept and design of the study, Mikhailov M.I. – organization of the study.

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

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

Received 11 November 2020

Accepted 30 December 2020

## Введение

Гепатит D (дельта,  $\delta$ ) вызывается РНК-содержащим вирусом (вирус гепатита D, hepatitis D virus – HDV), выделенным в род *Deltavirus*, и представляет собой наиболее тяжёлое и трудно поддающееся лечению заболевание как среди вирусных гепатитов, так и инфекционных болезней в целом [1]. Развитие HDV-инфекции в организме-хозяине возможно только при наличии вируса гепатита В (HBV) [2]. Двойная инфекция этими агентами в большей степени по сравнению с изолированным инфицированием HBV ассоциирована с ускоренным прогрессированием хронического гепатита, трансформацией его в цирроз печени (ЦП) и неблагоприятным прогнозом [3, 4]. Течение и исход хронического вирусного гепатита (ХВГ) D определяются совокупностью изменений клинико-биохимических и вирусологических показателей [5]. Характер его клинических проявлений, тяжесть и скорость прогрессирования сильно варьируют [6], однако данные о факторах, влияющих на профиль инфекционного процесса (со стороны как макро-, так и обоих микроорганизмов), в настоящее время ограничены в силу недостаточного количества исследований по этой тематике [7].

Представления о гепатите D как относительно редком заболевании, по-видимому, не соответствуют действительности. Так, данные метаанализа, проведённого Н.У. Chen с соавт., показали, что хроническую HDV-инфекцию в мире имеют не 20 млн. человек, как представлялось ранее, а свыше 70 млн. Это более чем в 2 раза превышает аналогичный показатель для вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [8]. Данные по распространённости HDV в России остро нуждаются в актуализации. Согласно статистике, на европейской территории страны этот патоген встречается примерно у 5% лиц с HBV-инфекцией. В то же время нами и другими исследователями показано, что в азиатской части Российской Федерации имеются эндемичные по ХВГ D регионы, где данным виру-

сом инфицировано до 20–45% имеющих HBV [9, 10], т.е. распространение болезни на территории РФ (как и во всём мире) носит мозаичный характер.

Известно, что в Монголии, которая непосредственно граничит с Республикой Тыва (РТ), показатель распространённости HDV-инфекции весьма высок: 60% HBsAg-позитивных пациентов имеют антитела (АТ) к её возбудителю (anti-HDV) [11]. Причины и история формирования эндемичных по ХВГ D регионов, а также особенности циркуляции вируса в них (ведущие пути передачи, факторы риска, формирование семейных очагов и т.д.) до сих пор не изучены. Ситуация осложняется тем, что в России тестирование на маркёры ХВГ D для пациентов с выявленной HBV-инфекцией не является обязательным. Более того, это заболевание не относится к регистрируемым инфекциям; все его случаи учитываются в статистике по вирусному гепатиту В, что маскирует реальную заболеваемость населения, бремя рассматриваемой патологии и её влияние на систему здравоохранения.

Одним из высокоэндемичных регионов на территории РФ является РТ, где около 10% общей популяции инфицировано HBV, а примерно половина этих лиц имеет коинфекцию HDV [12]. На основании изучения уникального клинического материала, полученного в ходе проводившегося в этом территориальном субъекте с 2009 г. наблюдения за когортой пациентов с хронической HDV-инфекцией, показано, что болезнь имеет различные течение и исходы. В одних случаях это быстрый прогресс с развитием декомпенсированного ЦП и его осложнений (печёночная (портосистемная) энцефалопатия (ПЭ), кома, кровотечение), высокой частотой летальных исходов, что обуславливает низкую частоту формирования гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) [13]. У других лиц отмечается длительная (на протяжении 10 лет) хроническая форма инфекции без ЦП. Возможно также многолетнее течение непрогрессирующего ЦП класса А по шкале Чайлд–Пью.

Цель работы – определить демографические, клинико-биохимические и вирусологические факторы, влияющие на течение и прогрессирование ХВГ D у наблюдавшихся в динамике на протяжении 10 лет пациентов, проживающих на территории эндемичного региона РФ (РТ).

### Материал и методы

Проанализированы динамические изменения клинико-лабораторных данных 121 больного ХВГ D с различным течением заболевания. Все пациенты состояли на учёте в консультативном кабинете ГБ-УЗ РТ «Инфекционная больница» с 2009 по 2019 г. и принадлежали к одной этнической группе (тувинцы). Количество ежегодных обследований за период наблюдения варьировало от 2 до 7. По факту впервые установленного диагноза на момент включения в исследование и исходу болезни сформированы 3 группы инфицированных HDV: 1-я группа – 61 человек с прогрессированием хронического гепатита до ЦП (класс В-С по Чайлд–Пью), 2-я – 49 больных с не прогрессирующим ХВГ D и 3-я – 11 пациентов, имеющих медленно прогрессирующий ЦП (класс А). За указанный период в 1-й группе от декомпенсированного ЦП и ГЦК скончались 17 человек; в других группах летальные случаи отсутствовали. Изучались демографические данные (пол, возраст на момент начала исследования); наличие детектируемых РНК HDV и ДНК HBV; показатели функционального состояния печени: активность аланиновой (АЛТ) и аспаргиновой (АСТ) аминотрансфераз, щелочной фосфатазы (ЩФ), гамма-глутамилтранспептидазы (гамма-глутамилтрансферазы) (ГГТП) и содержание общего билирубина (ОБ). Степень выраженности ПЭ оценивали по длительности выполнения теста связи чисел (ТСЧ). От каждого участника было получено информированное согласие на проведение обследования и публикацию полученных результатов.

ДНК HBV и РНК HDV в образцах сыворотки выявляли молекулярно-биологическими методами. Выделение нуклеиновых кислот проводили с помощью набора MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I на автоматической станции MagNA Pure Compact («Roche Applied Science», Mannheim, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Определение ДНК HBV осуществляли в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с вложенными праймерами к консервативному участку перекрывающихся генов *S* и *P*, кодирующих соответственно поверхностный белок и ДНК-полимеразу HBV. Чувствительность выявления ДНК HBV в данной реакции составляла не менее 50 МЕ/мл по результатам тестирования серии предельных разведений образцов с известной концентрацией детектируемого продукта. Амплификацию в ПЦР с высокоточной ДНК-полимеразой выполняли с использованием набора Fast Start High Fidelity PCR System («Roche Applied Science») по протоколу производителя со следующими праймерами: 5'-ССТ GCT GGT GGC TCC AGT TC-3' (внешний прямой), 5'-ССА САА TTC KTT GAC ATA CTT

TCC A-3' (внешний обратный); 5'-CCG AGG ACT GGG GAC CCTG-3' (внутренний прямой), 5'-GGT TAG GGT TTA AAT GTA TACC-3' (внутренний обратный). Условия для обоих раундов ПЦР были следующими: 94 °С – 2 мин, затем 35 циклов: денатурация при 94 °С – 45 с, отжиг при 55 °С – 45 с и удлинение цепи при 72 °С – 1 мин 30 с. Полученный продукт величиной 713 п.о. визуализировали в агарозном геле в сравнении с маркером молекулярных масс.

