

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.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 30.04.2021.  
Формат 60×90<sup>1/8</sup>.

Тираж 50 экз.

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.

2

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)

**Глугов 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<sup>1/8</sup>. 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

2

Volume 66 • 2021

## EDITORIAL BOARD

**Editor-in-Chief: LVOV D.K., RAS Full Member,  
Professor, Dr. Sci. (Biology)**

Assistant editors in chief: **Grebennikova T.V.**, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology)

Executive secretary: **Alkhovskiy S.V.**, Dr. Sci. (Biology)

Scientific editor: **Zaberezhnyy A.D.**, RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology)

## 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

- Попова О., Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Зрелкин Д.И., Воронина Д.В., Должикова И.В., Щепляков Д.В., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л.**  
Обзор кандидатных вакцин для профилактики лихорадки Ласса . . . . . 91
- Петрова Н.В., Ганина К.К., Тарасов С.А.**  
Изучение чувствительности лабораторных животных к вирусу SARS-CoV-2  
(*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) . . . . . 103
- Леншин С.В., Ромашин А.В., Вышемирский О.И., Львов Д.К., Альховский С.В.**  
Летучие мыши субтропической зоны Краснодарского края России как возможный резервуар зоонозных вирусных инфекций. . . . . 112

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Логинова С.Я., Щукина В.Н., Савенко С.В., Борисевич С.В.**  
Активность человеческого рекомбинантного интерферона альфа-2b *in vitro*  
в отношении вируса SARS-CoV-2. . . . . 123
- Крынский С.А., Малашенкова И.К., Огурцов Д.П., Хайлов Н.А., Чекулаева Е.И., Шипулина О.Ю., Пономарёва Е.В., Гаврилова С.И., Дидковский Н.А., Величковский Б.М.**  
Герпесвирусные инфекции и иммунологические нарушения при различных стадиях когнитивных расстройств альцгеймеровского типа\*. . . . . 129
- Сашина Т.А., Морозова О.В., Епифанова Н.В., Кашников А.Ю., Леонов А.В., Новикова Н.А.**  
Молекулярный мониторинг ротавирусов (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*), циркулирующих в Нижнем Новгороде (2012–2020 гг.): обнаружение штаммов с новыми генетическими характеристиками . . . . . 140
- Соломай Т.В., Семененко Т.А., Филатов Н.Н., Ведунова С.Л., Лавров В.Ф., Смирнова Д.И., Грачёва А.В., Файзулов Е.Б.**  
Реактивация инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр (*Herpesviridae: Lymphocryptovirus, HHV-4*), на фоне COVID-19: эпидемиологические особенности . . . . . 152

## В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

- Никитина Н.В., Леонов И.К., Явдошак Л.И.**  
Интерферогенная активность штамма ВН-3 вируса гепатита уток типа I  
(*Picornaviridae: Avihepatovirus: Avihepatovirus A*) . . . . . 162

## CONTENTS

## REVIEWS

- Popova O., Zubkova O.V., Ozharovskaia T.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Naroditsky B.S., Logunov D.Y., Gintsburg A.L.**  
Review of candidate vaccines for the prevention of Lassa fever ..... 91
- Petrova N.V., Ganina K.K., Tarasov S.A.**  
Susceptibility of animal species to experimental SARS-CoV-2  
(*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) infection ..... 103
- Lenshin S.V., Romashin A.V., Vishemirsky O.I., Lvov D.K., Alkhovsky S.V.**  
Bats of the subtropical climate zone of the Krasnodar region of Russia as a possible reservoir  
of zoonotic viral infections ..... 112

## ORIGINAL RESEARCHES

- Loginova S.Ya., Shchukina V.N., Savenko S.V., Borisevich S.V.**  
*In vitro* activity of human recombinant alpha-2b interferon against SARS-CoV-2 virus ..... 123
- Krynskiy S.A., Malashenkova I.K., Ogurtsov D.P., Khailov N.A., Chekulaeva E.I., Shipulina O.Yu., Ponomareva E.V., Gavrilova S.I., Didkovsky N.A., Velichkovsky B.M.**  
Herpesvirus infections and immunological disturbances in patients with different stages of Alzheimer's disease\* .. 129
- Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Kashnikov A.U., Leonov A.V., Novikova N.A.**  
Molecular monitoring of the rotavirus A (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*) strains circulating  
in Nizhny Novgorod (2012–2020): detection of the strains with the new genetic features ..... 140
- Solomay T.V., Semenenko T.A., Filatov N.N., Vedunova S.L., Lavrov V.F., Smirnova D.I., Gracheva A.V., Faizuloev E.B.**  
Reactivation of Epstein–Barr virus (*Herpesviridae: Lymphocryptovirus*, HHV-4) infection during COVID-19:  
epidemiological features ..... 152

## TO HELP THE VIROLOGIST

- Nikitina N.V., Leonov I.K., Yavdoshak L.I.**  
Interferonogenic activity of the strain BH-3 duck hepatitis virus type I  
(*Picornaviridae: Avihepatovirus: Avihepatovirus A*) ..... 162

## ОБЗОРЫ



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

### Обзор кандидатных вакцин для профилактики лихорадки Ласса

Попова О., Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Зрелкин Д.И., Воронина Д.В., Должикова И.В., Щепляков Д.В., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л.

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

Вирус Ласса (ВЛ) является одним из основных этиологических факторов этиологическим фактором геморрагических лихорадок в мире: по оценкам ВОЗ им ежегодно поражаются от 100 до 300 тыс. человек, а связанная с ВЛ смертность составляет до 10 тыс. в год [1]. Несмотря на то что распространение вызываемого им заболевания – лихорадки Ласса (ЛЛ) – в основном ограничено западноафриканскими странами (Сьерра-Леоне, Либерия, Гвинея и Нигерия), исторически документированы завозные случаи в Европе, Соединённых Штатах Америки (США), Канаде, Японии и Израиле [2]. В 2017 г. ВОЗ включила ВЛ в список приоритетных патогенов, в отношении которых необходимы проведение ускоренных исследований, создание вакцинных препаратов, а также средств для терапии и диагностики инфекций, возбудителями которых они являются [3]. В данном обзоре рассмотрены основные технологические платформы, используемые при разработке вакцин против ЛЛ.

**Ключевые слова:** вирус Ласса, вакцины против лихорадки Ласса, рекомбинантные вирусные векторы

**Для цитирования:** Попова О.Д., Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Зрелкин Д.И., Воронина Д.В., Должикова И.В., Щепляков Д.В., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Обзор кандидатных вакцин для профилактики лихорадки Ласса. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(2): 91-102. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-33>

**Для корреспонденции:** Попова Ольга Дмитриевна, младший научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия.  
E-mail: [olga.popova31@yandex.ru](mailto:olga.popova31@yandex.ru)

**Участие авторов:** все авторы внесли равный вклад в подготовку публикации.

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

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

Поступила 02.12.2020  
Принята в печать 27.03.2021

### Review of candidate vaccines for the prevention of Lassa fever

Ol'ga Popova, Ol'ga V. Zubkova, Tatiana A. Ozharovskaia, Denis I. Zrelkin, Daria V. Voronina, Inna V. Dolzhikova, Dmitry V. Shcheblyakov, Boris S. Naroditsky, Denis Yu. Logunov, Aleksander L. Gintsburg

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

The Lassa virus one of the main etiological agent of hemorrhagic fevers in the world: according to WHO estimates, it affects 100,000 to 300,000 people annually, which results in up to 10,000 deaths [1]. Although expansion of Lassa fever caused by this pathogen is mostly limited to the West African countries: Sierra Leone, Liberia, Guinea and Nigeria, imported cases have been historically documented in Europe, the United States of America (USA), Canada, Japan, and Israel [2]. In 2017, WHO included the Lassa virus in the list of priority pathogens in need of accelerated research, development of vaccines, therapeutic agents and diagnostic tools regarding infections they cause [3]. This review describes main technological platforms used for the development of vaccines for the prevention of Lassa fever.

**Keywords:** Lassa virus, candidate vaccines, recombinant vaccines, recombinant viral vectors

**For citation:** Popova O.D, Zubkova O.V., Ozharovskaia T.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Naroditsky B.S., Logunov D.Yu., Gintsburg A.L. Review of candidate vaccines for the prevention of Lassa fever. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(2): 91-102 (In Russ.).  
DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-33>

**For correspondence:** Popova Ol'ga, Junior Researcher of the Laboratory of Immunobiotechnology, FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia. E-mail: [olga.popova31@yandex.ru](mailto:olga.popova31@yandex.ru)

**Information about the authors:**Popova O., <https://orcid.org/0000-0003-3248-1227>Zubkova O.V., <https://orcid.org/0000-0001-7893-8419>Ozharovskaia T.A., <https://orcid.org/0000-0001-7147-1553>Zrelkin D.I., <https://orcid.org/0000-0003-0899-8357>Voronina D.V., <https://orcid.org/0000-0001-6629-744X>Dolzhikova I.V., <https://orcid.org/0000-0003-2548-6142>Shcheblyakov D.V., <https://orcid.org/0000-0002-1289-3411>Naroditsky B.S., <https://orcid.org/0000-0001-5522-8238>Logunov D.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>Gintsburg A.L., <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>**Contribution:** all the authors have equally contributed to the writing of the article.**Acknowledgment.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 2 December 2020

Accepted 27 March 2021

## 1. Лихорадка Ласса

Заболевание, названное впоследствии лихорадкой Ласса (ЛЛ), было открыто в 1969 г., когда 2 американские медсестры-миссионерки умерли от загадочной болезни в г. Ласса на севере Нигерии. Когда заболела третья медсестра, её срочно эвакуировали в Нью-Йорк, где исследователям из Йельского университета удалось выделить новый вирус [4]. В настоящее время известно, что причиной лихорадки является переносимый грызунами аренавирус. Его естественный резервуар – многососковая мышь (*Mastomys natalensis*), грызун рода *Mastomys*, который повсеместно распространён в Западной Африке. Ранее считалось, что *M. natalensis* – единственный переносчик возбудителя, однако были обнаружены другие грызуны-резервуары: виды *M. erythroleucus* и *Hylomyscus pamfi* [5]. Инфицированные животные не проявляют явных признаков заболевания и, как считается, являются пожизненными носителями вируса [6].

Клинические проявления ЛЛ у людей могут быть разными – от бессимптомных до тяжёлых со скоротечной формой болезни. Считается, что у 80% инфицированных заболевание протекает легко, поэтому число диагностируемых случаев очень низкое и не отражает реальную эпидемиологическую опасность. ЛЛ начинается с неспецифических проявлений, характерных для большинства вирусных инфекций: гипертермии, слабости, недомогания и головной боли. Через несколько дней выраженность симптомов может усиливаться; появляются боли в горле, мышцах, груди, животе, рвота, диарея, кашель, артралгия. В 20% случаев заболевание протекает в тяжёлой форме. При этом возможны отёк лица, точечные кровоизлияния, дыхательная и почечная недостаточность, гепатит, эпилептиформные эпизоды, дезориентация, потеря сознания [7]. У ¼ пациентов наблюдаются кровотечения из слизистых оболочек полости рта, носа, влагалища и/или желудочно-кишечного тракта [8]. Как клинические, так и субклинические формы связаны с неврологическими последствиями, среди которых значительное место занимает нейросенсорная тугоухость. В 13,5% случаев развивается одно- или двусторонняя глухота, при этом 80% лиц с тугоухо-

стью из эндемичного региона имеют специфические антитела (АТ) к возбудителю [9]. ЛЛ во время беременности вызывает материнскую смертность более чем в 35% и потерю плода – в 64,5% случаев [10].

Летальность от болезни среди госпитализированных пациентов в ходе её вспышки в Нигерии на протяжении 2015–2016 гг. была равной 59,6% [11]. Согласно статистическому анализу данных за период с января 2011 по ноябрь 2015 г. (специализированная учебная больница Iguwa Specialist Teaching Hospital, Нигерия) этот показатель составляет 24% с повышением риска в 1,5 раза каждое десятилетие, достигая 40% для лиц старше 50 лет [7]. По оценкам Нигерийского центра по контролю над заболеваниями в ходе активной на данный момент вспышки летальность в 2020 г. составила 19,4 и 22,3% – в аналогичном периоде 2019 г. [12].

Обычно люди заражаются при прямом контакте с выделениями или кровью грызунов. Вторичный способ передачи вируса от человека к человеку реализуется при тесном контакте с инфицированным (лица, проживающие в тесных жилищах, ухаживающие за больным родственники). Нередкие случаи внутрибольничной передачи происходят через контакт с физиологическими жидкостями больных или инфицированными медицинскими инструментами. Вирус вызывает спонтанные выкидыши у беременных, что повышает риск возникновения вспышек в роддомах, поскольку источником инфекции могут быть как заражённые роженицы, так и абортивный материал [8].

## 2. Характеристика возбудителя лихорадки Ласса

### 2.1. Структура вириона и организация генома вируса Ласса

Возбудителем ЛЛ является вирус Ласса (ВЛ) – относящийся к группе вирусов Старого Света аренавирус рода *Mammarenavirus* семейства *Arenaviridae* [13]. Сферический вирион диаметром 70–150 нм состоит из нуклеокапсида, который окружён липидной оболочкой, покрытой шипиками из тримеров гликопротеина (**рисунок**). Вирус имеет линейный РНК-геном с амбисенс-стратегией кодирования, состоящий из 2 одноцепочечных сегментов – короткого *S* (~3,4

т.п.н.) и длинного *L* (~7,2 т.п.н.). Каждый из них имеет 2 разнонаправленные открытые рамки считывания: S-сегмент кодирует гены вирусного нуклеопротеина (белок NP с молекулярной массой (MW) 63 кДа) и его прекурсора (белок GPC, MW = 75 кДа), L-сегмент – гены РНК-зависимой РНК-полимеразы (L-белок, MW = 200 кДа) и цинк-связывающего матриксного протеина (Z-белок, MW = 11 кДа) [14]. Нуклеопротеин является основным структурным белком; он инкапсулирует цепи РНК, формируя рибонуклеопротеиновые комплексы. NP участвует в репликации и транскрипции вирусной нуклеиновой кислоты, сборке дочерних вирионов, а также используется для обхода механизмов врождённого иммунного ответа [15]. Z-белок формирует матриксную оболочку вириона, а РНК-полимераза (репликаза) обеспечивает транскрипцию и репликацию генома. Из 4 белков, кодируемых вирусной РНК, гликопротеин (GP) является единственной поверхностной белковой структурой. Он образуется в результате расщепления прегликопротеин-полипептидного комплекса (pre-glycoprotein polyprotein complex, GPC) клеточной субтилазой SKI-1/S1P и экспонируется на клеточную поверхность в виде гликопротеиновых тримеров. Последние образуют заякоренные на поверхности вируса шипики, обеспечивающие распознавание рецептора и слияние с клеткой [16]. Зрелый GP состоит из рецептор-связывающего GP1-домена, трансмембранного GP2-домена и стабильного сигнального пептида SSP [17]. GP является ключевым фактором, определяющим инфекционность возбудителя, тропизм, диапазон хозяев и патогенность, что делает его основной мишенью в процессе разработки вакцин и терапевтических препаратов. Помимо гликопротеина иммуногенной активностью обладают белки NP и Z [18].

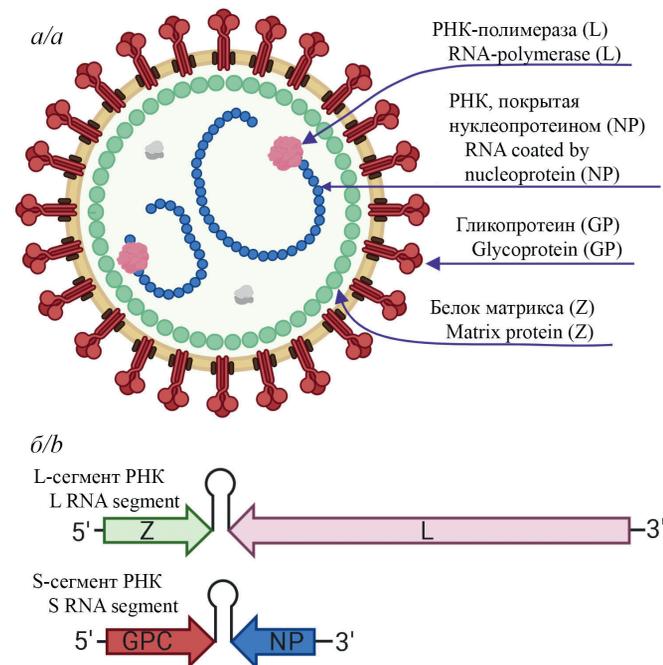
Геном ВЛ характеризуется высокой внутривидовой гетерогенностью. Штаммы возбудителя принято группировать по географическим локациям на 7 генетических линий/клайдов. Линии I–III и VI – это штаммы, изолированные в разных областях Нигерии. Линия IV, к которой относится прототипный штамм вируса Josiah/SL/76/H (JOS), включает штаммы из Гвинеи, Либерии и Сьерра-Леоне, линия V – из Мали и Кот-д’Ивуара. В линию VII входит 1 штамм, обнаруженный в государстве Того, для которого вирус ранее не считался эндемичным [19]. Генетическая вариабельность внутри вида составляет в среднем 20% для L-сегмента и 15% для S-сегмента, а внутри одной линии – до 10% для всего генома [14]. Подобное разнообразие ставит перед разработчиками серьёзную задачу по созданию универсальной пан-Ласса вакцины, обладающей кросс-протекцией против разных штаммов вируса.