Для детекции РНК HDV применяли метод обратной транскрипции (ОТ) с последующей ПЦР с вложенными праймерами для участка *R0*. Координаты праймеров согласно референсной последовательности M21012 (положительная цепь РНК): внешний прямой праймер HDV850 (5'-CGG ATG CCC AGG TCG GACC-3'; 853–871 н.п.) и внешний обратный HDV1380 (5'-GGA GCW CCC CCG GCG AAGA-3'; 1382–1400 н.п.); внутренний прямой HDV856 (5'-AGG TGG AGA TGC CAT GCC GAC-3'; 878–898 н.п.) и внутренний обратный HDV1275 (5'-GGA YCA CCG AAG AAG GAA GGCC-3'; 1278–1299 н.п.). ОТ осуществляли при помощи коммерческого набора M-MLV («Sileks», Россия) согласно протоколу производителя, используя видоспецифичный праймер HDV1380; условия реакции – 42 °С, 60 мин. ПЦР проводили с помощью коммерческого набора Taq-полимера («Sileks») также в соответствии с инструкцией производителя. Условия обоих раундов были одинаковыми: 95 °С – 5 мин, 35 циклов при 95 °С – 30 с, 55 °С – 30 с, 72 °С – 45 с и контрольный этап удлинения цепи 72 °С – 7 мин. Полученные в результате ампликоны длиной 380 п.о. визуализировали в сравнении с маркером молекулярных масс в агарозном геле посредством гель-электрофореза. Для генотипирования HDV-ампликоны выделяли из агарозного геля с использованием набора QIAquick® Gel Extraction Kit («Qiagen», Германия) и проводили секвенирование по Сэнгеру с применением автоматизированного генетического анализатора ABI 3500 («ABI», США) с набором реагентов Big Dye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя. Генотип устанавливали с использованием филогенетического дерева согласно классификации Международного комитета по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) 2019 г. Для его построения применяли метод ML (maximum likelihood, максимальное правдоподобие), реализованный в пакете PhyML 3.0 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>). Оптимальный образец был выбран с помощью jModelTest2 (<http://jmodeltest.org/>): модель нуклеотидной эволюции – HKY85, эвристика для поиска в пространстве деревьев – NNI (nearest-neighbor-interchange, обмен ближайшими соседями), оценка качества филогенетического дерева – SH-aLRT-анализ. Визуализация полученного дерева осуществлялась посредством программного обеспечения FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Материалы исследования были подвергнуты статистической обработке с применением методов параметрического и непараметрического анализа. Накопление и систематизацию исходной информации, а также визуа-

лизацию полученных результатов осуществляли в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2016. Окончательный анализ проводили в стандартной программе Excel 2010 и программе статистической обработки данных GraphPad Prism 4. Обработка включала выявление достоверности различий средних значений параметров в сравниваемых группах с использованием критериев Фишера и Стьюдента (различия оценивались как достоверные при вероятности 95% –  $p < 0,05$ ).

### Результаты

Все включённые в исследование были инфицированы HDV одного генотипа и положительны по РНК этого возбудителя на протяжении всего периода наблюдения. В табл. 1 представлены результаты демографических и клинико-биохимических исследований, а также мониторинга ДНК HBV в 3 группах пациентов.

Средний возраст участников на момент включения в исследование составил во всех группах около 40 лет. Разница в соотношении мужчин и женщин была наиболее значительна во 2-й группе (1 : 3,5). Средняя продолжительность динамического наблюдения составила около 6 лет. В 1-й группе среднее количество лет от включения в исследование до формирования ЦП было равным  $3,65 \pm 2,3$  года, до летального исхода –  $4,5 \pm 3,0$  года. При этом данный показатель для мужчин и женщин не имел статистически значимых различий (4,57 и 4,43 года соответственно). За период наблюдения у 4 пациентов ЦП (класс С по Чайлд–Пью) привёл к развитию ГЦК и летальному исходу. Ещё 13 человек скончались от осложнений, связанных с декомпенсированным ЦП.

В табл. 2 приведены данные сравнительного анализа параметров, оказывающих возможное влияние на формирование различных исходов заболевания.

Статистически значимые межгрупповые различия по среднему возрасту на момент включения в исследование и гендерному соотношению не отмечены.

При сравнении показателей достоверно более высокие значения активности АСТ, ЩФ, ГГТП, уровня ОБ и скорости выполнения ТСЧ выявлены в 1-й группе по сравнению со 2-й; показатели же активности АЛТ в них значимо не различались. При сравнении групп с прогрессированием заболевания и медленно прогрессирующим ЦП (1-я и 3-я) не выявлено достоверных различий ни по одному из клинико-биохимических параметров. В то же время активность АЛТ, ГГТП, содержание ОБ и время ТСЧ были статистически значимо выше среди пациентов с медленно прогрессирующим ЦП (3-я группа) по сравнению со 2-й группой. Различия в показателях активности АСТ и ЩФ между этими группами не выявлены.

Положительный результат детекции ДНК HBV достоверно чаще зарегистрирован у больных с прогрессирующим течением заболевания и у пациентов с ХВГ по сравнению с имеющими медленно прогрессирующий ЦП. Не получено статистически значимых различий в частоте выявления этого маркера у участников 1-й и 2-й групп.

### Обсуждение

Результаты многоцентрового кросс-секционного исследования клинических и вирусологических

Таблица 1. Результаты демографических, клинико-биохимических и вирусологических исследований в 3 группах пациентов с различным течением хронического вирусного гепатита D

Table 1. Results of demographic, clinical, biochemical and virological studies in 3 groups of patients with different course of chronic viral hepatitis D

Параметр Parameter	Группа 1 Group 1 (n = 61)	Группа 2 Group 2 (n = 49)	Группа 3 Group 3 (n = 11)
Соотношение мужчины : женщины Male : female ratio	1 : 1,8	1 : 3,5	1 : 2,7
Средний возраст, лет Average age, years	41,1 ± 7,9	37,9 ± 9,3	39,8 ± 6,1
Средняя продолжительность наблюдения ± SD, лет Average duration of follow-up ± SD, years	6,13 ± 2,6	6,55 ± 2,59	4,18 ± 2,63
АЛТ ± SD (МЕ/л) ALT/GPT ± SD (IU/l)	149,1 ± 4,4	122,0 ± 7,4	158,1 ± 52,1
АСТ ± SD (МЕ/л) AST/GOT ± SD (IU/l)	138,5 ± 35,7	88,9 ± 19,8	115,9 ± 26,9
Билирубин общий ± SD (мкмоль/л) Total bilirubin (µmol/l) ± SD	43,4 ± 14,03	25,6 ± 4,66	37,6 ± 12,54
ЩФ ± SD (МЕ/л) ALP ± SD (IU/l)	619,0 ± 97,4	444,01 ± 57,6	461,0 ± 69,7
ГГТП ± SD (МЕ/л) GGT ± SD (IU/l)	58,9 ± 39,3	25,7 ± 10,7	71,2 ± 34,1
Тест связи чисел (ТСЧ), с Number connection test (NCT), sec	86,4 ± 28,96	66,9 ± 15,7	83,1 ± 26,5
ДНК HBV, 1-кратное выявление в динамическом наблюдении, n/N (%) HBV DNA, single detection in dynamic monitoring, n/N (%)	19/61 (31,2)	19/49 (38,8)	2/11 (18,2)
ДНК HBV, выявление ≥2 раз в динамическом наблюдении, n/N (%) HBV DNA, detection of ≥2 times in the dynamic monitoring, n/N (%)	12/61 (19,7)	10/49 (20,4)	0/11 (0)

особенностей ХВГ D, проведённого Международной сетью по борьбе с этим заболеванием (Hepatitis Delta International Network, HDIN) на самой большой на сегодняшний день выборке пациентов (более 1500 человек из 19 центров в 15 странах, расположенных на 4 континентах), подтвердили особую значимость болезни и подчеркнули выраженную гетерогенность особенностей течения HDV-инфекции в различных регионах мира [6]. В исследовательский протокол не вошли пациенты из РФ.

В настоящем исследовании приведены многолетние сравнительные данные по изучению факторов, определяющих течение и исходы хронической HDV-инфекции у жителей гиперэндемичного региона (РТ). Представленные результаты получены на относительно однородной выборке пациентов, принадлежащих к одной этнической группе и инфицированных возбудителем одинакового генотипа.

К настоящему времени описано 8 генотипов HDV [14], которые, возможно, связаны с различным клиническим течением данной инфекции. Самый распространённый из них – генотип 1, ответственный за большинство случаев ХВГ D в Европе, Северной Америке и Азии, ассоциирован с наиболее тяжёлым поражением печени [15–17]. Нужно отметить, что в последнее время описано преобладание генотипа 2 в некоторых азиатских регионах; в частности, во Вьетнаме этот показатель достигает 80% [18, 19].

Wranke A. с соавт. на основании анализа различных клинических проявлений ХВГ D у пациентов из Европы и Азии, инфицированных в основном HDV генотипа 1, предположили, что генетические или эколо-

гические факторы способствуют различным исходам заболевания [6].

Ранее нами впервые установлена значительная распространённость HDV-инфекции среди населения РТ, выделены наиболее поражаемые возрастные группы (20–29, 30–39 и 40–49 лет) и показана циркуляция на данной территории только вируса генотипа 1 [12, 20, 21].

На сегодняшний день не существует методов специфической профилактики ХВГ D, однако вакцина против гепатита В защищает от инфицирования обоими агентами. Средний возраст пациентов в нашей работе составил около 40 лет без достоверных межгрупповых различий. Этот факт ещё раз свидетельствует о том, что инфицированию HDV в рассматриваемом эндемичном регионе в основном подвержены не прошедшие курс вакцинации от гепатита В, начатой здесь ещё в 1997 г. [12, 22].

Известно, что HBV и вирус гепатита С (HCV) выступают основными факторами риска ГЦК. HDV также рассматривается как причина возникновения рака печени, при этом механизм его развития реализуется через индукцию воспаления и прогрессию до ЦП [23]. В нашем исследовании формирование последнего у пациентов с прогрессированием заболевания происходило в среднем за  $3,65 \pm 2,3$  года, а летальный исход наступал через  $4,5 \pm 3,0$  года после включения в исследование. Такая быстрая прогрессия до летального исхода, по-видимому, является причиной низкой частоты ГЦК в данной когорте (6,6%; 4 случая среди 61 участника). Частота развития ЦП и декомпенсации функции печени среди исследуемых составила 50,4% (61/121 – 1-я

**Таблица 2. Сравнительный анализ параметров, влияющих на формирование различных исходов хронического вирусного гепатита D**  
**Table 2. Comparative analysis of parameters that influence the formation of different outcomes of chronic viral hepatitis D**

Параметр	Группа 1 : Группа 2 Group 1 : Group 2	Группа 1 : Группа 3 Group 1 : Group 3	Группа 2 : Группа 3 Group 2 : Group 3
Соотношение мужчины : женщины Male : female ratio	$\varphi^*_{эмп} = 1,579$	$\varphi^*_{эмп} = 0,577$	$\varphi^*_{эмп} = 0,342$
Средний возраст, лет Average age, years	$t_{эмп} = 1,5$	$t_{эмп} = 0,4$	$t_{эмп} = 0,5$
АЛТ ± SD (МЕ/л) ALT/GPT ± SD (IU/l)	$t_{эмп} = 1,98$	$t_{эмп} = 0,5$	$t_{эмп} = 2,7^{\dagger}$
АСТ ± SD (МЕ/л) AST/GOT ± SD (IU/l)	$t_{эмп} = 3,8^{\dagger}$	$t_{эмп} = 1,8$	$t_{эмп} = 0,7$
Билирубин общий ± SD (мкмоль/л) Total bilirubin ± SD (μmol/l)	$t_{эмп} = 4,8^{\dagger}$	$t_{эмп} = 0,8$	$t_{эмп} = 3,3^{\dagger}$
ЩФ ± SD (МЕ/л) ALP ± SD (IU/l)	$t_{эмп} = 5,2^{\dagger}$	$t_{эмп} = 2,3$	$t_{эмп} = 0,9$
ГГТП ± SD (МЕ/л) GGT ± SD (IU/l)	$t_{эмп} = 4,3^{\dagger}$	$t_{эмп} = 0,8$	$t_{эмп} = 6,1^{\dagger}$
Тест связи чисел (ТЧЧ), с Number connection test (NCT), sec	$t_{эмп} = 4,1^{\dagger}$	$t_{эмп} = 0,4$	$t_{эмп} = 2,7^{\dagger}$
ДНК HBV DNA HBV	$\varphi^*_{эмп} = 0,722$	$\varphi^*_{эмп} = 2,718^{\dagger}$	$\varphi^*_{эмп} = 3,06^{\dagger}$

**Примечание.** Критерий  $\varphi^*$  – угловое преобразование Фишера.

Критерий  $t_{эмп}$  – величина вычисленного эмпирического критерия, который необходимо сравнивать с критическим (критерий Стьюдента).