## 2.2. Иммунология вируса Ласса

Для ЛЛ, протекающей в тяжёлой форме, характерно генерализованное подавление системы иммунитета. Одним из путей, используемых аренавирусами для вмешательства в развитие эффективного иммунного ответа, является ингибирование продукции ин-

терферонов (ИФН) I типа. Антагонизм врождённого иммунного ответа связан с действием вирусных белков NP и Z [20].

Первичной мишенью для ВЛ являются антигенпрезентирующие клетки (АПК) – дендритные клетки и макрофаги, в которых патоген способен эффективно реплицироваться и высвободиться, не вызывая при этом явной цитотоксичности. Вместо передачи сигналов другим иммунным медиаторам инфицированные АПК не активируются и не созревают, о чём свидетельствует отсутствие увеличения продукции воспалительных цитокинов (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , -6 и -12) и костимулирующих молекул (CD80, CD86, CD40, CD54, HLA) [21]. Большинство РНК-содержащих вирусов активируют АПК образованием нехарактерной для нормальной клетки двухцепочечной РНК (дцРНК) – промежуточного продукта вирусной репликации. В норме такая молекула определяется рецепторами распознавания паттернов RIG-I или MDA5, которые запускают каскад передачи противовирусных сигналов. Однако у аренавирусов имеется уникальный механизм обхода врождённого иммунного ответа. С-концевой домен нуклеопротеина вируса обладает экзонуклеазной активностью против дцРНК; таким образом, в инфицированной клетке нет сигнала для сенсоров вирусного присутствия, что по-



Структура вириона и организация генома вируса Ласса.

*a* – схематическое изображение вириона вируса Ласса; *b* – структурная организация вирусного генома. *Z* – ген матриксного белка, *L* – ген РНК-полимеразы, *GPC* – ген прегликопротеин-полипептидного комплекса, *NP* – ген нуклеопротеина (создано с помощью BioRender.com).

### Lassa virus virion structure and genome organization.

*a* – schematic picture of Lassa virion; *b* – structural organization of the viral genome. *Z* – matrix protein gene, *L* – RNA polymerase gene, *GPC* – pre-glycoprotein polyprotein complex gene, *NP* – nucleoprotein gene (created with BioRender.com).

зволяет ВЛ бесконтрольно реплицироваться без вмешательства иммунной системы [22]. Кроме того, белок NP специфически взаимодействует с компонентами RIG-I/MDA5/MAVS сигнального пути, что также вызывает супрессию ИФН-индуцированного ответа [23]. N-концевой домен Z-белка возбудителя связывается с рецепторами RIG-I и MDA5, меняет их конформацию и блокирует индукцию ИФН. Любопытно, что иммуносупрессорные свойства нуклеопротеина характерны для всех аренавирусов, тогда как ингибирование индукции ИФН Z-белком наблюдается только у патогенных представителей данного семейства (вирусы Ласса, Луйо, Хунин, Мачупо, Сабаи, Гуанарито, Чапаре, Данденонг и вирус лимфоцитарного хориоменингита) [24].

Благодаря АПК ВЛ распространяется по организму и вызывает инфекцию во вторичных лимфоидных органах и печени, осуществляя репликацию в гепатоцитах, фибробластах, эндотелии и некоторых эпителиальных клетках. Инфекционный процесс обуславливает истощение и снижение пролиферации Т-клеток в указанных органах и временную лимфоцитопению.

Ласса-специфические АТ классов IgM и IgG начинают выявляться во время пика вирусной нагрузки, при этом их титр не коррелирует с исходом заболевания. Вируснейтрализующие АТ обнаруживаются только спустя месяцы после острой инфекции и, как правило, в низких титрах [25]. Единственный поверхностный белок ВЛ – гликопротеин имеет 11 потенциальных сайтов гликозилирования, что составляет почти 30% от его массы. Показано, что гликаны на поверхности GP способствуют уклонению вируса от нейтрализующих АТ [26]. В настоящее время считается, что Т-клеточный ответ служит необходимым протективным компонентом в отношении ЛЛ, а АТ могут обеспечивать дополнительную иммунную поддержку, особенно важную для защиты от повторного заражения [27, 28].

### 3. Кандидатные вакцины для профилактики лихорадки Ласса

Согласно целевому профилю качества, составленному ВОЗ в 2017 г., вакцинный препарат для профилактики ЛЛ должен соответствовать следующим требованиям:

- подходить для иммунизации здоровых взрослых людей, детей, желательны – беременных и младенцев;
- вызывать только лёгкие и временные нежелательные явления, не приводить к неврологическим осложнениям, в частности к нейросенсорной тугоухости;
- демонстрировать не менее 70%, а в идеале – 90% протективности в клинических испытаниях;
- проявлять защитные свойства в течение минимум 3 (но предпочтительно свыше 5) лет после однократной иммунизации (допустимо применение до 3 доз);
- иметь минимальный срок годности 12 мес при температуре –20 °С или 6 мес при температуре 4–8 °С, однако оптимальный кандидат должен обладать сроком годности не менее 5 лет при более высоких температурах [3].

По состоянию на 2020 г. в разработке или на стадии доклинических испытаний находятся по меньшей

мере 133 потенциальных кандидата на роль вакцины против ЛЛ [29]. Для создания препаратов используются различные технологические платформы: векторы на основе рекомбинантных вирусов, несущих генетический материал потенциальных антигенов; ДНК-структуры; вирусоподобные частицы (ВпЧ); реассортанты ВЛ с непатогенными аренавирусами; препараты вирусных белков; инактивированные вирионы. До этапа клинических испытаний на данный момент дошли 2 препарата: рекомбинантная живая аттенуированная векторная вакцина на основе вируса кори штамма Schwarz и синтетическая ДНК-вакцина INO-4500 [30]. Далее в обзоре будут рассмотрены основные направления, используемые в разработке вакцин против ЛЛ (таблица). Во всех описанных случаях в процессе конструирования использован ВЛ штамма Josiah, если не указано иное.

#### 3.1. Рекомбинантные вакцины на основе вируса везикулярного стоматита

Вирус везикулярного стоматита (vesicular stomatitis virus, VSV) – оболочечный вирус с несегментированной РНК негативной полярности (минус-цепью) семейства *Rhabdoviridae*. В процессе создания векторов на основе VSV, как правило, реализуется стратегия замены гена нативного поверхностного гликопротеина (G) на генетический материал гликопротеина целевого инфекционного агента. Полученные таким образом рекомбинантные вирусы экспонируют на свою поверхность чужеродные антигены, являются ослабленными относительно возбудителя дикого типа, безопасными и высокоиммуногенными. Для VSV-вакцин показано, что защита опосредована АТ и действует по меньшей мере 14 мес на модели инфекции низших приматов (*Strepsirrhini*). Преимуществами платформы являются высокий уровень иммуногенности, отсутствие в человеческой популяции предрасположенности к вектору и хорошие культуральные свойства. Главный недостаток таких векторных структур – неэффективная система для оживления рекомбинантного вируса.

При замене в VSV гена белка G (гликопротеин) на ген GPC ВЛ получают репликативно-компетентный вирус (VSVΔG/LASVGPC), способный формировать иммунный ответ к трансгену. В экспериментах на морских свинках (*Cavia porcellus*) вакцина VSVΔG-LASVGPC обеспечивала 100%-ную защиту от летальной инфекции ( $1 \times 10^4$  ТЦД<sub>50</sub> – 50%-ной тканевой цитопатической дозы), однако вирус был обнаружен в сыворотке, печени, лёгких и селезёнке некоторых животных, что указывало на неравномерное распределение стерильного иммунитета. Изучение длительности протективного иммунитета показало 87,5 и 71% защиты от летальной инфекции через 6 и 12 мес после вакцинации соответственно [31].

В 2 экспериментах на модели низших приматов продемонстрирована 100%-ная выживаемость иммунизированных животных после инфицирования. Во время испытаний у всех подвергшихся иммунизации особей наблюдали высокий уровень АТ IgG

**Сравнение основных технологических платформ, применяемых при разработке вакцины для профилактики лихорадки Ласса**  
**Comparison of the main technology platforms used in developing a vaccine for the Lassa fever prevention**

Технологическая платформа Technologic platform	Целевой антиген Target antigen	Модель <i>in vivo</i> <i>In vivo model</i>	Защита от летальной инфекции (%) Protection from the lethal infection (%)	Формирование стерильного иммунитета Induction of sterilizing immunity
Вектор на основе вируса везикулярного стоматита Vesicular stomatitis virus vector	GP	Морские свинки Guinea pigs <i>Cavia porcellus</i>	100	Частичное Partial
		Низшие приматы Non-human primates <i>Strepsirrhini</i>	100	Отсутствует Absent
Вектор на основе вируса осповакцины Vaccinia virus vector	NP	Морские свинки Guinea pigs <i>Cavia porcellus</i>	66	Отсутствует Absent
		Мыши Mice <i>Muridae</i>	100	Нет данных No data
Вектор на основе вируса жёлтой лихорадки YF17D Yellow fever virus vector YF17D	GP	Морские свинки Guinea pigs <i>Cavia porcellus</i>	80	Нет данных No data
		GP1 + GP2	Морские свинки Guinea pigs <i>Cavia porcellus</i>	83
Вектор на основе вируса кори MeV Measles virus vector MeV	GP + NP	Низшие приматы Non-human primates <i>Strepsirrhini</i>	100	Вероятное Expected
		GP + Z	Низшие приматы Non-human primates <i>Strepsirrhini</i>	100
Вектор на основе аденовируса человека Ад5 Human adenovirus vector Ad5	GP + NP	Морские свинки Guinea pigs <i>Cavia porcellus</i>	100	Вероятное Expected
Реассортант вируса Ласса с вирусом Мопея ML29 Mopeia Lassa virus reassortant ML29	GP + NP	Морские свинки Guinea pigs <i>Cavia porcellus</i>	100	Полное для гомологичного штамма Complete for the homologous strain
ДНК-вакцина DNA vaccine	GP	Морские свинки Guinea pigs <i>Cavia porcellus</i>	100	Отсутствует Absent
		Низшие приматы Non-human primates <i>Strepsirrhini</i>	100	Нет данных No data
Инактивированная вакцина Inactivated vaccine	GP, NP, Z	Низшие приматы Non-human primates <i>Strepsirrhini</i>	0	Отсутствует Absent
Аттенуированная вакцина Attenuated vaccine	GP, NP, Z	Морские свинки Guinea pigs <i>Cavia porcellus</i>	100	Отсутствует Absent
Вирусоподобные частицы на основе вируса Ласса Lassa virus-like particles	NP, Z	Морские свинки Guinea pigs <i>Cavia porcellus</i>	100	Полное для гомологичного штамма Complete for the homologous strain
Вирусоподобные частицы на основе вируса венесуэльского энцефалита лошадей Venezuelan equine encephalitis virus-like particles	GP, NP	Морские свинки Guinea pigs <i>Cavia porcellus</i>	100	Отсутствует Absent

(до 1 : 10 000) и вируснейтрализующие АТ в низких титрах (до 1 : 40). В первом опыте 3 животных внутримышечно иммунизировали 1 дозой VSVΔG/LASVGP (1 × 10<sup>7</sup> БОЕ/доза; БОЕ – бляшкообразующая единица); контрольной особи вводили такую же дозу рекомбинантного VSV, однако несущего нерелевантный антиген. Через 28 сут после иммунизации всех особей инфицировали летальной дозой

(1 × 10<sup>4</sup> ТЦД<sub>50</sub>) ВЛ. Контрольное животное усыпили через 13 сут после инфицирования из-за развития тяжёлой геморрагической лихорадки и вiremии. У иммунизированных особей не наблюдали клинических признаков заболевания и каких-либо гематологических или биохимических показателей инфекции. В образцах крови вирус не детектировался. У 1 животного спустя 45 сут от инфицирования были об-

наружены АТ к NP-белку ВЛ, из чего исследователи сделали вывод о формировании у остальных моделей стерильного иммунитета [32].

Другое исследование протективных свойств проводили на 4 опытных животных, которых иммунизировали VSVΔG/LASVGPC ( $2 \times 10^7$  БОЕ/доза), и 2 контрольных, получавших рекомбинантный VSV, несущий гликопротеин вируса Эбола ( $2 \times 10^7$  БОЕ/доза). Все 6 особей были заражены ВЛ ( $1 \times 10^4$  БОЕ) спустя 28 сут после вакцинации. На 3 сут после инфицирования у 2 контрольных моделей начали проявляться клинические признаки заболевания. К 10 сут у 1 животного наблюдали выраженный фациальный отёк, у обоих приматов – макулёзную сыпь и анорексию. На 11 и 13 сут животные из контрольной группы были умерщвлены; патологоанатомическое исследование показало характерные для ЛЛ повреждения и патологические изменения. При этом все модели из опытной группы были защищены от высокой дозы вируса. На 7 сут после инфицирования возбудитель детектировали у всех животных (до  $1 \times 10^4$  БОЕ/мл), что свидетельствовало о полном отсутствии поствакцинального стерильного иммунитета. К 10 сут у вакцинированных VSVΔG/LASVGPC животных вирус не обнаруживался, в то время как у контрольных приматов наблюдали рост титра инфекционного агента ( $>1 \times 10^6$  БОЕ/мл) [33].

Кроме этого, проверена способность проявления данной вакциной защитных свойств по отношению к штаммам ВЛ из других регионов Западной Африки. В экспериментах на морских свинках и низших приматах установлена 100%-ная протективность VSVΔG/LASVGPC против гетерологичных вакцинному штаммов вируса, изолированных в Либерии (штамм Z-132, линия IV), Мали (Soromba-R, линия V) и Нигерии (Pinneo, линия I) [34].

Выявлено также, что другой потенциальный антиген ВЛ – белок нуклеокапсида не проявляет протективного действия в вакцинной платформе на основе VSV. Сконструирован рекомбинантный вирус VSVG/LASVNP, представляющий собой VSV дикого типа с геном белка NP ВЛ, клонированным между генами M и G. Морские свинки, получившие  $1 \times 10^6$  БОЕ VSVG/LASVNP, были заражены летальной дозой ( $1 \times 10^4$  ТЦД<sub>50</sub>) ВЛ. В результате все иммунизированные животные проявляли клинические признаки ЛЛ (вялость, потеря 10–20% массы тела). Выживаемость в опытной группе составила 66,6%. Титр вируса в тканях оказался аналогичным для иммунизированных особей и контрольной группы [34].