$^{\dagger}$  – значение  $p \leq 0,05$ .

**Note.** Criterion  $\varphi^*$  – Fisher’s angular transformation.

$t_{эмп}$  criterion – the value of the calculated empirical criterion which must be compared with the critical one (Student’s criterion).

$^{\dagger}$  – value  $p \leq 0,05$ .

группа), что соответствует наблюдениям, проведённым в других регионах мира, где циркулирует HDV генотипа 1 [24–29]. В то же время, по данным Niro G.A. с соавт., результаты ретроспективного наблюдения 188 пациентов с ХВГ D из Италии продемонстрировали гораздо меньший показатель прогрессирования ЦП в декомпенсированный процесс (33% за 10 лет наблюдения) и более высокую частоту возникновения ГЦК (13%) [30].

Необходимо отметить, что у больных с моноинфекцией HBV развитие ГЦК в 70–90% случаев происходит на стадии ЦП. В масштабном проспективном когортном исследовании, проведённом на Тайване с участием 3653 HBV-инфицированных пациентов, показано, что высокая концентрация ДНК HBV ( $\geq 5$  lg копий/мл) в сыворотке является независимым фактором риска ГЦК [31].

При коинфекции HDV и HBV часто происходит подавление репликации последнего, поэтому в крови у имеющих ХВГ D могут быть очень низкие (вплоть до недетектируемых) уровни ДНК этого возбудителя [32]. В нашем исследовании проведён качественный анализ ДНК HBV в сравниваемых группах и не выявлено достоверных различий в частоте положительных результатов среди лиц с прогрессирующей формой заболевания и пациентов с непрогрессирующим ХВГ D. Однако необходимо отметить, что у страдавших медленно прогрессирующим ЦП достоверно чаще отсутствовали детектируемые уровни ДНК HBV.

По данным наблюдений HDIN повышение показателя АЛТ (свыше 3 норм), указывающее на высокую биохимическую активность заболевания, зарегистрировано лишь у незначительного числа участников. При этом пациенты из стран Восточной Европы имеют более высокие значения активности АСТ и АЛТ, указывающие на повышенный воспалительный статус [6]. В настоящее время причины этого феномена неясны, однако предположительно могут иметь значение факторы окружающей среды и одновременное злоупотребление наркотическими препаратами или алкоголем; возможна также роль генетических механизмов.

В нашей работе высокие значения активности АЛТ (свыше 3 норм) зарегистрированы в группах пациентов с прогрессией заболевания печени и с медленно прогрессирующим ЦП, однако статистически значимое отличие показателей АЛТ при сравнении с группой больных с непрогрессирующим ХВГ D отмечено только для группы пациентов с медленно прогрессирующим ЦП. В отличие от АЛТ аналогичный параметр для АСТ в группе с прогрессирующей формой заболевания (1-я группа) имел существенно более высокие величины у участников 2-й и 3-й групп.

S. Wu с соавт. отмечали, что уровни АСТ значимо выше у HDV-положительных лиц по сравнению с инфицированными только HBV ( $p < 0,05$ ) [33]. Однако необходимо отметить значительно более высокие показатели активности специфичных для ткани печени энзимов у жителей Китая с наличием HDV-инфекции, представленные в этой работе:  $1485,65 \pm 935,53$  МЕ/л

для АЛТ и  $977,56 \pm 939,71$  – для АСТ, что превышает полученные среди пациентов РТ значения практически на порядок.

Представляется важным отметить статистически значимо более высокие показатели активности ЩФ, ГГТП и содержания ОБ при прогрессирующем течении заболевания. Это дополнительно подтверждает, что HDV-инфекция запускает механизм гепатоканцерогенеза опосредованно через активацию печёночно-го воспаления и формирования ЦП [34].

ПЭ относится к распространённым осложнениям ЦП; от 10 до 14% страдающих им пациентов имеют явную энцефалопатию на момент первичной диагностики заболевания печени [35]. У людей с декомпенсированным ЦП распространённость явной ПЭ составляет 20–30% [36, 37]. К сожалению, до настоящего времени не существует «золотого стандарта» диагностики этого состояния. Вместе с тем имеется ряд отдельных методик для оценки различных аспектов функционирования ЦНС, которые могут использоваться как по отдельности, так и в комбинации [38–40]. Доступные рекомендации в определённой степени носят ограниченный характер и различают тестирование в клинических и исследовательских целях [41]. Полученные в данном исследовании результаты убедительно демонстрируют целесообразность применения теста ТСЧ для дополнительной оценки клинического статуса. Статистически значимые различия в скорости его выполнения конкретным пациентом при динамическом наблюдении свидетельствуют о прогрессии заболевания, нарастании выраженности ПЭ, что может быть использовано в качестве показателя неблагоприятного течения процесса.

К предикторам неблагоприятного исхода ХВГ D относится также позднее обращение за медицинской помощью. Так, Braga W.S.M. с соавт. показали, что больные с HDV-инфекцией в Южной Америке зачастую имели далеко зашедшие стадии заболевания печени при первом подобном обращении [42]. Полученные нами ранее данные свидетельствуют о том, что более 80% пациентов, проживающих на территории РТ, при первом обращении в лечебно-профилактическое учреждение уже имели продвинутые стадии заболевания, в том числе и ЦП класса С по Чайлд–Пью [5].

Темпы прогрессирования хронической моноинфекции HBV до стадии выраженного фиброза, ЦП и ГЦК зависят от множества факторов: спектра вирусных маркёров, состояния иммунной системы, возраста, пола, генетической предрасположенности пациента и т.д. [8, 43]. Ранее отмечены также особые условия, которые, вероятно, способствуют быстрому течению ХВГ D и формированию ЦП – невысокий социальный уровень населения и злоупотребление алкоголем [13]. Очевидно, что в этих регионах, где имеются удалённые и труднодоступные районы, получить своевременную медицинскую помощь не всегда возможно. Необходимо обратить более пристальное внимание на проблему изучения распространённости HDV на таких территориях ввиду высокой вероятности наличия значительно

большого числа инфицированных и, соответственно, неверной трактовки данных заболеваемости.

Серьёзным препятствием для сдерживания распространения ХВГ D, поражающего в РТ главным образом людей трудоспособного возраста, является отсутствие регистрации этой инфекции. В настоящее время все случаи гепатита D в РФ учитываются в статистике по гепатиту В, что маскирует реальную заболеваемость населения, бремя рассматриваемой патологии и её влияние на систему здравоохранения.

### Заключение

Полученные в относительно однородной когорте пациентов результаты показали, что возраст и пол не являются факторами, влияющими на прогрессирование ХВГ D в ЦП, а отсутствие детектируемой ДНК HBV связано с медленным прогрессированием последнего. Выявленные различия клинико-биохимических показателей отражают степень функционального поражения печени при HDV-ассоциированных ХВГ и ЦП. В эндемичном регионе РФ (РТ) хроническая HDV-инфекция имеет 3 различные формы течения – быстрое прогрессирование в ЦП с частыми летальными исходами, непрогрессирующий в ЦП ХГ и медленно прогрессирующий ЦП класса А по Чайлд–Пью.

Дальнейшие исследования, направленные на изучение роли вирусной нагрузки HDV и концентрации HBsAg, а также влияющих на прогрессирование HDV-инфекции генетических характеристик вируса и макроорганизма позволят с большей точностью определить механизмы патогенеза этого заболевания.

### ЛИТЕРАТУРА

- Rizzetto M. Hepatitis D: thirty years after. *J. Hepatol.* 2009; 50(5): 1043–50. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.01.004>.
- Rizzetto M. Hepatitis D virus: introduction and epidemiology. In: Seeger C., Locarnini S., eds. *The Hepatitis B and Delta Viruses*. Cold Spring Harbor perspectives in Medicine. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015: 305–13.
- Sureau C., Negro F. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J. Hepatol.* 2016; 64(Suppl. 1): S102–16. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.013>.
- Alfaiate D., Deny P., Durantel D. Hepatitis delta virus: from biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options. *Antivir. Res.* 2015; 122: 112–29. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.08.009>.
- Ильченко Л.Ю., Кожанова Т.В., Сарыглар А.А., Сонам-Байыр Я.Н., Сарыг-Хаа О.Н., Соян Р.М., и др. Клиническое течение и исходы хронической дельта-инфекции в эндемичном регионе. *Архивъ внутренней медицины.* 2012; (5): 51–6.
- Wranke A., Pinheiro Borzacov L.M., Parana R., Lobato C., Hamid S., Ceausu E., et al. Clinical and virological heterogeneity of hepatitis delta in different regions world-wide: The Hepatitis Delta International Network (HDIN). *Liver Int.* 2018; 38(5): 842–50. <https://doi.org/10.1111/liv.13604>.
- Stockdale A.J., Kreuels B., Henrion M.R.Y., Giorgi E., Kyomuhangi I., Geretti A.M. Hepatitis D prevalence: problems with extrapolation to global population estimates. *Gut.* 2020; 69(2): 396–7. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317874>.
- Chen H.Y., Shen D.T., Ji D.Z., Han P.C., Zhang W.M., Ma J.F., et al. Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Gut.* 2019; 68(3): 512–21. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316601>.
- Kozhanova T., Klushkina V., Il'chenko L. Prevalence of hepatitis delta markers in general population of Russian Federation. In: *14<sup>th</sup>*

*International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease*. Shanghai: 2012: 126–7.

- Слепцова С.С. *Вирусные гепатиты в Республике Саха (Якутия) и их роль в развитии первичного рака печени*: Автореф. дисс. ... д-ра мед. наук. СПб.: 2013 (in Russian).
- Chen X., Oidovsambuu O., Liu P., Grosely R., Elazar M., Winn V.D., et al. A novel quantitative microarray antibody capture assay identifies an extremely high hepatitis delta virus prevalence among hepatitis B virus-infected mongolians. *Hepatology.* 2017; 66(6): 1739–49. <https://doi.org/10.1002/hep.28957>.
- Исаева О.В., Ильченко Л.Ю., Кожанова Т.В., Клушкина В.В., Сарыглар А.А., Шукри А.Ш., и др. Влияние вакцинации против гепатита В на распространенность гепатита дельта в эндемичном регионе. *Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение.* 2019; 8(2): 36–42.
- Ильченко Л.Ю., Кожанова Т.В., Кюрегян К.К., Сарыглар А.А., Сарыг-Хаа О.Н., Сонам-Байыр Я.Д., и др. Развитие гепатоцеллюлярной карциномы в исходе хронической дельта-инфекции. *Архивъ внутренней медицины.* 2014; (4): 57–63.
- Hughes S.A., Wedemeyer H., Harrison P.M. Hepatitis delta virus. *Lancet.* 2011; 378(9785): 73–85. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)61931-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)61931-9).
- Su C.W., Huang Y.H., Huo T.I., Shih H.H., Sheen I.J., Chen S.W., et al. Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients. *Gastroenterology.* 2006; 130(6): 1625–35. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.01.035>.
- Farci P., Niro G.A. Clinical features of hepatitis D. *Semin. Liver Dis.* 2012; 32(3): 228–36. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1323628>.
- Moatter T., Abbas Z., Shabir S., Jafri W. Clinical presentation and genotype of hepatitis delta in Karachi. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13(18): 2604–7. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i18.2604>.
- Shanshan Wu, Yi Zhang, Yuyan Tang, Yao T., Lv M., Tang Z., et al. Molecular epidemiology and clinical characteristics of hepatitis delta virus (HDV) infected patients with elevated transaminases in Shanghai, China. *BMC Infect. Dis.* 2020; 20(1): 565. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05275-1>.
- Nguyen H.M., Sy B.T., Trung N.T., Hoan N.X., Wedemeyer H., Velavan T.P., et al. Prevalence and genotype distribution of hepatitis delta virus among chronic hepatitis B carriers in Central Vietnam. *PLoS One.* 2017; 12(4): e0175304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175304>.
- Karlsen A. Phylogenetic analysis of hepatitis delta virus genotypes 1 and 2 in the Russian Federation. In: *APASL Single Topic Conference Delta Hepatitis. Abstract Book.* Baku: 2019: 12–3.
- Isaeva O. Current epidemiology of hepatitis delta in the Russian Federation. In: *APASL Single Topic Conference Delta Hepatitis. Abstract Book.* Baku: 2019: 36.
- Klushkina V.V., Kyuregyan K.K., Kozhanova T.V., Popova O.E., Dubrovina P.G., Isaeva O.V., et al. Impact of universal hepatitis B vaccination on prevalence, infection-associated morbidity and mortality, and circulation of immune escape variants in Russia. *PLoS One.* 2016; 11(6): E0157161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157161>.
- Kew M.C. Hepatitis viruses (other than hepatitis B and C viruses) as causes of hepatocellular carcinoma: an update. *J. Viral. Hepat.* 2013; 20(3): 149–57. <https://doi.org/10.1111/jvh.12043>.
- Dulger A.C., Suvak B., Gonullu H., Gonullu E., Gultepe B., Aydin İ., et al. High prevalence of chronic hepatitis D virus infection in Eastern Turkey: urbanization of the disease. *Arch. Med. Sci.* 2016; 12(2): 415–20. <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.52030>.
- Gheorghe L., Csiki I.E., Iacob S., Gheorghe C., Trifan A., Grigorescu M., et al. Hepatitis Delta virus infection in Romania: prevalence and risk factors. *J. Gastrointest. Liver Dis.* 2015; 24(4): 413–21. <https://doi.org/10.15403/jgld.2014.1121.244.dtv>.
- Manesis E.K., Vourli G., Dalekos G., Vasiliadis T., Manolaki N., Hounta S., et al. Prevalence and clinical course of hepatitis delta infection in Greece: A 13-year prospective study. *J. Hepatol.* 2013; 59(5): 949–56. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.07.005>.
- Buti M., Homs M., Rodriguez-Frias F., Funalleras G., Jardí R., Sauleda S., et al. Clinical outcome of acute and chronic hepatitis delta over time: a long-term follow-up study. *J. Viral Hepat.* 2011; 18(6): 434–42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2010.01324.x>.
- Calle Serrano B., Grosshennig A., Homs M., Heidrich B., Erhardt A., Detering K., et al. Development and evaluation of a baseline-event-anticipation score for hepatitis delta. *J. Viral Hepat.* 2014; 21(11): e154–63. <https://doi.org/10.1111/jvh.12251>.