Ещё один метод конструирования VSV-вакцины предполагает модификацию генома, при которой ген GPC встраивают на место первого экспрессируемого гена, а генетический материал нативного нуклеопротеина (N) переносится в сайт делеции гена GP. Такие перестановки наделяют вектор двумя преимуществами по сравнению с «традиционным» VSV, псевдотипированным чужеродным гликопротеином. Во-первых, существенно снижается экспрессия гена мажорного белка N, что ослабляет репликативные свойства

вируса. Во-вторых, в трансдуцированных клетках повышается продукция трансгена. Таким образом, полученный предложенным способом рекомбинантный вирус rVSV-N4ΔG-LASV является ещё более ослабленным и потенциально более иммуногенным. Его оценку проводили в составе 4-валентного вакцинного препарата против филовирюсов (эболавирусы Заир и Судан, вирус Марбург) и ВЛ на модели низших приматов. Животных иммунизировали дважды с интервалом в 56 сут в дозе  $4 \times 10^7$  БОЕ (по  $1 \times 10^7$  БОЕ на каждый компонент 4-валентной вакцины) и заражали летальной дозой ( $1 \times 10^3$  БОЕ) ВЛ спустя 2 нед после бустирования. Ласса-специфичные АТ IgG и вируснейтрализующие АТ детектировались у всех ( $n = 18$ ) животных и достигали максимума на 66 сут (10 сут после получения второй дозы). В данной временной точке Ласса GP-специфичный ИФН-γ-индуцированный ответ обнаруживали у 16 из 18 иммунизированных моделей. Все вакцинированные особи пережили летальное заражение без клинических проявлений инфекции. В образцах крови 3 из 5 подвергшихся вакцинации приматов детектировали вирусную РНК, у 1 выявлялся живой возбудитель [35]. Подобная разработка выглядит особенно перспективной, поскольку созданная по такой же технологии вакцина для профилактики лихорадки Эбола успешно прошла I стадию клинических испытаний по оценке безопасности и иммуногенности [36].

### 3.2. Векторы на основе вируса осповакцины

Первая рекомбинантная вакцина для профилактики ЛЛ получена в 1987 г. на основе вируса осповакцины (штамм Lister), экспрессирующего ген NP. В опыте на морских свинках показано, что 1 доза ( $1 \times 10^7$  БОЕ) защищает животных от смертельного заболевания и виремии. Поскольку NP не является поверхностным белком, исследователи заключили, что иммунитет опосредуется не гуморальным, а клеточным ответом [37].

В следующей работе в качестве вектора использовали другой штамм вируса осповакцины (NY6H), в который клонировали гены белков NP и GPC. Для проверки протективных свойств использовали различные схемы иммунизации и большое количество моделей. В ходе эксперимента у 52 из 60 иммунизированных морских свинок отмечали повышение температуры тела после заражения. Количество смертей было высоким как в контрольной, так и в опытных группах: погибло 86% контрольных особей и 61% – подвергшихся вакцинации. Более низкие уровни летальности (21 и 6% соответственно) наблюдали в группах, вакцинированных 1 вектором, несущим либо GPC, либо NP. При этом ни одна конструкция не защищала всех животных. Вопреки ожиданиям оказалось, что вакцинация 2 рекомбинантными вирусами только увеличила летальность: в этой группе выжило лишь 58% животных. Эти данные дважды подтверждены в независимых экспериментах. Несмотря на отсутствие тотальной защиты, установлено, что иммунизированные особи быстрее освобождались от виремии. Вероятно, результаты значительно отличаются

от полученных ранее вследствие того, что вектор для создания вакцины был сконструирован на основе более слабого штамма вируса осповакцины NYVH [38, 39].

На сегодняшний день в качестве матрицы для создания рекомбинантных вирусных векторов используют не способный к репликации в клетках человека модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA). В ряде доклинических и клинических испытаний с общим числом участников более 120 тыс. человек продемонстрировано, что подобные векторы являются генетически стабильными, безопасными, иммуногенными и масштабируемыми для производства [40].

С использованием MVA сконструирована кандидатная вакцина GEO-LM01, кодирующая гены NP- и Z-белков ВЛ. При иммунизации препаратом мышью наблюдали сильный Т-клеточный ответ, особенно в популяции CD4+, и низкий уровень продукции специфических АТ IgG. Оценку протективности GEO-LM01 проводили на модели мышей, для которых интрацеребральное заражение штаммом ML29 (рекомбинантный реассортант между ВЛ и непатогенным аренавирусом Мопея) было летальным. Однократная иммунизация обеспечила полную защиту животных от модельного вируса [41].

### 3.3. Векторная вакцина на основе вируса жёлтой лихорадки

В настоящее время самой эффективной и безопасной вакциной против вируса жёлтой лихорадки считается YF17D. Благодаря хорошему профилю безопасности и успехам в области изучения молекулярной биологии флавивирусов её генетическая матрица успешно применяется для создания химерных вирусных структур, в которых генетический материал нативных белков оболочки ргМ и Е заменён на гены белков других флавивирусов (вирусы японского энцефалита, Денге, Западного Нила) [42]. Геном YF17D допускает также встраивание чужеродных трансгенов между генами белков Е и NS1 [43]. Эта стратегия использована для получения 2 потенциальных вакцин для профилактики ЛЛ: первая кодирует полный ген GPC ВЛ (YFV17D/LAS-GPC), вторая несёт гены субъединиц гликопротеина GP1 и GP2 по отдельности (YF17D/LASV-GP1 и -GP2) [44, 45].

При проверке на модели морских свинок вакцина YFV17D/LAS-GPC продемонстрировала абсолютную безопасность, однако однократная иммунизация с последующим инфицированием на 21 сут показала лишь 80% протективности в сравнении со 100%-ным показателем для вакцинного препарата на основе ML29. Гуморальный ответ на трансген был низким и начинал регистрироваться только после бустирования животных [44]. Рекомбинантные вирусы, экспрессирующие субъединицы гликопротеина (YF17D/LASV-GP1 и -GP2), вводили в равных пропорциях. 5 из 6 вакцинированных особей после заражения летальной дозой вируса выжили, однако у всех наблюдались клинические манифестации; таким образом, вакцинация не защитила их от инфекции [45].

Вероятнее всего, вектор на основе YF17D в значительной степени подходит для конструирования вакцин против флавивирусных инфекций (в том числе Денге, Зика), но для других патогенов, в частности для ВЛ, он является недостаточно иммуногенным. Это может объясняться низкими репликативными свойствами и потерей генетической стабильности при пассировании вирусного вектора в клеточной культуре [44, 45].

### 3.4. Рекомбинантные вакцины на основе вируса кори

Живая аттенуированная противокоревая вакцина показала безопасность и эффективность за годы использования у миллионов людей по всему миру. Методы обратной генетики позволяют встраивать чужеродные трансгены в геном вируса кори для создания рекомбинантных вакцинных препаратов. Этот подход использован при разработке вакцин против множества патогенов, включая вирусы гепатита В, Денге, ВИЧ, коронавирусы SARS и MERS, малярийный плазмодий. В ряде работ показана способность вектора индуцировать устойчивый В- и Т-клеточный ответ [46].

Генетическую матрицу вируса кори штамма Schwarz использовали для конструирования потенциального вакцинного препарата против ЛЛ. В вакцинный вектор клонировали 1 ген GPC или GPC в комбинации с NP или Z. Все рекомбинантные вирусные векторы индуцировали синтез ИФН I типа и экспрессию молекул активации в культуре первичных человеческих АПК. Эффективность оценивали на низших приматах с использованием однократной иммунизации вакциной, несущей гены GPC + NP (MeV-GPC-NP) либо GPC + Z (MeV-GPC-Z). Гуморальный ответ на трансгены обнаруживался не у всех животных и был низким. NP-специфические цитокинпродуцирующие Т-клетки появлялись на 14 сут после иммунизации, при этом выраженность клеточного ответа на Z-белок была незначительной. На 23 сут после иммунизации детектировали нарастание количества GPC-специфических цитокинпродуцирующих CD8+ и CD4+ Т-клеток для вакцины, несущей GPC + NP, но не GPC + Z. Через 37 сут после вакцинации животных инфицировали летальной дозой вируса ЛЛ. Все привитые особи успешно пережили инфекцию, однако клинические проявления различались в зависимости от использованного вектора. Вакцинированные MeV-GPC-Z гораздо тяжелее переносили болезнь и выздоровели позже по сравнению с группой, получавшей вакцину MeV-GPC-NP. Следует отметить, что в образцах тканей животных, иммунизированных последней, детектировали не живой ВЛ, а лишь малые количества вирусной РНК, что может указывать на возможное формирование стерильного иммунитета [18].

В конце 2019 г. компания Themis Bioscience начала I стадию клинических испытаний вакцинного препарата против ЛЛ на основе вектора вируса

кори штамма Schwarz (MV-LASV), в ходе которых планировалось оценить его безопасность, переносимость и иммуногенность. Результаты работы пока не опубликованы [47].

### 3.5. Аденовирусные векторные вакцины

На сегодняшний день аденовирусные векторы являются наиболее популярной вирусной системой для доставки генов. Рекомбинантные аденовекторы являются репликативно-дефектными, в связи с чем обладают хорошим профилем безопасности, подтвержденным более чем в 500 клинических испытаниях. Аденовирусные векторы обеспечивают высокие и длительные уровни экспрессии трансгенов в клетках-мишенях и идеально подходят для конструирования вакцин благодаря способности индуцировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ. Большинство векторов сконструированы на основе аденовируса человека 5 серотипа (Ад5); используются также 4, 6, 26, 35 серотипы данного возбудителя и аденовирусы обезьян [48].

Векторная платформа на основе Ад5 применена для конструирования вакцинного препарата против ЛЛ. Полученные 2 рекомбинантных вектора (несущие гены GPC и NP) предполагается использовать совместно в двукратной схеме иммунизации. В эксперименте на морских свинках показана 100%-ная выживаемость после введения летальной дозы ВЛ, при этом у инфицированных животных не было клинических признаков заболевания. В образцах тканей вакцинированных особей возбудитель не обнаруживался, возможно, вследствие того, что сформированный иммунитет оказался стерильным. Титры вируснейтрализующих АТ у подвергшихся вакцинации особей варьировали от 1 : 20 до 1 : 160. Т-клеточный иммунный ответ не изучался, однако авторы считают, что он был сформирован: ранее показано, что гуморального иммунитета в изолированном виде недостаточно для полной защиты [49].

### 3.6. Живая реассортантная Мопея/Ласса вакцина

Бисегментированная организация генома аренавирусов позволяет создавать реассортанты между вирусами разных видов. ML29 – реассортант между ВЛ и непатогенным для человека аренавирусом Мопея. Он несёт L-сегмент (Z-белок и РНК-зависимая РНК-полимераза) вирусного генома последнего и S-сегмент (нуклеопротеин и гликопротеин) ВЛ. Полученные таким образом вирусные частицы, будучи инфекционными, являются тем не менее ослабленными [50].

Однократная иммунизация ML29 обеспечила 100%-ную защиту морских свинок от гомологичного вакцинному штамма и гетерологичного штамма 803213/NIG, но не оказала протективного действия в отношении животных, инфицированных штаммом WE. Показано, что для гомологичного штамма сформировался стерильный иммунитет. С целью оценки безопасности реассортанта в присутствии вируса дикого типа инфицирование осуществлено в день иммунизации либо на 2 сут после неё. Примечатель-

но, что хотя в этом случае вакцинация не защищала от болезни, она предотвратила развитие летального исхода. У всех вакцинированных особей имели место уменьшение массы тела и гипертермия, однако выраженность клинических признаков была меньшей по сравнению с контрольной группой [51].

Безопасность вакцины на основе ML29 продемонстрирована в эксперименте на макак-резусах. На 14 сут после вакцинации в сыворотке крови детектировали высокие уровни Ласса-специфических АТ IgG при полном отсутствии вируснейтрализующих АТ. У вакцинированных животных не было повышения температуры тела или иных клинических проявлений в ответ на введение препарата. Гистологическое исследование не установило тканевых повреждений, свойственных ЛЛ [50].

Поскольку в эндемичном для ЛЛ регионе регистрируется высокий уровень распространённости ВИЧ, важно, чтобы потенциальная вакцина была безопасной для лиц с положительным ВИЧ-статусом. С учётом этого ML29 протестирована на макак-резусах, инфицированных вирусом иммунодефицита обезьян. После вакцинации у животных не наблюдалось признаков аренавирусной инфекции и сокращения продолжительности жизни, однако отмечено увеличение вирусемии ML29 по сравнению с группой контроля. При этом уровни клеточного и гуморального иммунного ответа на вакцинацию были одинаковыми для особей с нормальным или угнетённым иммунитетом [52].

Кроме этого, в отношении подобных вакцинных препаратов не до конца решена проблема генетической стабильности вирусов-реассортантов. Естественные случаи реассортировки между аренавирусами не описаны, но *in vitro* существуют различные варианты [53–55]. Этот факт вызывает опасения, поскольку вакцинация ослабленным реассортантом в присутствии более вирулентного вируса дикого типа потенциально может ускорить течение заболевания.

### 3.7. ДНК-вакцины

Технология ДНК-вакцин основана на бактериальных плаزمиде, кодирующих полипептидную последовательность потенциальных антигенов. К положительным сторонам этих препаратов относят быстроту разработки, простоту и низкую стоимость производства, сниженные требования к температуре хранения и долгосрочную стабильность. ДНК-вакцины могут вводиться разными путями: внутримышечно, подкожно, внутрикожно или интраназально. Основная проблема заключается в необходимости доставки неповреждённого генетического материала непосредственно в ядро клетки-мишени. Для этого используют 2 основных подхода: упаковку ДНК в липосомные комплексы либо наночастицы или применение метода электропорации. К настоящему времени данная технологическая платформа применена при разработке вакцин против таких патогенов, как ВИЧ, вирусы гриппа, Зика, Эбола, ВЛ, коронавирусы MERS-CoV и SARS-CoV-2, вирус венысуэльского энцефалита лошадей (ВЭЛ) [56, 57].

Протективные свойства кодон-оптимизированной ДНК-вакцины, кодирующей последовательность прекурсора гликопротеина ВЛ, продемонстрированы на модели летальной инфекции морских свинок и низших приматов. Морским свинкам трижды (с интервалом в 3 нед) вводили по 100 мкг вакцины, используя приборы для внутримышечной либо трансдермальной электропорации. Через 4 нед после второго бустирования животных инфицировали ВЛ ( $1 \times 10^3$  БОЕ). В результате эксперимента все особи из опытных групп выжили, но у 4 из 8 получавших вакцину внутримышечно наблюдали лёгкие клинические проявления и вiremию. Предполагается, что использование трансдермальной электропорации для этой вакцины предпочтительнее, поскольку позволяет доставить антиген в иммунологически релевантные эпидермальные дендритные клетки [58]. Низшим приматам вводили по 2,5 мг вакцины с помощью аналогичного прибора в каждую конечность по 2 схемам: трёхкратная вакцинация с интервалом в 3 нед и инфицированием через 4 нед после второго бустирования, либо двукратная вакцинация с интервалом в 4 нед и инфицированием спустя 5 нед после бустирования. Все животные, вакцинированные по первой или второй схеме, пережили заражение летальной дозой ( $1 \times 10^3$  БОЕ) без вiremии и каких-либо клинических признаков. Титр вируснейтрализующих АТ был достоверно выше в группе животных, иммунизированных по трёхкратной схеме: на 70 сут от первой вакцинации он достигал  $1 : 64$  с пиком  $>1 : 256$  на 21 сут после инфицирования [59].

В 2019 г. в Соединённых Штатах Америки (США) начались первые клинические испытания кандидатной вакцины для профилактики ЛЛ. Это кодирующая ген GPC ВЛ ДНК-вакцина INO-4500, разработанная фармацевтической компанией Inovio Pharmaceuticals [60]. В 2021 г. планируется старт испытаний по исследованию безопасности, переносимости и иммуногенности данного препарата в Республике Гана [61].

### **3.8. Другие технологические платформы (инактивированные вакцины, аттенуированные вакцины, вирусоподобные частицы)**

Попытка создать инактивированный вакцинный препарат против ЛЛ не привела к ожидаемому результату. Несмотря на то что вакцинация индуцировала у приматов гуморальный ответ на белки GP1, GP2 и NP, она не обеспечивала защиту от летальной инфекции. Вакцина не уменьшила тяжесть течения заболевания, значительно продлив его: контрольные животные умерли на 12 и 13 сут, а иммунизированные – на 15–21 сут после инфицирования [62].

К настоящему времени имеется несколько многообещающих разработок в области конструирования аттенуированной вакцины для профилактики ЛЛ. В частности, предложен способ ослабления нативного патогена, который заключается в замене некодирующего межгенного региона (intergenic region, IGR) L-сегмента на аналогичную структуру S-сегмента. Рекомбинантный вирус rLASV(IGR/S-S) характеризу-

ется более низкой скоростью репликации в культуре клеток Vero относительно возбудителя дикого типа, что, однако, не мешает ему давать эквивалентный выход вирусного потомства. Иммунизация морских свинок rLASV(IGR/S-S) показала, что он является ослабленным: у животных не было потери массы тела и клинических признаков болезни за исключением временного повышения температуры тела с 8 по 13 сут. После инфицирования вакцинированных особей вирулентным ВЛ наблюдали 100%-ную выживаемость [63].