29. Degertekin H., Yalcin K., Yakut M., Yurdaydin C. Seropositivity for delta hepatitis in patients with chronic hepatitis B and liver cirrhosis in Turkey: a meta-analysis. *Liver Int.* 2008; 28(4): 494–8. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2008.01673.x>.
30. Niro G.A., Smedile A., Ippolito A.M., Fontana R., Olivero A., Valvano M.R., et al. Outcome of chronic delta hepatitis in Italy: A longterm cohort study. *J. Hepatol.* 2010; 53(5): 834–40. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.06.008>.
31. Chen C.J., Yang H.I., Su J., Jen C.L., You S.L., Lu S.N., et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA.* 2006; 295(1): 65–73. <https://doi.org/10.1001/jama.295.1.65>.
32. Su C.W., Huang Y.H., Huo T.I., Shih H.H., Sheen I.J., Chen S.W., et al. Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients. *Gastroenterology.* 2006; 130(6): 1625–35. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.01.035>.
33. Wu S., Zhang Y., Tang Y., Yao T., Lv M., Tang Z., et al. Molecular epidemiology and clinical characteristics of hepatitis delta virus (HDV) infected patients with elevated transaminases in Shanghai, China. *BMC Infect. Dis.* 2020; 20(1): 565. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05275-1>.
34. Abbas Z., Qureshi M., Hamid S., Jafri W., et al. Hepatocellular carcinoma in hepatitis delta: Does it differ from hepatitis B monoinfection? *Saudi J. Gastroenterol.* 2012; 18(1): 18–22. <https://doi.org/10.4103/1319-3767.91731>.
35. Saunders J.B., Walters J.R., Davies A.P., Paton A. A 20-year prospective study of cirrhosis. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed.)* 1981; 282(6260): 263–66. <https://doi.org/10.1136/bmj.282.6260.263>.
36. Zipprich A., Garcia-Tsao G., Rogowski S., Fleig W.E., Seufferlein T., Dollinger M.M. Prognostic indicators of survival in patients with compensated and decompensated cirrhosis. *Liver Int.* 2012; 32(9): 1407–14. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2012.02830.x>.
37. Di Pascoli M., Ceranto E., De Nardi P., Donato D., Gatta A., Angeli P., et al. Hospitalizations due to cirrhosis: clinical aspects in a large cohort of Italian patients and cost analysis report. *Dig. Dis.* 2017; 35(5): 433–8. <https://doi.org/10.1159/000458722>.
38. Bajaj J.S., Córdoba J., Mullen K.D., Amodio P., Shawcross D.L., Butterworth R.F., et al. The design of clinical trials in hepatic encephalopathy – an International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN) consensus statement. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2011; 33(7): 739–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04590.x>.
39. Montagnese S., Amodio P., Morgan M.Y. Methods for diagnosing hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a multidimensional approach. *Metab. Brain Dis.* 2004; 19(3-4): 281–312. <https://doi.org/10.1023/b:mebr.0000043977.11113.2a>.
40. Morgan M.Y. Hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. In: Dooley J.S., Lok A.S.F., Garcia-Tsao G., Pinzani M., eds. *Sherlock's Diseases of the Liver and Biliary System*. Oxford: Wiley-Blackwell; 2018: 151–79.
41. Vilstrup H., Amodio P., Bajaj J., Córdoba J., Ferenci P., Mullen K.D., et al. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 practice guideline by the American association for the study of liver diseases and the European association for the study of the liver. *Hepatology.* 2014; 60(2): 715–35. <https://doi.org/10.1002/hep.27210>.
42. Braga W.S.M., de Oliveira C.M.C., de Araújo J.R., Castilho Mda C., Rocha J.M., Gimaque J.B., et al. Chronic HDV/HBV co-infection: Predictors of disease stage – a case series of HDV-3 patients. *J. Hepatol.* 2014; 61(6): 1205–11. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.05.041>.
43. Yang H.I., Lu S.N., Liaw Y.F., You S.L., Sun C.A., Wang L.Y., et al. Hepatitis B antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl. J. Med.* 2002; 347(3): 168–74. <https://doi.org/10.1056/nejmoa013215>.
4. Alfaiate D., Deny P., Durantel D. Hepatitis delta virus: from biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options. *Antivir. Res.* 2015; 122: 112–29. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.08.009>.
5. Il'chenko L.Yu., Kozhanova T.V., Saryglar A.A., Sonam-Bayyr Ya.N., Saryg-Khaa O.N., Soyam R.M., et al. Clinical course and outcomes of chronic Delta infection in an endemic region [Klinicheskoe techenie i iskhody khronicheskoy delta-infektsii v endemichnom regione]. *Arkhiv vnutrenney meditsiny.* 2012; (5): 51–6 (in Russian).
6. Wranke A., Pinheiro Borzacov L.M., Parana R., Lobato C., Hamid S., Ceausu E., et al. Clinical and virological heterogeneity of hepatitis delta in different regions world-wide: The Hepatitis Delta International Network (HDIN). *Liver Int.* 2018; 38(5): 842–50. <https://doi.org/10.1111/liv.13604>.
7. Stockdale A.J., Kreuels B., Henrion M.R.Y., Giorgi E., Kyomuhangi L., Geretti A.M. Hepatitis D prevalence: problems with extrapolation to global population estimates. *Gut.* 2020; 69(2): 396–7. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317874>.
8. Chen H.Y., Shen D.T., Ji D.Z., Han P.C., Zhang W.M., Ma J.F., et al. Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Gut.* 2019; 68(3): 512–21. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316601>.
9. Kozhanova T., Klushkina V., Il'chenko L. Prevalence of hepatitis delta markers in general population of Russian Federation. In: *14th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease*. Shanghai: 2012: 126–7.
10. Sleptsova S.S. *Viral hepatitis in the Republic of Sakha (Yakutia) and their role in the development of primary liver cancer [Virusnye gepatity v Respublike Sakha (Yakutiya) i ikh rol' v razvitiy pervichnogo raka pecheni]*. Diss. St. Petersburg: 2013 (in Russian).
11. Chen X., Oidovsambuu O., Liu P., Grosely R., Elazar M., Winn V.D., et al. A novel quantitative microarray antibody capture assay identifies an extremely high hepatitis delta virus prevalence among hepatitis B virus-infected mongolians. *Hepatology.* 2017; 66(6): 1739–49. <https://doi.org/10.1002/hep.28957>.
12. Isaeva O.V., Il'chenko L.Yu., Kozhanova T.V., Klushkina V.V., Saryglar A.A., Shukri A.Sh., et al. The impact of universal vaccination against hepatitis B on the prevalence of hepatitis D in endemic region [Vliyaniye vaksinatitsii protiv gepatita B na rasprostranennost' gepatita delta v endemichnom regione]. *Infektsionnye bolezni. Novosti. Mneniya. Obuchenie.* 2019; 8(2): 36–42 (in Russian).
13. Il'chenko L.Yu., Kozhanova T.V., Kyuregyan K.K., Saryglar A.A., Saryg-Khaa O.N., Sonam-Bayyr Ya.D., et al. Development of hepatocellular carcinoma in the outcome of chronic Delta infection [Razvitiye gepatotsellyulyarnoy kartsinomy v iskhode khronicheskoy delta-infektsii]. *Arkhiv vnutrenney meditsiny.* 2014; (4): 57–63 (in Russian).
14. Hughes S.A., Wedemeyer H., Harrison P.M. Hepatitis delta virus. *Lancet.* 2011; 378(9785): 73–85. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)61931-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)61931-9).
15. Su C.W., Huang Y.H., Huo T.I., Shih H.H., Sheen I.J., Chen S.W., et al. Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients. *Gastroenterology.* 2006; 130(6): 1625–35. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.01.035>.
16. Farci P., Niro G.A. Clinical features of hepatitis D. *Semin. Liver Dis.* 2012; 32(3): 228–36. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1323628>.
17. Moatter T., Abbas Z., Shabir S., Jafri W. Clinical presentation and genotype of hepatitis delta in Karachi. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13(18): 2604–7. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i18.2604>.
18. Shanshan Wu, Yi Zhang, Yuyan Tang, Yao T., Lv M., Tang Z., et al. Molecular epidemiology and clinical characteristics of hepatitis delta virus (HDV) infected patients with elevated transaminases in Shanghai, China. *BMC Infect. Dis.* 2020; 20(1): 565. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05275-1>.
19. Nguyen H.M., Sy B.T., Trung N.T., Hoan N.X., Wedemeyer H., Velavan T.P., et al. Prevalence and genotype distribution of hepatitis delta virus among chronic hepatitis B carriers in Central Vietnam. *PLoS One.* 2017; 12(4): e0175304. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175304>.
20. Karlsen A. Phylodynamic analysis of hepatitis delta virus genotypes 1 and 2 in the Russian Federation. In: *APASL Single Topic Conference Delta Hepatitis. Abstract Book*. Baku: 2019: 12–3.
21. Isaeva O. Current epidemiology of hepatitis delta in the Russian Federation. In: *APASL Single Topic Conference Delta Hepatitis. Abstract Book*. Baku: 2019: 36.