Другая стратегия подразумевает ослабление вируса путём модификации нуклеотидной последовательности гена GP с целью деоптимизации кодонного состава. Полученный таким образом рекомбинантный вирус rLASV-GPC/CD проверяли на морских свинках. Эксперименты выявили, что аттенуированный вирус абсолютно безопасен в дозе, на 2 порядка превышающей летальную для возбудителя дикого типа. Изучение протективных свойств вакцины продемонстрировало полную защиту иммунизированных животных [64]. Относительно подобной вакцины следует отметить, что снижение продукции гликопротеина негативно влияет на культуральные свойства вируса. В связи с этим не до конца ясно, возможно ли перенести эту технологию в масштабное производство и насколько это рентабельно. Кроме того, остро стоит вопрос безопасности применения аттенуированных вакцин в человеческой популяции ввиду риска развития неврологических осложнений.

Наконец, ещё одно потенциальное направление в области разработки кандидатной вакцины против ЛЛ касается ВпЧ. Они структурно напоминают инфекционный вирус, но не могут распространяться за пределы первоначально инфицированных клеток. Ожидается, что вакцины на основе ВпЧ будут безопасны и слабореактогенны.

С использованием указанной технологии сконструированы вакцины для профилактики ЛЛ на основе ВЛ и ВЭЛ. В первом случае ВпЧ содержат полный набор белков ВЛ, однако из генома удалена область, кодирующая ген GPC. Его делеция выбрана потому, что белки NP и L необходимы для репликации вирусного генома, а стабильная экспрессия Z-белка делает клетки устойчивыми к инфекции ВЛ. Предложено также проверить влияние иммуносупрессорной активности NP на протективные свойства кандидатной вакцины. Получены 2 вида вирусоподобных частиц: WT-WT, несущие геном вируса дикого типа с делецией гена GPC, и WT-Exo(N) – такие же частицы, но с мутацией в области, кодирующей экзонуклеазный домен белка NP. Однократная вакцинация морских свинок WT-WT и WT-Exo(N) обеспечила полную защиту от последующего заражения летальной дозой ВЛ, при этом отключение антагонизма врождённого иммунного ответа оказалось несущественным в плане протективности. В группах, иммунизированных частицами каждого вида, животные не давали клинических реакций в ответ на вакцинацию и были одинаково защищены от заболевания. У большинства особей АТ

не выявлялись как после иммунизации, так и после заражения, что предполагает участие клеточного иммунитета. Важно, что в конце эксперимента ни в одном случае у иммунизированных животных не была обнаружена вирусная РНК; следовательно, сформированный вакцинацией иммунитет полностью подавлял развитие инфекции [65].

ВЭЛ – альфавирус, содержащий одноцепочечную РНК позитивной полярности (плюс-цепь). С его использованием получают ВпЧ, несущие генетический материал потенциальных антигенов, для создания безопасных вакцин с 1 циклом репликации. Такие структуры представляют собой минимальную необходимую для саморепликации и транскрипции генетическую единицу, упакованную в вирусные структурные белки. Попав в клетку, ВпЧ реализуют свой генетический потенциал, который ограничен геном вирусной РНК-полимеразы и трансгеном, и не собираются в новые инфекционные частицы. На основе ВЭЛ получены ВпЧ, несущие гены белков GP и NP, – LGP-VRP и LNP-VRP соответственно. Экспериментальную вакцину проверяли на морских свинках, которых трижды с 4-недельным интервалом иммунизировали препаратами ВпЧ LGP-VRP и LNP-VRP по отдельности ( $1 \times 10^7$  инфекционных частиц) и в комбинации ( $2 \times 10^7$  инфекционных частиц). Через 28 сут после третьей иммунизации животных заражали ВЛ в дозе 160 ТЦД<sub>50</sub>. Все контрольные особи были инфицированы и умерли в период с 10 по 30 сут. У иммунизированных животных, напротив, не наблюдали каких-либо симптомов заболевания; ни одно из них не погибло. У большинства не было детектируемой вирусемии; исключение составляли 3 особи, которым вводили LGP-VRP, и 2, получавшие LNP-VRP и комбинированный препарат соответственно. Примечательно, что пассивная иммунизация морских свинок сывороткой, полученной от вакцинированных комбинированным препаратом LGP-VRP и LNP-VRP животных, не вызвала какого-либо защитного эффекта при заражении летальной дозой ВЛ. На основании полученных результатов исследователи сделали вывод о том, что защитный иммунитет контролировался Т-клетками [66].

#### 4. Заключение

Высокий эпидемический потенциал, факт передачи вируса от человека к человеку и отсутствие клинически одобренных средств для лечения и/или профилактики делают ЛЛ серьезной угрозой для здравоохранения многих стран. Несмотря на большое количество исследований, направленных на разработку вакцинных препаратов против этого заболевания, поиск идеального кандидата продолжается. При использовании живых ослабленных или репликативно-компетентных векторных вакцин можно ожидать возможные проблемы с неконтролируемой реактогенностью, что ограничивает круг лиц, для которых такие препараты безопасны. Вероятно, оптимальная потенциальная вакцина должна быть представлена рекомбинантным репликативно-дефектным вирусным вектором, инду-

цирующим стойкий клеточно-опосредованный иммунный ответ, который может быть усилен применением двухэтапной (прайм-буст) схемы иммунизации. Такие технологические платформы, как ДНК-вакцины, а также векторы на основе VSV и вируса кори, на сегодняшний день являются лидирующими, поскольку демонстрируют лучшие иммуногенные и протективные свойства и имеют благоприятные профили безопасности, установленные в ходе ряда клинических испытаний.

#### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. WHO. Introduction to Lassa fever. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/introduction-to-lassa-fever> (accessed December 15, 2020).
2. Wolf T., Ellwanger R., Goetsch U., Wetzstein N., Gottschalk R. Fifty years of imported Lassa fever: a systematic review of primary and secondary cases. *J. Travel Med.* 2020; 27(4): 1–17. <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa035>.
3. WHO. WHO Target Product Profile for Lassa virus Vaccine; June 2017. Available at: <https://www.who.int/blueprint/priority-diseases/key-action/LassaVirusVaccineTPP.PDF> (accessed December 15, 2020).
4. Roberts L. Nigeria hit by unprecedented Lassa fever outbreak. *Science.* 2018; 359(6381): 1201–2. <https://doi.org/10.1126/science.359.6381.1201>.
5. Coulibaly-N'Golo D., Allali B., Kouassi S.K., Fichet-Calvet E., Becker-Žiaja B., Rieger T., et al. Novel arenavirus sequences in *Hylomyscus* sp. and *Mus (Nannomys) setulosus* from Côte d'Ivoire: Implications for evolution of arenaviruses in Africa. *PLoS One.* 2011; 6(6): e20893. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020893>.
6. McCormick J.B., Webb P.A., Krebs J.W., Johnson K.M., Smith E.S. A prospective study of the epidemiology and ecology of Lassa fever carried out primarily in the eastern province of Sierra. *J. Infect. Dis.* 1987; 155(3): 437–44. <https://doi.org/10.1093/infdis/155.3.437>.
7. Okokhere P., Colubri A., Azubike C., Iruolagbe C., Osazuwa O., Tabrizi S., et al. Clinical and laboratory predictors of Lassa fever outcome in a dedicated treatment facility in Nigeria: an observational cohort study. *Lancet Infect. Dis.* 2019; 18(6): 684–95. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(18\)30121-x](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(18)30121-x).
8. Asogun D.A., Günther S., Akpede G.O., Ihekweazu C., Zumla A. Lassa fever: epidemiology, clinical features, diagnosis, management and prevention. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 2019; 33(4): 933–51. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2019.08.002>.
9. Mateer E.J., Huang C., Shehu N.Y., Paessler S. Lassa fever-induced sensorineural hearing loss: A neglected public health and social burden. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(2): e0006187. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006187>.
10. Okogbenin S., Okoeguale J., Akpede G., Colubri A., Barnes K.G., Mehta S., et al. Retrospective cohort study of Lassa fever in pregnancy, Southern Nigeria. *Emerg. Infect. Dis.* 2019; 25(8): 1495–500. <https://doi.org/10.3201/eid2508.181299>.
11. Buba M.I., Dalhat M.M., Nguku P.M., Waziri N., Mohammad J.O., Bomo I.M., et al. Mortality among confirmed Lassa fever cases during the 2015–2016 outbreak in Nigeria. *Am. J. Public Health.* 2018; 108(2): 262–4. <https://doi.org/10.2105/ajph.2017.304186>.
12. NCDC. Lassa fever Situation Report. 2020. Available at: <https://ncdc.gov.ng/themes/common/files/sitreps/15a12399a0aa98330e56dabd49ccef8.pdf> (accessed December 15, 2020).
13. Radoshitzky S.R., Buchmeier M.J., Charrel R.N., Clegg J.C.S., Gonzalez J.J., Günther S., et al. ICTV virus taxonomy profile: Arenaviridae. *J. Gen. Virol.* 2019; 100(8): 1200–1. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001280>.
14. Klitting R., Mehta S.B., Oguzie J.U., Oluniyi P.E., Pauthner M.G., Siddle K.J., et al. Lassa Virus Genetics. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2020, online ahead of print. [https://doi.org/10.1007/82\\_2020\\_212](https://doi.org/10.1007/82_2020_212).
15. Zinzula L., Tramontano E. Strategies of highly pathogenic RNA viruses to block dsRNA detection by RIG-I-like receptors: Hide, mask, hit. *Antiviral Res.* 2013; 100(3): 615–35. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.10.002>.
16. Lenz O., ter Meulen J., Klenk H.D., Seidah N.G., Garten W. The Lassa virus glycoprotein precursor GP-C is proteolytically

- processed by subtilase SKI-1/S1P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; 98(22): 12701–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.221447598>.
17. Knipe D.M., Howley P. *Fields Virology*. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
  18. Mateo M., Reynard S., Carnec X., Journeaux A., Baillet N., Schaeffer J., et al. Vaccines inducing immunity to Lassa virus glycoprotein and nucleoprotein protect macaques after a single shot. *Sci. Transl. Med.* 2019; 11(512): eaaw3163. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw3163>.
  19. Whitmer S.L.M., Strecker T., Cadar D., Dienes H.P., Faber K., Patel K., et al. New lineage of Lassa virus, Togo, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(3): 599–602. <https://doi.org/10.3201/eid2403.171905>.
  20. McLay L., Liang Y., Ly H. Comparative analysis of disease pathogenesis and molecular mechanisms of New World and Old World arenavirus infections. *J. Gen. Virol.* 2014; 95(Pt. 1): 1–15. <https://doi.org/10.1099/vir.0.057000-0>.
  21. Baize S., Kaplon J., Faure C., Pannetier D., Georges-Courbot M.C., Deubel V. Lassa virus infection of human dendritic cells and macrophages is productive but fails to activate cells. *J. Immunol.* 2004; 172(5): 2861–9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2861>.
  22. Hastie K.M., Kimberlin C.R., Zandonatti M.A., MacRae I.J., Saphire E.O. Structure of the Lassa virus nucleoprotein reveals a dsRNA-specific 3' to 5' exonuclease activity essential for immune suppression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011; 108(6): 2396–401. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016404108>.
  23. Pythoud C., Rodrigo W.W., Pasqual G., Rothenberger S., Martínez-Sobrido L., de la Torre J.C., et al. Arenavirus nucleoprotein targets interferon regulatory factor-activating kinase IKKε. *J. Virol.* 2012; 86(15): 7728–38. <https://doi.org/10.1128/jvi.00187-12>.
  24. Xing J., Ly H., Liang Y. The Z proteins of pathogenic but not nonpathogenic arenaviruses inhibit RIG-I-like receptor-dependent interferon production. *J. Virol.* 2015; 89(5): 2944–55. <https://doi.org/10.1128/jvi.03349-14>.
  25. Zapata J.C., Medina-Moreno S., Guzmán-Cardozo C., Salvato M.S. Improving the breadth of the host's immune response to Lassa virus. *Pathogens*. 2018; 7(4): 84. <https://doi.org/10.3390/pathogens7040084>.
  26. Sommerstein R., Flatz L., Remy M.M., Malinge P., Magistrelli G., Fischer N., et al. Arenavirus glycan shield promotes neutralizing antibody evasion and protracted infection. *PLoS Pathog.* 2015; 11(11): e1005276. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005276>.
  27. Russier M., Pannetier D., Baize S. Immune responses and Lassa virus infection. *Viruses*. 2012; 4(11): 2766–85. <https://doi.org/10.3390/v4112766>.
  28. Prescott J.B., Marzi A., Safronetz D., Robertson S.J., Feldmann H., Best S.M. Immunobiology of Ebola and Lassa virus infections. *Nat. Rev. Immunol.* 2017; 17(3): 195–207. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.138>.
  29. Salami K., Gouglas D., Schmaljohn C., Saville M., Tornieporth N. A review of Lassa fever vaccine candidates. *Curr. Opin. Virol.* 2019; 37: 105–11. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2019.07.006>.
  30. Search of Lassa – List Results – ClinicalTrials.gov. Available at: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Lassa&Search> (accessed December 15, 2020).
  31. Stein D.R., Warner B.M., Soule G., Tierney K., Frost K.L., Booth S. A recombinant vesicular stomatitis-based Lassa fever vaccine elicits rapid and long-term protection from lethal Lassa virus infection in guinea pigs. *NPJ Vaccines*. 2019; 4: 8. <https://doi.org/10.1038/s41541-019-0104-x>.
  32. Marzi A., Feldmann F., Geisbert T.W., Feldmann H., Safronetz D. Vesicular stomatitis virus-based vaccines against Lassa and Ebola viruses. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(2): 305–7. <https://doi.org/10.3201/eid2102.141649>.
  33. Geisbert T.W., Jones S., Fritz E.A., Shurtleff A.C., Geisbert J.B., Liebscher R., et al. Development of a new vaccine for the prevention of Lassa fever. *PLoS Med.* 2005; 2(6): 0537–45. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0020183>.
  34. Safronetz D., Mire C., Rosenke K., Feldmann F., Haddock E., Geisbert T., et al. A recombinant vesicular stomatitis virus-based Lassa fever vaccine protects guinea pigs and macaques against challenge with geographically and genetically distinct Lassa viruses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(4): e0003736. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003736>.
  35. Cross R.W., Xu R., Matassov D., Hamm S., Latham T.E., Gerardi C.S., et al. Quadrivalent VesiculoVax vaccine protects nonhuman primates from viral-induced hemorrhagic fever and death. *J. Clin. Invest.* 2020; 130(1): 539–51. <https://doi.org/10.1172/jci131958>.
  36. Clarke D.K., Xu R., Matassov D., Latham T.E., Ota-Setlik A., Gerardi C.S., et al. Safety and immunogenicity of a highly attenuated rVSVN4CT1-EBOVGP1 Ebola virus vaccine: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 clinical trial. *Lancet Infect. Dis.* 2020; 20(4): 455–66. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(19\)30614-0](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(19)30614-0).
  37. Clegg J.C.S., Lloyd G. Vaccinia recombinant expressing Lassa-virus internal nucleocapsid protein protects guineapigs against Lassa fever. *Lancet.* 1987; 330(8552): 186–8. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(87\)90767-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(87)90767-7).
  38. Morrison H.G., Bauer S.P., Lange J.V., Esposito J.J., McCormick J.B., Auperin D.D., et al. Protection of guinea pigs from Lassa fever by vaccinia virus recombinants expressing the nucleoprotein or the envelope glycoproteins of Lassa virus. *Virology*. 1989; 171(1): 179–88. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90525-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90525-4).
  39. Morrison H.G., Goldsmith C.S., Regnery H.L., Auperin D.D. Simultaneous expression of the Lassa virus N and GPC genes from a single recombinant vaccinia virus. *Virus Res.* 1991; 18(2-3): 231–41. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(91\)90021-m](https://doi.org/10.1016/0168-1702(91)90021-m).
  40. Cottingham M.G., Carroll M.W. Recombinant MVA vaccines: Dispelling the myths. *Vaccine*. 2013; 31(39): 4247–51. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.03.021>.
  41. Salvato M.S., Domi A., Guzmán-Cardozo C., Medina-Moreno S., Zapata J.C., Hsu H., et al. A single dose of modified vaccinia Ankara expressing Lassa virus-like particles protects mice from lethal intracerebral virus challenge. *Pathogens*. 2019; 8(3): 133. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030133>.
  42. Giel-Moloney M., Goncalvez A.P., Catalan J., Lecouturier V., Girerd-Chambaz Y., Diaz F., et al. Chimeric yellow fever 17D-Zika virus (ChimeriVax-Zika) as a live-attenuated Zika virus vaccine. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 13206. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31375-9>.
  43. Bonaldo M.C., Sequeira P.C., Galler R. The yellow fever 17D virus as a platform for new live attenuated vaccines. *Hum. Vaccines Immunother.* 2014; 10(5): 1256–65. <https://doi.org/10.4161/hv.28117>.
  44. Bredenbeek P.J., Molenkamp R., Spaan W.J., Deubel V., Marianneau P., Salvato M.S., et al. A recombinant Yellow Fever 17D vaccine expressing Lassa virus glycoproteins. *Virology*. 2006; 345(2): 299–304. <https://doi.org/10.1016/j.viro.2005.12.001>.
  45. Jiang X., Dalebout T.J., Bredenbeek P.J., Carrion R. Jr., Brasky K., Patterson J., et al. Yellow fever 17D-vectored vaccines expressing Lassa virus GP1 and GP2 glycoproteins provide protection against fatal disease in guinea pigs. *Vaccine*. 2011; 29(6): 1248–57. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.11.079>.
  46. Busch E., Kubon K.D., Mayer J.K.M., Pidelaserra-Martí G., Albert J., Hoyler B., et al. Measles vaccines designed for enhanced CD8+ T cell activation. *Viruses*. 2020; 12(2): 242. <https://doi.org/10.3390/v12020242>.
  47. A Trial to Evaluate the Optimal Dose of MV-LASV. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04055454> (accessed December 15, 2020).
  48. Crystal R.G. Adenovirus: The first effective in vivo gene delivery vector. *Hum. Gene Ther.* 2014; 25(1): 3–11. <https://doi.org/10.1089/hum.2013.2527>.
  49. Maruyama J., Mateer E.J., Manning J.T., Sattler R., Seregin A.V., Bukreyeva N., et al. Adenoviral vector-based vaccine is fully protective against lethal Lassa fever challenge in Hartley guinea pigs. *Vaccine*. 2019; 37(45): 6824–31. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.09.030>.
  50. Lukashevich I.S., Patterson J., Carrion R., Moshkoff D., Ticer A., Zapata J., et al. A live attenuated vaccine for Lassa fever made by reassortment of Lassa and Mopeia viruses. *J. Virol.* 2005; 79(22): 13934–42. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.22.13934-13942.2005>.
  51. Carrion R. Jr., Patterson J.L., Johnson C., Gonzales M., Moreira C.R., Ticer A., et al. A ML29 reassortant virus protects guinea pigs against a distantly related Nigerian strain of Lassa virus and can provide sterilizing immunity. *Vaccine*. 2007; 25(20): 4093–102. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.02.038>.
  52. Zapata J.C., Poonia B., Bryant J., Davis H., Ateh E., George L., et al. An attenuated Lassa vaccine in SIV-infected rhesus macaques does not persist or cause arenavirus disease but does elicit Lassa virus-specific immunity. *Virol. J.* 2013; 10: 52. <https://doi.org/10.1186/1743-422x-10-52>.
  53. Zhang L., Marriott K.A., Harnish D.G., Aronson J.F. Reassortant analysis of guinea pig virulence of Pichinde virus variants. *Virol. J.* 2001; 290(1): 30–8. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1127>.

54. Lukashovich I.S. Generation of reassortants between African arenaviruses. *Virology*. 1992; 188(2): 600–5. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90514-p](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90514-p).
55. Riviere Y., Ahmed R., Southern P.J., Buchmeier M.J., Oldstone M.B. Genetic mapping of lymphocytic choriomeningitis virus pathogenicity: virulence in guinea pigs is associated with the L RNA segment. *J. Virol.* 1985; 55(3): 704–9. <https://doi.org/10.1128/jvi.55.3.704-709.1985>.
56. Gary E.N., Weiner D.B. DNA vaccines: prime time is now. *Curr. Opin. Immunol.* 2020; 65: 21–7. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.01.006>.
57. Smith T.R.F., Patel A., Ramos S., Elwood D., Zhu X., Yan J., et al. Immunogenicity of a DNA vaccine candidate for COVID-19. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 2601. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16505-0>.
58. Cashman K., Broderick K.E., Wilkinson E.R., Shaia C.I., Bell T.M., Shurtleff A.C., et al. Enhanced efficacy of a codon-optimized DNA vaccine encoding the glycoprotein precursor gene of Lassa virus in a Guinea pig disease model when delivered by dermal electroporation. *Vaccines (Basel)*. 2013; 1(3): 262–77. <https://doi.org/10.3390/vaccines1030262>.
59. Cashman K.A., Wilkinson E.R., Shaia C.I., Facemire P.R., Bell T.M., Bearss J.J., et al. A DNA vaccine delivered by dermal electroporation fully protects cynomolgus macaques against Lassa fever. *Hum. Vaccines Immunother.* 2017; 13(12): 2902–11. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1356500>.
60. Safety, Tolerability and Immunogenicity of INO-4800 in Healthy Volunteers. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04336410> (accessed December 15, 2020).
61. Dose-ranging Study: Safety, Tolerability and Immunogenicity of INO-4500 in Healthy Volunteers in Ghana; 2019. Available at: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04093076> (accessed December 15, 2020).
62. McCormick J.B., Mitchell S.W., Kiley M.P., Ruo S., Fisher-Hoch S.P. Inactivated Lassa virus elicits a non protective immune response in rhesus monkeys. *J. Med. Virol.* 1992; 37(1): 1–7. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890370102>.
63. Cai Y., Iwasaki M., Motooka D., Liu D.X., Yu S., Cooper K., et al. A lassa virus live-attenuated vaccine candidate based on rearrangement of the intergenic region. *mBio*. 2020; 11(2): e00186–20. <https://doi.org/10.1128/mbio.00186-20>.
64. Cai Y., Ye C., Cheng B., Nogales A., Iwasaki M., Yu S., et al. A lassa fever live-attenuated vaccine based on codon deoptimization of the viral glycoprotein gene. *mBio*. 2020; 11(1): e00039–20. <https://doi.org/10.1128/mbio.00039-20>.
65. Kainulainen M.H., Spengler J.R., Welch S.R., Coleman-McCray J.D., Harmon J.R., Klens J.D., et al. Use of a scalable replicon-particle vaccine to protect against lethal Lassa virus infection in the Guinea pig model. *J. Infect. Dis.* 2019; 217(12): 1957–66. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy123>.
66. Pushko P., Geisbert J., Parker M., Jahrling P., Smith J. Individual and bivalent vaccines based on alphavirus replicons protect Guinea pigs against infection with Lassa and Ebola viruses. *J. Virol.* 2001; 75(23): 11677–85. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.23.11677-11685.2001>.



## Изучение чувствительности лабораторных животных к вирусу SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*)

Петрова Н.В.<sup>1,2</sup>, Ганина К.К.<sup>2</sup>, Тарасов С.А.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ООО «НПФ «Материя Медика Холдинг», 129272, Москва, Россия

Вследствие пандемии новой коронавирусной инфекции (НКИ) мировое научное сообщество было вынуждено изменить направление большинства исследований, сосредоточив силы на создании вакцины, а также поиске новых противовирусных препаратов для лечения COVID-19. Выбор экспериментальных моделей, временного периода и подходов для оценки разрабатываемых лекарственных средств и вакцин имеет важнейшее значение для выработки эффективных мер по профилактике и борьбе с этим заболеванием.

Цель настоящего обзора – обобщение актуальных данных относительно чувствительности лабораторных моделей к новому коронавирусу SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*). Работа содержит описание наиболее восприимчивых к нему видов животных, которые могут быть использованы для воспроизведения НКИ, с изложением основных достоинств и недостатков каждого из них.

Для моделирования инфекционного процесса при COVID-19 обычно выбирают мелких грызунов (*Rodentia*) и нечеловекообразных приматов (*Strepsirrhini*). В качестве основных маркеров патологии рассматривают вирусную нагрузку в верхних и нижних отделах дыхательной системы, клинические симптомы (потеря массы тела, температура тела и общее состояние животных), патоморфологическую картину в органах-мишенях, а также выработку антител (АТ) после инфицирования. Несмотря на обширный объем данных, ни одна из описанных моделей заражения SARS-CoV-2 пока не может считаться эталонной, так как не воспроизводит весь спектр морфологических и патогенетических механизмов инфекции, а также не отражает в полной мере клиническую картину, наблюдаемую у пациентов в человеческой популяции.

На основании проведенного анализа литературных данных мы полагаем, что сирийский хомячок (*Mesocricetus auratus*) и мыши (*Muridae*), экспрессирующие рецептор ангиотензинпревращающего фермента 2 (АПФ2), являются наиболее чувствительными видами для использования в подобных экспериментах. Выработка нейтрализующих АТ позволяет оценить эффективность вакцинных препаратов, а течение и выраженность симптомов делает использование мышей и хомячков особенно востребованным для скрининга фармакологических веществ с противовирусным действием, введение которых может предотвратить либо замедлить прогрессирование болезни.

**Ключевые слова:** SARS-CoV-2, экспериментальные модели *in vivo*, патогенез

**Для цитирования:** Петрова Н.В., Ганина К.К. Тарасов С.А. Изучение чувствительности лабораторных животных к вирусу SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(2): 103-111. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-47>

**Для корреспонденции:** Петрова Наталия Владимировна, научный сотрудник лаборатории физиологически активных веществ, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии», 125315, Москва, Россия; старший научный сотрудник, ООО «НПФ «Материя Медика Холдинг», 129272, Москва, Россия. E-mail: [nataliyaarpetrova89@gmail.com](mailto:nataliyaarpetrova89@gmail.com), [physactive@yandex.ru](mailto:physactive@yandex.ru)

**Участие авторов:** Петрова Н.В. – поиск и отбор публикаций, анализ литературных данных, обеспечение достоверности результатов; Ганина К.К. – анализ публикаций, подготовка окончательного текста статьи; Тарасов С.А. – анализ публикаций, подготовка окончательного текста статьи.

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность сотрудникам компании ООО «НПФ «Материя Медика Холдинг» – Е.А. Горбунову (начальник отдела научной информации) и А.Г. Емельяновой (старший научный сотрудник) за участие в обсуждении и рекомендации при подготовке статьи.

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

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

Поступила: 29.12.2020

Принята к печати: 27.03.2021

## Susceptibility of animal species to experimental SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) infection

Natalia V. Petrova<sup>1,2</sup>, Ksenia K. Ganina<sup>2</sup>, Sergey A. Tarasov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>FSBRI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 125315, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>ООО «NPF «Materia Medica Holding», 129272, Moscow, Russia

Due to the new coronavirus infection pandemic, the global scientific community has been forced to change the direction of the most research, focusing on vaccine development as well as the search for new antiviral drugs to

treat COVID-19. The choice of experimental models, timeframe and approaches for evaluating drugs and vaccines under development is crucial for the development of effective measures to prevent and control this disease.

The purpose of this review was to summarize the relevant data concerning the susceptibility of laboratory animals to SARS-CoV-2. This paper describes the most virus-susceptible animal species that can be used to reproduce coronavirus infection, stressing the main advantages and disadvantages of each of them.

According to the latest data, small rodents (*Rodentia*) and non-human primates (*Strepsirrhini*) are commonly used in the scientific community to model coronavirus infection. The viral load in the upper and lower parts of the respiratory system, clinical symptoms of infection (weight loss, body temperature and general health status), pathomorphological picture in target organs and the production of antibodies after infection are considered to be the main markers of pathology. Despite the vast amount of data, none of the described models of SARS-CoV-2 infection may be considered a gold standard, since they do not reproduce all spectrum of morphological and pathogenetic mechanisms of infection, and do not fully reflect the clinical picture observed in patients in human population.

Based on the analyzed literature data, we suppose that Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) and mice (*Muridae*) expressing the angiotensin converting enzyme receptor 2 (ACE2) are the most suitable animal species for their use in experiments with SARS-CoV-2 infection. The development of neutralizing antibodies makes it possible to evaluate the efficacy of vaccines, while the course and severity of symptoms infection makes the use of mice and hamsters especially popular for screening pharmacological substances with antiviral mechanism of action, when their administration can prevent or slow the disease progression.

**Key words:** SARS-CoV-2, *in vivo* experimental, pathogenesis

**For citation:** Petrova N.V., Ganina K.K., Tarasov S.A. Susceptibility of animal species to experimental to SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) infection. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(2): 103-111 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-47>

**For correspondence:** Petrova Natalia Vladimirovna, Researcher of Laboratory of the Physiologically Active Substances, FSBRI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», 125315, Moscow, Russia; Senior Researcher, OOO «NPF «Materia Medica Holding», 129272, Moscow, Russia.

E-mail: [nataliyaapetrova89@gmail.com](mailto:nataliyaapetrova89@gmail.com), [physactive@yandex.ru](mailto:physactive@yandex.ru)

**Information about the authors:**

Petrova N.V., <http://orcid.org/0000-0002-2192-7302>

Ganina K.K., <http://orcid.org/0000-0003-1571-6338>

Tarasov S.A., <https://orcid.org/0000-0002-6650-6958>

**Contribution:** Petrova N.V. – search and selection of publications, analysis of literature data, ensuring the reliability of the results; Ganina K.K. – analysis of publications, preparation of the final text of the article; Tarasov S.A. – analysis of publications, preparation of the final text of the article.

**Acknowledgement.** The authors acknowledge to the employees of OOO «NPF «Materia Medica Holding» E.A. Gorbunov (the head of scientific information department) and A.G. Emelyanova (senior researcher) for participating in the discussion and providing recommendations during preparation of the article.

**Funding.** The study had no sponsorship.

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

Received: 29 December 2020

Accepted: 27 March 2021

## Введение

Вспышка новой коронавирусной инфекции (НКИ) COVID-19, причиной которой стал вирус SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*), показала, что вирусные заболевания по-прежнему остаются одной из глобальных проблем мирового здравоохранения.

На момент написания настоящего обзора (конец 2020 г.) численность заболевших НКИ по всему миру превышала 30 млн; 950 тыс. случаев закончились летальным исходом [1]. Темпы распространения, уровень смертности и общее количество осложнений от COVID-19 диктуют необходимость проведения полномасштабных доклинических исследований с целью поиска эффективных препаратов и вакцин для её лечения и профилактики. В ходе решения этой задачи требуются валидированные модели животных, позволяющие наиболее полно воспроизвести патогенез заболевания. Уже сейчас имеется достаточное количество работ, описывающих эксперименты на мел-

ких грызунах (*Rodentia*) [2–11] и нечеловекообразных приматах (*Strepsirrhini*) [12–17]. Тем не менее кинетика репликации вируса, скорость развития и тяжесть течения болезни у разных видов отличаются [18]. Кроме того, ни одна из воспроизведённых экспериментальных моделей НКИ полностью не отражает весь спектр клинических симптомов, сопутствующих этой инфекции в человеческой популяции. В связи с этим целью настоящей работы явилось обобщение имеющихся в литературе данных о чувствительности различных видов животных к заражению вирусом SARS-CoV-2.

Настоящая статья написана на основе стандартного набора методов для подготовки обзоров. Поиск публикаций проводился с мая по август 2020 г. (Петрова Н.В.) в базах данных PubMed, Medline и bioRxiv.

Использовали следующие сочетания ключевых слов: «severe acute respiratory syndrome coronavirus 2» AND «mice»; «severe acute respiratory syndrome coronavirus 2» AND «mouse»; «severe acute respirato-

ry syndrome coronavirus 2» AND «hamsters»; «severe acute respiratory syndrome coronavirus 2» AND «ferrets»; «severe acute respiratory syndrome coronavirus 2» AND «nonhuman primate»; «severe acute respiratory syndrome coronavirus 2» AND «rhesus macaque».

Критерии включения: статья посвящена моделированию НКИ у животных (с описанием вида, линии, пола и возраста); изложен путь заражения (включая дозу) животных; оценены параметры, указывающие на развитие НКИ.

Критерии исключения: тезисы; результаты исследований *in vitro*; результаты клинических исследований.

Работы были отфильтрованы вручную (Петрова Н.В.) так, чтобы в обзор вошли только написанные на английском языке оригинальные статьи. Результаты исследований проанализированы и обсуждены всеми соавторами. Для обзора отобраны результаты 24 исследований.