## REFERENCES

1. Rizzetto M. Hepatitis D: thirty years after. *J. Hepatol.* 2009; 50(5): 1043–50. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.01.004>.
2. Rizzetto M. Hepatitis D virus: introduction and epidemiology. In: Seeger C., Locarnini S., eds. *The Hepatitis B and Delta Viruses*. Cold Spring Harbor perspectives in Medicine. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015: 305–13.
3. Sureau C., Negro F. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis. *J. Hepatol.* 2016; 64(Suppl. 1): S102–16. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.013>.

22. Klushkina V.V., Kyuregyan K.K., Kozhanova T.V., Popova O.E., Dubrovina P.G., Isaeva O.V., et al. Impact of universal hepatitis B vaccination on prevalence, infection-associated morbidity and mortality, and circulation of immune escape variants in Russia. *PLoS One*. 2016; 11(6): E0157161. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157161>.
23. Kew M.C. Hepatitis viruses (other than hepatitis B and C viruses) as causes of hepatocellular carcinoma: an update. *J Viral Hepat*. 2013; 20(3): 149–57. <https://doi.org/10.1111/jvh.12043>.
24. Dulger A.C., Suvak B., Gonullu H., Gonullu E., Gultepe B., Aydin İ., et al. High prevalence of chronic hepatitis D virus infection in Eastern Turkey: urbanization of the disease. *Arch. Med. Sci*. 2016; 12(2): 415–20. <https://doi.org/10.5114/aoms.2015.52030>.
25. Gheorghe L., Csiki I.E., Iacob S., Gheorghe C., Trifan A., Grigorescu M., et al. Hepatitis Delta virus infection in Romania: prevalence and risk factors. *J. Gastrointestin. Liver Dis*. 2015; 24(4): 413–21. <https://doi.org/10.15403/jgld.2014.1121.244.dtv>.
26. Manesis E.K., Vourli G., Dalekos G., Vasiliadis T., Manolaki N., Hounta A., et al. Prevalence and clinical course of hepatitis delta infection in Greece: A 13-year prospective study. *J. Hepatol*. 2013; 59(5): 949–56. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.07.005>.
27. Buti M., Homs M., Rodriguez-Frias F., Funalleras G., Jardí R., Sauleda S., et al. Clinical outcome of acute and chronic hepatitis delta over time: a long-term follow-up study. *J. Viral Hepat*. 2011; 18(6): 434–42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2010.01324.x>.
28. Calle Serrano B., Grosshennig A., Homs M., Heidrich B., Erhardt A., Deterding K., et al. Development and evaluation of a baseline-event-anticipation score for hepatitis delta. *J. Viral Hepat*. 2014; 21(11): e154–63. <https://doi.org/10.1111/jvh.12251>.
29. Degertekin H., Yalcin K., Yakut M., Yurdaydin C. Seropositivity for delta hepatitis in patients with chronic hepatitis B and liver cirrhosis in Turkey: a meta-analysis. *Liver Int*. 2008; 28(4): 494–8. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2008.01673.x>.
30. Niro G.A., Smedile A., Ippolito A.M., Fontana R., Olivero A., Valvano M.R., et al. Outcome of chronic delta hepatitis in Italy: A longterm cohort study. *J. Hepatol*. 2010; 53(5): 834–40. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.06.008>.
31. Chen C.J., Yang H.I., Su J., Jen C.L., You S.L., Lu S.N., et al. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA*. 2006; 295(1): 65–73. <https://doi.org/10.1001/jama.295.1.65>.
32. Su C.W., Huang Y.H., Huo T.I., Shih H.H., Sheen I.J., Chen S.W., et al. Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients. *Gastroenterology*. 2006; 130(6): 1625–35. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.01.035>.
33. Wu S., Zhang Y., Tang Y., Yao T., Lv M., Tang Z., et al. Molecular epidemiology and clinical characteristics of hepatitis delta virus (HDV) infected patients with elevated transaminases in Shanghai, China. *BMC Infect. Dis*. 2020; 20(1): 565. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05275-1>.
34. Abbaz Z., Qureshi M., Hamid S., Jafri W., et al. Hepatocellular carcinoma in hepatitis delta: Does it differ from hepatitis B mono-infection? *Saudi J. Gastroenterol*. 2012; 18(1): 18–22. <https://doi.org/10.4103/1319-3767.91731>.
35. Saunders J.B., Walters J.R., Davies A.P., Paton A. A 20-year prospective study of cirrhosis. *Br. Med. J. (Clin. Res. Ed)*. 1981; 282(6260): 263–66. <https://doi.org/10.1136/bmj.282.6260.263>.
36. Zipprich A., Garcia-Tsao G., Rogowski S., Fleig W.E., Seufferlein T., Dollinger M.M. Prognostic indicators of survival in patients with compensated and decompensated cirrhosis. *Liver Int*. 2012; 32(9): 1407–14. <https://doi.org/10.1111/j.1478-3231.2012.02830.x>.
37. Di Pascoli M., Ceranto E., De Nardi P., Donato D., Gatta A., Angeli P., et al. Hospitalizations due to cirrhosis: clinical aspects in a large cohort of Italian patients and cost analysis report. *Dig. Dis*. 2017; 35(5): 433–8. <https://doi.org/10.1159/000458722>.
38. Bajaj J.S., Córdoba J., Mullen K.D., Amodio P., Shewcross D.L., Butterworth R.F., et al. The design of clinical trials in hepatic encephalopathy – an International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN) consensus statement. *Aliment. Pharmacol. Ther*. 2011; 33(7): 739–47. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2011.04590.x>.
39. Montagnese S., Amodio P., Morgan M.Y. Methods for diagnosing hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a multidimensional approach. *Metab. Brain Dis*. 2004; 19(3–4): 281–312. <https://doi.org/10.1023/b:mebr.0000043977.11113.2a>.
40. Morgan M.Y. Hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. In: Dooley J.S., Lok A.S.F., Garcia-Tsao G., Pinzani M., eds. *Sherlock's Diseases of the Liver and Biliary System*. Oxford: Wiley-Blackwell; 2018: 151–79.
41. Vilstrup H., Amodio P., Bajaj J., Cordoba J., Ferenci P., Mullen K.D., et al. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 practice guideline by the American association for the study of liver diseases and the European association for the study of the liver. *Hepatology*. 2014; 60(2): 715–35. <https://doi.org/10.1002/hep.27210>.
42. Braga W.S.M., de Oliveira C.M.C., de Araújo J.R., Castilho Mda C., Rocha J.M., Gimaque J.B., et al. Chronic HDV/HBV co-infection: Predictors of disease stage – a case series of HDV-3 patients. *J. Hepatol*. 2014; 61(6): 1205–11. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.05.041>.
43. Yang H.I., Lu S.N., Liaw Y.F., You S.L., Sun C.A., Wang L.Y., et al. Hepatitis B antigen and the risk of hepatocellular carcinoma. *N Engl. J. Med*. 2002; 347(3): 168–74. <https://doi.org/10.1056/nejmoa013215>.

## РЕЦЕНЗИИ



**Рецензия на монографию «Генетические технологии»  
под общей редакцией академика РАН,  
д.м.н., проф. В.Г. Акимкина  
(М.: ЦНИИ Эпидемиологии, 2020)**



Генетические технологии и направленное геномное редактирование с использованием программируемых нуклеаз за короткое время заняли передовые позиции в области модификации генома. Направленное редактирование генома, которое в настоящее время активно применяется для создания клеточных и животных моделей патологии человека, функционального скрининга геномов и эпигеномов, визуализации клеточных процессов, представляет особый интерес с точки зрения разработки терапевтических подходов для лечения генетических, инфекционных, онкологических, иммунологических заболеваний и заболеваний иной этиологии, которые ранее считались неизлечимыми. Сегодня программируемые нуклеазы широко применяются в пищевой промышленности и сельском хозяйстве, а белки системы CRISPR/CAS рассматриваются в качестве инструмента для создания инновационных диагно-

стических наборов «нового поколения». В связи с этим актуальность монографии «Генетические технологии» не вызывает сомнений.

В книге авторы постарались осветить широкий спектр вопросов в сфере генетических технологий, касающихся направленного редактирования генома. Так, представлена актуальная информация по программируемым нуклеазам – с «цинковыми пальцами», TALE- и CRISPR/Cas-нуклеазам. Обобщена информация по истории открытия, строению и области применения программируемых нуклеаз. Систематизирована информация по способам оценки неспецифической (внецелевой) активности программируемых нуклеаз, используемых для направленного геномного редактирования. Кроме того, монография знакомит читателя с многообразием существующих животных моделей, которые применяются для изучения эффективности генной терапии и скрининга лекарственных препаратов, в том числе разработанных на основе технологий направленного редактирования генома.

Важно отметить, что книга «Генетические технологии» может стать хорошим методическим пособием для студентов биологических и медицинских вузов, а также молодых учёных. Можно надеяться, что данная монография позволит научным сотрудникам, руководителям организаций и специалистам прикладных направлений здравоохранения, студентам и аспирантам систематизировать знания, накопленные в стремительно развивающейся области генетических технологий и направленного редактирования генома, сформировать её понимание.

*В.В. Малеев, доктор медицинских наук,  
профессор, академик РАМН и РАН*