Экспериментальные данные, использованные при написании обзора, включали: вид, возраст и линию животных, клинические симптомы инфекции, данные о выработке АТ, а также сведения о возможности передачи SARS-CoV-2 между животными.

### Структурные особенности вируса SARS-CoV-2

Прежде чем приступить к описанию доклинических моделей НКИ, необходимо кратко охарактеризовать морфопатогенетические особенности её возбудителя. Это позволит определить наиболее восприимчивые мишени патогена и оценить межвидовые различия животных для дальнейших экспериментов *in vivo*.

SARS-CoV-2 – одноцепочечный (+)РНК-вирус, относящийся к роду бета-коронавирусов (*Betacoronavirus*) [19]. Вирион представляет собой шарообразную частицу размером 50–200 нм, окружённую липидной оболочкой, с 3 встроенными белковыми структурами, важнейшей из которых является спайковый (или шиповидный) S-белок [14]. Именно последний играет основную роль в слиянии вириона с цитоплазматической мембраной клетки хозяина. В структуре S-белка различают 2 субъединицы: S1 и S2. Первая формирует «головку» белка, а её рецептор-распознающий домен связывается с клеточным рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 (АПФ2) и инициирует процесс заражения с последующим запуском эндоцитоза вириона. Субъединица S2, в свою очередь, состоит из области пептида слияния и 2 областей гептадных повторов (HR1 и HR2) [20]. Под действием протеаз внутри эндосомы субъединица S1 отщепляется, высвобождая пептид слияния, который затем внедряется в мембрану клетки хозяина. Это приводит к слиянию мембран с высвобождением вирусного содержимого [21]. Для активации S-белка и облегчения проникновения вируса в клетку необходим также ряд ферментов, например клеточная мембраносвязывающая сериновая протеаза 2 (TMPRSS2) [22]. Именно поэтому одним из путей разработки терапевтических средств в отношении SARS-CoV-2 является блокирование не только целевого рецептора АПФ2, но и протеазы TMPRSS2. N. Iwata-Yoshikawa и соавт. (2020)

[23] продемонстрировали, что ингибиторы последней способны предотвращать внутриклеточное проникновение вируса. Следует отметить, что SARS-CoV-2 может связываться с ещё одним клеточным рецептором хозяина – CD147 [24], что расширяет возможности для создания биофармакологических препаратов в борьбе с НКИ.

В состав вирусной липидной мембраны помимо шиповидного S-белка входят мембранный (M) протеин и белок оболочки (E). Оба они играют ключевую роль в сборке вируса, высвобождении его содержимого и дальнейших стадиях патогенеза заболевания [25, 26], а также могут участвовать в процессе уклонения возбудителя от распознавания системой врождённого иммунитета. Показано, что M-белок принимает участие в подавлении путей передачи сигналов интерферонов (ИФН) I типа и фактора инициации трансляции NF-κB [27]. Четвёртой белковой структурой является белок нуклеокапсида (N), основная функция которого – сохранение РНК в устойчивом состоянии внутри вирусной оболочки [28].

Наряду со структурными протеинами геном SARS-CoV-2 представлен и неструктурными белками – ORF (ORF1ab, -3a, -6, -7a, -8, -10) и NSP (NSP1–NSP10, NSP12–NSP16), выполняющими ряд задач, начиная от создания вирусных копий и заканчивая подавлением иммунологических реакций организма хозяина. В частности, NSP16 маскирует патоген от иммунной системы, препятствуя распознаванию РНК цитоплазматическими рецепторами RLR и MDA5. Белки ORF3b и ORF6 способны подавлять продукцию ИФН I типа и нисходящий сигнальный каскад [27], ORF8 – экспрессию белков главного комплекса гистосовместимости (major histocompatibility complex, MHC) I класса [29], нарушая таким образом презентацию антигена Т-клеткам. ORF8 примечателен тем, что в значительной степени отличается от аналогичных белковых структур других коронавирусов [30], тем самым выступая в качестве ещё одной терапевтической мишени.

### Виды животных, используемые для инфицирования SARS-CoV-2

Показано, что некоторые виды животных восприимчивы к SARS-CoV-2 как в естественных условиях, так и в эксперименте. Эти сведения суммированы в **таблице**.

### Моделирование коронавирусной инфекции на грызунах

#### Мыши

Попытки выявить репликацию SARS-CoV-2 у лабораторных линий мышей (*Muridae*) оказались безуспешными [40]. Резистентность их к возбудителю, по-видимому, связана с различиями строения человеческого и мышиного рецептора АПФ2 [41]. Именно поэтому в экспериментальных моделях НКИ, вызванной SARS-CoV-2, используют генетически трансформированных (трансгенных) представителей данного вида. В зависимости от дозы, применяемой в экспе-

**Чувствительность различных видов животных к SARS-CoV-2**

**Susceptibility of different species of animals to SARS-CoV-2 infection**

Вид Species	Клинические признаки Clinical signs	Антитела Antibodies	Внутривидовая передача вируса Cross-species virus transmission	Источник Reference
Отряд Class				
Грызуны Rodents <i>Rodentia</i>				
Мыши (с экспрессией АПФ2-рецепторов) Mice (with ACE2 expression) <i>Muridae</i>	Репликация вируса в лёгких, потеря массы тела, инфильтрация клеток, очаговые кровоизлияния, повреждение сосудистой системы лёгкого. Развитие интерстициальной пневмонии Viral replication in the lungs, weight loss, cell infiltration, focal hemorrhages, and lesions of the pulmonary vasculature. Development of interstitial pneumonia	+	+	[4, 6, 31–34]
Сирийский хомячок Syrian hamster <i>Mesocricetus auratus</i>	Репликация вируса в верхних и нижних отделах дыхательных путей, потеря массы тела. Развитие бронхогенной пневмонии Viral replication in the upper and lower respiratory tract and weight loss. Development of bronchopneumonia	+	+	[2, 9–11, 35]
Хищные Carnivore <i>Carnivora</i>				
Хорьки Ferrets <i>Mustela</i>	Репликация вируса преимущественно в верхних отделах дыхательных путей, потеря массы тела, повышение температуры тела. Острый бронхит Viral replication predominantly in the upper respiratory tract, weight loss and fever. Acute bronchitis	+	+	[3, 7, 8, 36]
Кошки Cats <i>Felis catus</i>	Репликация вируса в верхних отделах дыхательных путей. Клинические симптомы выражены слабо или отсутствуют Viral replication in the upper respiratory tract. Clinical symptoms are either mild or absent	+	+	[7]
Собаки Dogs <i>Canis familiaris</i>	Вирусная РНК детектирована только в мазках кала. Клинические симптомы отсутствуют Viral RNA is only detected in fecal extracts. Clinical symptoms are absent	–	–	[7]
Приматы. Нечеловекообразные обезьяны Non-human primates <i>Primates: Strepsirrhini</i>				
Макак-резус Rhesus macaque <i>Macaca rhesus</i> ( <i>Macaca mulatta</i> )	Репликация вируса в верхних и нижних отделах дыхательных путей и/или некоторых отделах пищеварительной системы. Вялость, обезвоживание, спонтанный кашель. Развитие интерстициальной пневмонии Viral replication in the upper and lower respiratory tract and/or in some parts of the gastrointestinal tract. Fatigue, dehydration and spontaneous cough. Development of interstitial pneumonia	+	н.д. n.d.	[15–17, 37, 38]
Африканский бабуин African baboon <i>Papio cynocephalus</i>	Репликация вируса в верхних и нижних отделах дыхательных путей. Потеря массы тела, вялость. Развитие интерстициальной пневмонии Viral replication in the upper and lower respiratory tract. Weight loss and fatigue. Development of interstitial pneumonia	н.д. n.d.	н.д. n.d.	[14]
Обыкновенная игрунка Common marmoset <i>Callithrix jacchus</i>	Репликация вируса в верхних отделах дыхательных путей. Гистопатологическая картина в лёгких выражена слабо Viral replication in the upper respiratory tract. Histopathological changes in the lungs are mild	н.д. n.d.	н.д. n.d.	[14]
Зелёная мартышка Green monkey <i>Chlorocebus sabaeus</i>	Репликация вируса в верхних и нижних отделах дыхательных путей. Снижение аппетита и вялость. Развитие интерстициальной пневмонии Viral replication in the upper and lower respiratory tract. Loss of appetite and fatigue. Development of interstitial pneumonia	+	н.д. n.d.	[13, 39]

**Примечание.** «+» – имеется; «–» – не имеется; н.д. – нет данных.

**Note.** «+» – present; «–» – absent; n.d. – no data available.

рименте, путей заражения, возраста животных и способов введения генов АПФ2-рецепторов возможно моделирование различных по степени выраженности клинических состояний.

Анализ экспериментальных данных установил, что интраназальное заражение мышей вирусом SARS-CoV-2 может вести к различному по тяжести течению инфекции – от отсутствия летальности до 100%-ной гибели животных. В работах L. Bao и соавт. (2020) [4], S.H. Sun и соавт. (2020) [5] инфицирование мышей дикого типа ( $\sim 2,8 \times 10^5$  БОЕ; БОЕ – бляшкообразующая единица) и особой линии C57BL/6, экспрессирующих человеческий АПФ2-рецептор ( $4,0 \times 10^5$  БОЕ), не приводило к их гибели и коррелировало с относительно низкой вирусной нагрузкой в лёгких. J. Sun и соавт. (2020) [31] продемонстрировали, что заражение мышей BALB/c и C57BL/6 ( $1,0 \times 10^5$  БОЕ), с введением рекомбинантного аденовирусного вектора (d5hACE2) также не вызывало летальных исходов, однако в результате имела место умеренная репликация патогена в лёгочной ткани, достигавшая величины 6–7 lg БОЕ/мл на 2 сут. В противоположность этому J.W. Golden и соавт., R.D. Jiang и соавт. (2020) [32, 33] показали, что инфицирование АПФ2-экспрессирующих моделей линии K18 ( $1,0 \times 10^4$  и  $2,0 \times 10^4$  БОЕ соответственно) в 100% случаев было смертельным, характеризуясь отчётливой взаимосвязью с полом животных.

Гистоморфологическая картина органа-мишени согласовывалась с показателями вирусной нагрузки и смертности; преимущественно выявляли инфильтрацию клеток, утолщение альвеолярной перегородки, отёк, очаговые кровоизлияния и характерные повреждения сосудистой системы лёгкого [4, 5, 31–33].

Среди основных симптомов НКИ у животных во всех экспериментах отмечали потерю массы тела, которая была минимальной по данным L. Bao и соавт. [4] (10%), тогда как согласно J. Sun и соавт. [31] этот показатель достигал 20% от исходных значений и был несколько выше для мышей BALB/c. Наиболее ярко тяжесть течения НКИ была выражена у АПФ2-особей линии K18: животные теряли до 20% (некоторые – до 30%) массы тела; во всех случаях были характерны вялость и одышка. S.H. Sun и соавт. (2020) [5] описали взаимосвязь между возрастом животных и клиническими проявлениями, отметив отсутствие симптоматики у молодых особей (4–5 нед). В рамках этой же работы исследователи показали чувствительность моделей к интрагастральному заражению SARS-CoV-2 ( $4,0 \times 10^6$  БОЕ), что проявлялось репликацией вируса в тканях лёгкого, трахеи и головного мозга. Однако выраженность признаков инфекции была значительно ниже по сравнению с интраназальным введением патогена.

Использование трансгенных линий может быть полезным и в уточнении механизмов формирования патологического процесса. С целью изучения возможного вклада в передачу сигналов ИФН при заражении SARS-CoV-2 использованы АПФ2-мыши с делецией генов *IFNAR*<sup>-/-</sup>, *IFN $\gamma$* <sup>-/-</sup> и *STAT1*<sup>-/-</sup> [31]. Инфицированные *STAT1*<sup>-/-</sup>-животные ( $1,0 \times 10^5$  БОЕ) теря-

ли массу тела интенсивнее по сравнению с другими группами; в лёгочной ткани отмечали обширную клеточную инфильтрацию с отсрочкой клиренса патогена. Полученные данные указывают на ключевую роль передачи сигналов ИФН I типа и STAT1 в ответ на НКИ, что указывает на терапевтический потенциал препаратов рекомбинантного ИФН или индукторов пути STAT1.

Таким образом, использование мышей для моделирования НКИ имеет ряд преимуществ: доступность и простота работы, возможность использования инбредных линий и воспроизведения различных по степени выраженности клинических состояний (от лёгких до тяжёлых форм). Лёгкое или среднетяжёлое течение инфекционного процесса у представителей данного вида предоставляет возможность изучения потенциальных путей коррекции и профилактики заболевания именно на ранних, обратимых в морфофункциональном отношении стадиях, что повышает ценность этих моделей. В то же время однородность и воспроизводимость экспериментальных данных, полученных на инбредных линиях, является одновременно преимуществом и недостатком. Особи конкретной инбредной линии генетически идентичны, и маловероятно, что в пределах одной линии могут быть смоделированы все комплексные патогенетические механизмы болезни.

#### Сирийский хомячок

Этот вид (*Mesocricetus auratus*) является весьма подходящим объектом для изучения эффективности противовирусных препаратов и вакцин против SARS-CoV-2. Клеточный рецептор АПФ2 этих животных обладает высоким сродством к вирусу, что отражается на степени выраженности симптомов инфекции в малом временном промежутке. Инфицирование сопровождается виремией (уже на 2–3 сут), патологическими изменениями в ткани лёгкого, включая развитие альвеолярной инфильтрации и пневмонии. Последнее является основным осложнением при НКИ у людей [42]. Действительно, в работе M. Imai и соавт. (2020) [2] интраназальное заражение хомячков как в низкой ( $1,0 \times 10^3$  БОЕ), так и в высокой ( $1,0 \times 10^5$ – $10^6$  БОЕ) дозе приводило к репликации вируса в верхних и нижних отделах дыхательных путей (7–8 lg БОЕ/г). Пик репродукции в лёгких для обеих доз наступал на 3 сут после инфицирования. Гистопатологические изменения лёгочной ткани проявлялись альвеолярной консолидацией с образованием воспалительных очагов различного размера, клеточной инфильтрацией в области интерстиция, отёком и альвеолярными кровоизлияниями. Описанные признаки в случае высокой дозы заражения проявлялись уже на 3, а для низкой – на 6 сут. На момент окончания исследования (12 сут от инфицирования) патологическая картина в лёгких в обоих случаях улучшалась. При этом отчётливой корреляции между возрастом животных и выраженностью НКИ не выявлено.

Наиболее значительные возрастные изменения отмечены для показателей массы тела животных. За-

ражённные высокой дозой SARS-CoV-2 ( $1,0 \times 10^5$ – $10^6$  БОЕ) 8-месячные особи теряли порядка 25% массы, тогда как для молодых (4–5 нед) показатель колебался в пределах 10–12% от исходных значений.

Кроме того, J.F. Chan и соавт., а также S.F. Sia и соавт. показали, что SARS-CoV-2 может эффективно передаваться от заражённых ( $1,0 \times 10^5$  и  $\sim 5,6 \times 10^5$  БОЕ соответственно) к совместно живущим (контактным), но не инфицированным хомячкам [9, 11]. В обоих опытах удалось установить факт прямой передачи возбудителя. Инфекция проявлялась потерей массы тела (~10%) и репликацией вируса преимущественно в верхних отделах дыхательных путей на протяжении первых суток после заражения. Наконец, у данного вида происходила выработка нейтрализующих АТ [2, 35].

Сирийский хомячок может быть также использован для установления и изучения патогенетических механизмов развития COVID-19. R. Boudewijns и соавт. (2020) [10] провели сравнительное исследование, в котором заражали ( $\sim 1,4 \times 10^5$  БОЕ) особей дикого типа и животных с отсутствием генов *STAT2* и *IL28R-a*. Во всех случаях инфицирование приводило к раннему пику репродукции вируса в лёгких, выраженной виремии с внелёгочным распространением процесса. По сравнению с особями дикого типа у животных с *IL28R-a*–/– регистрировался высокий уровень репликации в сочетании с умеренным воспалительным ответом и поражением лёгочной ткани. Иная картина имела место в случае делеции *STAT2*–/–: высокий уровень виремии, быстрое распространение возбудителя, его размножение в селезёнке, печени, верхнем и нижнем отделах желудочно-кишечного тракта. Патоморфологическая картина в лёгких ограничивалась инфильтрацией полиморфно-ядерными лейкоцитами и детекцией нескольких апоптотных телец в стенках бронхов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о существенном вкладе сигнального пути *STAT2* в ограничение системного распространения вируса и подавление его внелёгочной репликации, тогда как ИФН III типа, по-видимому, ответствен за элиминацию патогена из ткани лёгких.

На основании проанализированных литературных данных можно сделать вывод, что сирийский хомячок является весьма перспективной моделью для разработки моделей НКИ, поскольку его заражение воспроизводит клиническую картину, в достаточной степени сопоставимую с наблюдаемой в группе пациентов с умеренным и среднетяжёлым течением инфекции. Экспериментальный цикл (время от момента инфицирования до полного выздоровления) у рассматриваемого вида (как и в случае с мышами) относительно короткий (не более 2 нед). Выработка нейтрализующих АТ против антигенов SARS-CoV-2 – дополнительное преимущество модели, подкрепляемое возможностью не прямой передачи вируса у этих животных.

### Хорьки

Хорьки (*Mustela*) являются ещё одним объектом в изучении респираторных вирусных заболеваний человека, поскольку восприимчивы к некоторым их

возбудителям, включая вирус гриппа [43], респираторно-синцитиальный вирус и SARS-CoV [44, 45]. Несомненными преимуществами вида являются сходное с таковым у человека строение органов респираторной системы и, как следствие, наличие сходных клинических проявлений болезни. Кроме того, учитывая сходство организации АПФ2-рецептора хорьков с SARS-CoV [46], использование этих животных для моделирования НКИ представляет несомненный интерес. Подтверждением являются данные Y.I. Kim и соавт. (2020) [3], M. Richard и соавт. (2020) [8], показавших, что интраназальное заражение взрослых особей хорька ( $\sim 2,2 \times 10^5$  и  $\sim 4,2 \times 10^5$  БОЕ соответственно) приводит к репликации, передаче вируса и образованию АТ. Пик репродукции наступал на 3–4 сут и снижался к 7–9 сут после инфицирования. Незначительное количество копий РНК SARS-CoV-2 детектировали в кишечнике всех заражённых животных. Репликация патогена в носовых ходах в эксперименте Y.I. Kim и соавт. (2020) [3] протекала активнее, чем в лёгких ( $3,83 \lg_{10}$  и  $2 \lg_{10}$  ТЦИД<sub>50</sub>/мл соответственно; ТЦИД – тканевая цитопатическая инфекционная доза). Среди симптомов инфекции отмечали высокую температуру тела (до  $40,3 \text{ }^\circ\text{C}$ ) и характерный для заболевания кашель.

Одно из значимых преимуществ этой модели – успешная передача возбудителя. В обоих исследованиях показано, что SARS-CoV-2 может успешно передаваться как прямым (заражённые и незаражённые особи содержались в одной клетке), так и непрямым (животные находились в разных клетках) путями. В первом случае у подопытных высевали РНК из верхних отделов дыхательных путей и кишечного тракта с последующим обнаружением АТ в сыворотке крови. Непрямая передача также характеризовалась наличием вирусного генетического материала в изучаемых органах-мишенях с незначительной временной отсрочкой регистрации пика репродукции и более низкими показателями АТ.

Несмотря на однозначное преимущество данного вида в вопросе изучения передачи вируса SARS-CoV-2, моделирование НКИ в этом случае ограничено лёгким течением инфекции с относительно невысокой нагрузкой патогена в лёгочной ткани инфицированных особей. Кроме того, большая по сравнению с мелкими грызунами трудоёмкость содержания хорьков и ухода за ними также затрудняет их экспериментальное использование.

### Моделирование коронавирусной инфекции: нечеловекообразные приматы

Нечеловекообразные обезьяны служат естественным резервуаром для возбудителей многих инфекций. Эти животные могут использоваться для тестирования безопасности и эффективности лекарственных средств терапии и профилактики инфекционных заболеваний человека, включая лихорадку Зика [47], Эбола [48] и COVID-19 [14]. При этом полученные результаты требуют минимальной коррекции при экстраполяции на человека. Однако сами эксперимен-

ты являются дорогостоящими, а этические аспекты ограничивают размер выборки. Кроме того, нечеловекообразные приматы не подходят для создания трансгенных и нокаутных линий [49].

### Макак-резусы

По данным литературы макак-резусы (*Macaca rhesus*, *Macaca mulatta*) высоко- или умеренно чувствительны к заражению SARS-CoV-2 [14–16, 37, 38]. Во всех работах инфицирование осуществляли с использованием нескольких путей введения патогена (преимущественно интраназально и эндотрахеально). Сочетанное заражение животных ( $\sim 10^5$ – $10^6$  БОЕ) не приводило к их гибели, однако способствовало развитию симптомов НКИ [15, 37], среди которых отмечали вялость, потерю массы тела и нерегулярную частоту дыхательных движений. Активная репродукция SARS-CoV-2 выявлялась как в верхних, так и нижних отделах дыхательных путей с достижением пиковых значений на 1–2 сут после инфицирования. Однако J. Yu и соавт., W. Deng и соавт. (2020) [16, 38] не наблюдали подобного эффекта; у заражённых особей ( $\sim 10^4$ – $10^5$  БОЕ) также отсутствовала виремия, что объясняется использованием меньшей дозы патогена. Патоморфологическая картина в лёгких была представлена многоочаговыми поражениями с развитием лёгкой и умеренной формы интерстициальной пневмонии. Отмечались утолщение альвеолярных перегородок, накопление воспалительного экссудата с клеточной инфильтрацией (преимущественно макрофагами и нейтрофилами) в очаге воспаления.

D.K. Singh и соавт. (2020) [14] продемонстрировали активную миграцию CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> Т-клеток ( $1,05 \times 10^6$  БОЕ) с нарушенным профилем экспрессии их маркёров. Для популяции CD4<sup>+</sup> была характерна низкая экспрессия маркёра CD69 (ранний антиген активации Т-лимфоцитов), рецепторов CXCR3 и CCR7, а также антигенов МНС II класса HLA-DR, тогда как уровень Т-клеток, экспрессирующих белки отрицательной регуляции иммунной системы (PD-1 и LAG-3), был значительно выше, что косвенно свидетельствует о нарушении процесса презентации антигена при заражении SARS-CoV-2. Выявленные отклонения могут послужить толчком для разработки новых стратегий в терапии НКИ. Кроме того, данные о вовлечённости ИФН I типа и Т-клеток в процесс разрешения инфекционного процесса при НКИ согласуются с результатами работы J. Sun и соавт. (2020) [31], в которой мыши *STAT1*<sup>-/-</sup> имели наиболее выраженные симптомы инфекции.

Для макак-резусов характерна выработка нейтрализующих АТ, и согласно результатам W. Deng и соавт. (2020) [38] эндотрахеальное заражение ( $\sim 7,0 \times 10^5$  БОЕ) обеспечивало продукцию АТ, в последующем защищавших животных от повторного инфицирования. Данных, свидетельствующих о прямой передаче SARS-CoV-2 для этих животных, на момент написания статьи опубликовано не было, однако, ориентируясь на сходство клинической картины болезни у макак-резусов и человека, можно предпо-

ложить, что вирус может успешно передаваться от одной особи к другой.

Эксперименты с инфицированием рассматриваемым вирусом проведены и на других представителях нечеловекообразных обезьян [13, 14]. С. Woolsey и соавт. (2020) [13] показано, что зелёные мартышки (*Chlorocebus sabaeus*) высокочувствительны к комбинированному заражению возбудителем COVID-19 ( $5,0 \times 10^5$  БОЕ): обнаруживалась высокая репродукция вируса в лёгких, приводящая к обширным поражениям тканей. Гистологический анализ лёгочной ткани на 5 сут заражения у животных с тяжёлым течением заболевания выявил многоочаговые повреждения с наиболее выраженными консолидацией и гиперемией в нижних долях обоих лёгких. Патоморфологические признаки острой интерстициальной пневмонии включали присутствие воспалительной экссудации, геморрагии, отёк лёгкого, диффузное альвеолярное повреждение с наличием гиалиновых мембран. В концевых участках дыхательных путей отмечено разрастание ткани, схожее с картиной криптогенной организующейся пневмонии.

Кроме того, течение НКИ сопровождалось сдвигом в структуре субпопуляций лейкоцитов; регистрировались также незначительная тромбоцитопения и повышение уровней сывороточных маркёров воспаления, что указывает на системный ответ в отношении патогена. Выработка АТ начиналась уже на 5 сут после заражения. Тем не менее ярко выраженных клинических симптомов заболевания у этих животных не наблюдали; исключением были снижение аппетита и вялость.

Течение НКИ у бабуинов (*Papio cynocephalus*) при их комбинированном заражении ( $1,05 \times 10^6$  БОЕ) было сходным с таковым у зелёных мартышек ( $1,05 \times 10^6$  БОЕ): имели место высокие титры вируса в верхних и нижних отделах дыхательных путей, потеря массы тела, развитие интерстициальной пневмонии с типичной инфильтрацией альвеолярных перегородок, фиброзом, скоплением гистиоцитов и нейтрофилов в просвете альвеол. У животных развивались бронхит и слабовыраженный трахеит.

Игрунковые обезьяны (*Callitrichidae*) оказались наименее чувствительны к инфекции (при заражении в дозе  $8,8 \times 10^5$  БОЕ) с низкой репликацией патогена в верхних отделах дыхательных путей. Патоморфологическая картина ткани лёгкого характеризовалась незначительными изменениями.

Использование нечеловекообразных приматов, как и любого другого вида, для моделирования COVID-19 имеет ряд преимуществ, наиболее важным из которых выступает сходство иммунной системы данной модели с имеющейся у человека и, как следствие, развитие аналогичных симптомов инфекции. Тем не менее следует учитывать, что выраженность молекулярной мимикрии между белками вируса и хозяина для обезьян может отличаться от проявления данного феномена у человека. Так, разнообразие генов белков МНС у этих животных шире, чем у людей [50]. Совпадение белковых последовательностей вируса и организма хозяина может существенно влиять на выраженность

иммунного ответа и степень риска развития осложнённого аутоиммунного характера. Указанное обстоятельство особенно критично при разработке вакцин [48].

### Заключение

Несмотря на разнообразие описанных *in vivo* моделей острого респираторного синдрома, вызванного вирусом SARS-CoV-2, проведённый нами анализ опубликованных работ позволяет заключить, что сирийский хомячок и мыши, экспрессирующие АПФ2-рецептор, являются наиболее подходящими видами для использования в экспериментах. Это вытекает из доступности их для исследований, достаточной простоты реализации патологического процесса при НКИ, воспроизводимости и валидности результатов. Путём варьирования таких параметров, как возраст, пол и линии животных, доза и путь их заражения, можно смоделировать как лёгкую, так и умеренно тяжёлую формы инфекции, при которых воздействие фармакологических препаратов с противовирусными свойствами способно предотвратить либо замедлить прогрессирование заболевания. Выработка нейтрализующих АТ делает эти модели подходящими и для тестирования вакцин. Кроме того, высокое сродство рецепторов АПФ2 сирийского хомячка к SARS-CoV-2 и возможность прямой передачи вируса между особями позволяют использовать представителей данного вида в процессе изучения механизмов быстрого распространения инфекции. При этом следует отметить, что при выборе конкретной экспериментальной модели необходимо прежде всего руководствоваться целями и задачами исследования.

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- WHO. Weekly epidemiological update – 21 September 2020. Available at: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update---21-september-2020> (accessed December 9, 2020).
- Imai M., Iwatsuki-Horimoto K., Hatta M., Loeber S., Halfmann P.J., Nakajima N., et al. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020; 117(28): 16587–95. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009799117>.
- Kim Y.I., Kim S.G., Kim S.M., Kim E.H., Park S.J., Yu K.M., et al. Infection and rapid transmission of SARS-CoV-2 in ferrets. *Cell Host Microbe*. 2020; 27(5): 704–9.e2. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.023>.
- Bao L., Deng W., Huang B., Gao H., Liu J., Ren L., et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature*. 2020; 583: 830–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2312-y>.
- Sun S.H., Chen Q., Gu H.J., Yang G., Wang Y.X., Huang X.Y., et al. A Mouse Model of SARS-CoV-2 Infection and Pathogenesis. *Cell Host Microbe*. 2020; 28(1): 124–33.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.020>.
- Soldatov V.O., Kubekina M.V., Silaeva Y.Yu., Bruter A.V., Deykin A.V. On the way from SARS-CoV-sensitive mice to murine COVID-19 model. *Res. Results Pharmacol.* 2020; 6(2): 1–7. <https://doi.org/10.3897/rpharmacology.6.53633>.
- Shi J., Wen Z., Zhong G., Yang H., Wang C., Huang B., et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science*. 2020; 368(6494): 1016–20. <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>.
- Richard M., Kok A., de Meulder D., Bestebroer T.M., Lamers M.M., Okba N.M.A., et al. SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 3496. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17367-2>.
- Chan J.F., Zhang A.J., Yuan S., Poon V.K., Chan C.C., Lee A.C., et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(9): 2428–46. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa325>.
- Boudewijns R., Thibaut H.J., Kaptein S.J.F., Li R., Vergote V., Seldeslachts J., et al. STAT2 signaling as double-edged sword restricting viral dissemination but driving severe pneumonia in SARS-CoV-2 infected hamsters. *bioRxiv*. 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.04.23.056838>.
- Sia S.F., Yan L.M., Chin A.W.H., Fung K., Choy K.T., Wong A.Y.L., et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature*. 2020; 583(7818): 834–8. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2342-5>.
- Shan C., Yao Y.F., Yang X.L., Zhou Y.W., Gao G., Peng Y., et al. Infection with novel coronavirus (SARS-CoV-2) causes pneumonia in the rhesus macaques. *Cell Res.* 2020; 30(8): 670–7. <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0364-z>.
- Woolsey C., Borisevich V., Prasad A.N., Agans K.N., Deer D.J., Dobias N.S., et al. Establishment of an African green monkey model for COVID-19. *bioRxiv*. 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.05.17.100289>.
- Singh D.K., Ganatra S.R., Singh B., Cole J., Alfson K.J., Clemmons E., et al. SARS-CoV-2 infection leads to acute infection with dynamic cellular and inflammatory flux in the lung that varies across nonhuman primate species. *bioRxiv*. 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.06.05.136481>.
- Williamson B.N., Feldmann F., Schwarz B., Meade-White K., Porter D.P., Schulz J., et al. Clinical benefit of remdesivir in rhesus macaques infected with SARS-CoV-2. *bioRxiv*. 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.04.15.043166>.
- Yu J., Tostanoski L.H., Peter L., Mercado N.B., McMahan K., Mahrokhian S.H., et al. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques. *Science*. 2020; 369(6505): 806–11. <https://doi.org/10.1126/science.abc6284>.
- Corbett K.S., Flynn B., Foulds K.E., Francica J.R., Boyoglu-Barnum S., Werner A.P., et al. Evaluation of the mRNA-1273 vaccine against SARS-CoV-2 in nonhuman primates. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(16): 1544–55. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2024671>.
- Takayama K. *In Vitro* and Animal Models for SARS-CoV-2 research. *Trends Pharmacol. Sci.* 2020; 41(8): 513–7. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.05.005>.
- Gorbalenya A.E., Baker S.C., Baric R.S., de Groot R.J., Drosten C., Gulyaeva A.A., et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat. Microbiol.* 2020; 5(4): 536–44. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.
- Liu S., Xiao G., Chen Y., He Y., Niu J., Escalante C.R., et al. Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors. *Lancet*. 2004; 363(9413): 938–47. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15788-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15788-7).
- Yan R., Zhang Y., Li Y., Xia L., Guo Y., Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*. 2020; 367(6485): 1444–8. <https://doi.org/10.1126/science.abb2762>.
- Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Krüger N., Herrler T., Erichsen S., et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*. 2020; 181(2): 271–80.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>.
- Iwata-Yoshikawa N., Okamura T., Shimizu Y., Hasegawa H., Takeida M., Nagata N. TMPRSS2 contributes to virus spread and immunopathology in the airways of murine models after Coronavirus Infection. *J. Virol.* 2019; 93(6): e01815–18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01815-18>.
- Wang K., Chen W., Zhou Y.S., Lian J.Q., Zhang Z., Du P., et al. SARS-CoV-2 invades host cells via a novel route: CD147-spike protein. *bioRxiv*. 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.03.14.988345>.
- Neuman B.W., Kiss G., Kunding A.H., Bhella D., Baksh M.F., Connelly S., et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology. *J. Struct. Biol.* 2011; 174(1): 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.11.021>.
- Schoeman D., Fielding B.C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virol. J.* 2019; 16(1): 69. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1182-0>.

27. Lei X., Dong X., Ma R., Wang W., Xiao X., Tian Z., et al. Activation and evasion of type I interferon responses by SARS-CoV-2. *Nat. Commun.* 2020; 11(1): 3810. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17665-9>.
28. Kang S., Yang M., Hong Z., Zhang L., Huang Z., Chen X., et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites. *Acta Pharm. Sin. B.* 2020; 10(7): 1228–38. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.04.009>.
29. Zhang Y., Zhang J., Chen Y., Luo B., Yuan Y., Huang F., et al. The ORF8 protein of SARS-CoV-2 mediates immune evasion through potentially downregulating MHC-I. *bioRxiv.* 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.05.24.111823>.
30. Khailany R.A., Safdar M., Ozaslan M. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. *Gene Rep.* 2020; 19: 100682. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2020.100682>.
31. Sun J., Zhuang Z., Zheng J., Li K., Wong R.L., Liu D., et al. Generation of a broadly useful model for COVID-19 pathogenesis, vaccination and treatment. *Cell.* 2020; 182(3): 734–43.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.010>.
32. Golden J.W., Cline C.R., Zeng X., Garrison A.R., Carey B.D., Mucker E.M., et al. Human angiotensin-converting enzyme 2 transgenic mice infected with SARS-CoV-2 develop severe and fatal respiratory disease. *JCI Insight.* 2020; 5(19): e142032. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.142032>.
33. Jiang R.D., Liu M.Q., Chen Y., Shan C., Zhou Y.W., Shen X.R., et al. Pathogenesis of SARS-CoV-2 in transgenic mice expressing human angiotensin-converting enzyme 2. *Cell.* 2020; 182(1): 50–8.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.027>.
34. Bao L., Gao H., Deng W., Lv Q., Yu H., Liu M., et al. Transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 via close contact and respiratory droplets among human angiotensin-converting enzyme 2 mice. *J. Infect. Dis.* 2020; 222(4): 551–5. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa281>.
35. Rogers T.F., Zhao F., Huang D., Beutler N., Burns A., He W.T., et al. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. *Science.* 2020; 369(6506): 956–63. <https://doi.org/10.1126/science.abc7520>.
36. Schlottau K., Rissmann M., Graaf A., Schön J., Sehl J., Wylezich C., et al. SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study. *Lancet Microbe.* 2020; 1(5): 218–25. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30089-6](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30089-6).
37. Munster V.J., Feldmann F., Williamson B.N., van Doremalen N., Pérez-Pérez L., Schulz J., et al. Respiratory disease in rhesus macaques inoculated with SARS-CoV-2. *Nature.* 2020; 585(7824): 268–72. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2324-7>.
38. Deng W., Bao L., Liu J., Xiao C., Xue J., Lv Q., et al. Primary exposure to SARS-CoV-2 protects against reinfection in rhesus macaques. *Science.* 2020; 369(6505): 818–23. <https://doi.org/10.1126/science.abc5343>.
39. Johnston S.C., Jay A., Raymond J.L., Rossi F., Zeng X., Scruggs J., et al. Development of a Coronavirus Disease 2019 Nonhuman Primate Model Using Airborne Exposure. *bioRxiv.* 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.06.26.174128>.
40. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020; 579(7798): 270–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.
41. Li W., Greenough T.C., Moore M.J., Vasilieva N., Somasundaran M., Sullivan J.L., et al. Efficient replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus in mouse cells is limited by murine angiotensin-converting enzyme 2. *J. Virol.* 2004; 78(20): 11429–33. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.20.11429-11433.2004>.
42. 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. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5).
43. Zitzow L.A., Rowe T., Morken T., Shieh W.J., Zaki S., Katz J.M. Pathogenesis of avian influenza A (H5N1) viruses in ferrets. *J. Virol.* 2002; 76(9): 4420–9. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.9.4420-4429.2002>.
44. Martina B.E., Haagmans B.L., Kuiken T., Fouchier R.A.M., Rimmelzwaan G.F., van Amerongen G., et al. SARS virus infection of cats and ferrets. *Nature.* 2003; 425(6961): 915. <https://doi.org/10.1038/425915a>.
45. Weingartl H., Czup M., Czup S., Neufeld J., Marszal P., Gren J., et al. Immunization with modified vaccinia virus Ankara-based recombinant vaccine against severe acute respiratory syndrome is associated with enhanced hepatitis in ferrets. *J. Virol.* 2004; 78(22): 12672–6. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.22.12672-12676.2004>.
46. Wan Y., Shang J., Graham R., Baric R.S., Li F. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virol.* 2020; 94(7): e00127–20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00127-20>.
47. Aid M., Abbink P., Larocca R.A., Boyd M., Nityanandam R., Nanayakkara O., et al. Zika virus persistence in the central nervous system and lymph nodes of rhesus monkeys. *Cell.* 2017; 169(4): 610–20.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.04.008>.
48. Nakayama E., Saijo M. Animal models for Ebola and Marburg virus infections. *Front. Microbiol.* 2013; 4: 267. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00267>.
49. Estes J.D., Wong S.W., Brenchley J.M. Nonhuman primate models of human viral infections. *Nat. Rev. Immunol.* 2018; 18(6): 390–404. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0005-7>.
50. Heijmans C.M.C., de Groot N.G., Bontrop R.E. Comparative genetics of the major histocompatibility complex in humans and non-human primates. *Int. J. Immunogenet.* 2020; 47(3): 243–60. <https://doi.org/10.1111/iji.12490>.



## Летучие мыши субтропической зоны Краснодарского края России как возможный резервуар зоонозных вирусных инфекций

Леншин С.В.<sup>1</sup>, Ромашин А.В.<sup>2</sup>, Вышемирский О.И.<sup>1</sup>, Львов Д.К.<sup>3</sup>, Альховский С.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» Министерства науки и высшего образования (Минобрнауки) России, 354376, Сочи, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУ «Сочинский национальный парк» Министерства природных ресурсов и экологии (Минприроды) России, 354002, Сочи, Россия;

<sup>3</sup>Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, ФГБУ «Национальный центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия

Новые и возвращающиеся инфекции представляют серьёзную угрозу для мирового здравоохранения. Появление вируса SARS-CoV-2 и вызванная им пандемия COVID-19 продемонстрировали важность изучения и контроля зоонозных вирусных агентов непосредственно в природных очагах. Для SARS-подобных коронавирусов, а также множества других возбудителей зоонозов, включая геморрагические лихорадки и бешенство, основным резервуаром являются подковоносовые летучие мыши (ЛМ) (*Rhinolophus* spp.), широко распространённые в Евразии и Африке. Ареал их захватывает также южные регионы России, включая Северный Кавказ и Крым. Большие колонии этих животных располагаются на территории Сочинского национального парка (СНП; субтропическая зона Краснодарского края, район Большого Сочи, Северный Кавказ). Всего по данным многолетних наблюдений здесь насчитывается до 23 видов ЛМ, включая большого (*Rh. ferrumequinum*), малого (*Rh. hipposideros*) и южного (*Rh. euryale*) подковоносов.

В настоящем обзоре приведены сведения о зоонозных вирусах, которые ассоциированы с видами ЛМ, обитающих на территории субтропической зоны Краснодарского края Российской Федерации, и проведён анализ возможной роли представителей семейства рукокрылых (*Chiroptera*) как природного резервуара новых и возвращающихся инфекций. Изучение циркуляции зоонозных вирусов в популяциях ЛМ служит важным элементом мониторинга вирусных популяций в естественных очагах.

**Ключевые слова:** летучие мыши; новые и возвращающиеся инфекции; зоонозные вирусы; коронавирус SARS-CoV-2; COVID-19; Сочинский национальный парк

**Для цитирования:** Леншин С.В., Ромашин А.В., Вышемирский О.И., Львов Д.К., Альховский С.В. Летучие мыши субтропической зоны Краснодарского края как возможный резервуар зоонозных вирусных инфекций. Вопросы вирусологии. 2021; 66(2): 112-122. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-41>

**Для корреспонденции:** Альховский Сергей Владимирович, д-р биол. наук, руководитель лаборатории биотехнологии, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, ФГБУ «Национальный центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия. E-mail: [salkh@ya.ru](mailto:salkh@ya.ru); [s\\_alkhovsky@gamaleya.org](mailto:s_alkhovsky@gamaleya.org)

**Участие авторов:** Леншин С.В. – написание текста (включая вирусологические разделы), сбор и анализ литературных данных; Вышемирский О.И. – обобщение данных по климатическим условиям региона, анализ вирусологических разделов; Ромашин А.В. – написание разделов зоологического профиля, а также разделов, посвящённых Сочинскому национальному парку, обобщение данных по рукокрылым в регионе; Львов Д.К. – критический анализ материала, обобщение вирусологических данных; Альховский С.В. – написание текста, планирование и организация исследования, анализ литературных данных.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) (проект № 20-04-60154).

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

Поступила 26.01.2021

Принята в печать 27.03.2021

## Bats of the subtropical climate zone of the Krasnodar Territory of Russia as a possible reservoir of zoonotic viral infections

Sergey V. Lenshin<sup>1</sup>, Alexey V. Romashin<sup>2</sup>, Oleg I. Vyshemirsky<sup>1</sup>, Dmitry K. Lvov<sup>3</sup>, Sergey V. Alkhovskiy<sup>3</sup>

<sup>1</sup>FSBRI «Research Institute of Medical Primatology» of the Ministry of Higher Education and Science of Russia, 354376, Sochi, Russia;

<sup>2</sup>FSBI «Sochi National Park» of the Ministry of Natural Resources and Environment of Russia, 354002, Sochi, Russia;

<sup>3</sup>D.I. Ivanovsky Institute of Virology, FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia

Emerging and reemerging infections pose a grave global health threat. The emergence of the SARS-CoV-2 virus and the resulting COVID-19 pandemic have demonstrated the importance of studying of zoonotic viruses directly

in natural foci. For SARS-like coronaviruses, as well as for many other zoonotic pathogens (including hemorrhagic fevers and rabies agents), the main reservoir are horseshoe bats (*Rhinolophus* spp.), which are widely distributed in Eurasia and Africa. Their range also covers the southern regions of Russia, including the North Caucasus and Crimea. Large colonies of these animals are located on the territory of Sochi National Park (SNP; subtropical zone of Krasnodar Territory, Greater Sochi region, North Caucasus). In total, according to long-term observations, up to 23 species of bats were registered here, including the great (*Rh. ferrumequinum*), the lesser (*Rh. hipposideros*), and the Mediterranean (*Rh. euryale*) horseshoe bats.

This review provides information on zoonotic viruses associated with species of bats distributed in the subtropical zone of Krasnodar Territory of Russia, and analyzes their possible role as a natural reservoir of emerging and reemerging infections. Studying the circulation of zoonotic viruses in bats is an important element of monitoring viral populations in natural foci.

**Key words:** *bats; Chiroptera; emerging and reemerging infection; zoonotic viruses; coronavirus SARS-CoV-2; COVID-19; Sochi national park;*

**For citation:** Lenshin S.V., Romashin A.V., Vyshemirsky O.I., Lvov D.K., Alkhovsky S.V. Bats of the subtropical climate zone of the Krasnodar Territory of Russia as a possible reservoir of zoonotic viral infections. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(2): 112-122 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-41>

**For correspondence:** Alkhovskiy Sergey Vladimirovich, D.Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Biotechnology, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia. E-mail: [salkh@ya.ru](mailto:salkh@ya.ru); [s\\_alkhovskiy@gamaleya.org](mailto:s_alkhovskiy@gamaleya.org)

**Information about the authors:**

Lenshin S.V., <https://orcid.org/0000-0001-6815-2869>

Romashin A.V., <https://orcid.org/0000-0003-4751-1484>

Vyshemirsky O.I., <https://orcid.org/0000-0002-5345-8926>

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

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

**Contribution:** Lenshin S.V. – writing of the text (including virological sections), collecting and analyzing literature data; Vyshemirsky O.I. – generalization of data on the climatic conditions of the region, analysis of virological sections; Romashin A.V. – writing of sections of the zoological profile and ones devoted to Sochi National Park, generalization of data on bats in the region; Lvov D.K. – critical analysis of the material, generalization of virological data; Alkhovsky S.V. – writing of the text, planning and organization of research, analysis of literature data.

**Acknowledgement.** The work was funded by Russian Foundation for Basic Research (RFBR), project No. 20-04-60154.

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

Received 26 January 2021  
Accepted 27 March 2021

## Введение

К отряду рукокрылых (*Chiroptera*), сформировавшемуся в позднем эоцене – раннем плейстоцене, относятся 17 современных семейств, сгруппированных в подотряды собственно летучих мышей (ЛМ) (*Microchiroptera*) и крыланов (*Pteropodidae*). Это единственный отряд млекопитающих (*Mammalia*), освоивших активный (машущий) полёт, и вторая по разнообразию их группа после грызунов (*Rodentia*), насчитывающая до 1270 видов [1]. Рукокрылые обладают рядом биологических особенностей, таких как способность к элокации (у ЛМ), отдых в положении вниз головой, возможность впадать в сезонное и суточное оцепенение. Температура тела некоторых видов может изменяться (в условиях эксперимента) в пределах 39 °С (от +7 до +48,5 °С). Для представителей отряда характерно длительное (до 6–7 мес с осени до весны) выживание сперматозоидов в семенных каналах самцов и половых путях самок [2]. Следует отметить также некоторые не до конца изученные характеристики иммунитета и значительную продолжительность жизни для животных подобных размеров [3–5]. К экологическим особенностям можно отнести высокую численность и плотность популяций во вре-

мя днёвок и зимовок, а также перемешивание популяций во время ежегодных сезонных миграций и при впадении животных в спячку в местах зимовок [5–7].

Рукокрылые распространены повсеместно за исключением Арктики, Антарктики и некоторых океанических островов; наиболее многочисленны и разнообразны они в тропиках и субтропиках. Популяции активно контактируют с человеком; фруктоядные виды кормятся на фруктовых плантациях и часто используются в пищу [8]. Многие виды ЛМ поселяются непосредственно вблизи человеческих жилищ, в подвалах и на чердаках. Выделяемые ими с фекалиями и мочой вирусы могут напрямую инфицировать людей и животных-компаньонов (либо поедающих летучих мышей животных) с последующей передачей человеку.

Рукокрылые – важный природный резервуар зоонозных и зооантропонозных вирусов, обладающих эпидемическим и пандемическим потенциалом [9]. Первые данные о значении представителей этого отряда как резервуара вирусных инфекций появились в 1950-х гг. после выделения от них нескольких новых агентов, принадлежащих к различным родам и семействам. Первым был «вирус слюнных желёз

летучих мышей Букалазы» (Букалаза – населённый пункт в Уганде), впоследствии названный вирусом Рио-Браво (Rio-Bravo virus (RBV), *Flaviviridae: Flavivirus*). Он изолирован от бразильского складчатогуба (*Tadarida brasiliensis*) в Калифорнии в 1954 г. [10]. Новый рабдовирус (Lagos bat virus, *Rhabdoviridae: Lyssavirus*) выделен от крылана (*Eidolon helvum*) в Нигерии в 1958 г. [10]. Вирус Такарибе (Tacaribe virus (TCRV), *Arenaviridae: Mammarenavirus*), родственной возбудителю лихорадки Ласса, обнаружен у крыланов в Тринидаде и Тобаго в 1963 г. [10].

Последующие исследования показали, что рукокрылые являются природным резервуаром практически всех известных семейств зоонозных вирусов, включая возбудителей особо опасных геморрагических лихорадок Эбола, Марбург, Ниппах, Хендра, а также бешенства и др. [11–14]. Появление нового коронавируса SARS-CoV-2 и вызванной им пандемии COVID-19 продемонстрировало особую актуальность вирусов ЛМ и необходимость их углублённого изучения.

На территории бывшего Союза Советских Социалистических Республик (СССР) от ЛМ изолированы несколько вирусов. В частности, вирус Сокулук (*Flaviviridae: Flavivirus*) выделен от нетопыря-карлика (*Vespertilio pipistrellus*) в Киргизии в 1973 г. [15]. Близкородственные наировирусы Иссык-Куль (возбудитель Иссык-Кульской лихорадки) и Узун-Агач (*Nairoviridae: Orthonairovirus*) изолированы от рыжей вечерницы (*Nyctalus noctula*) в Киргизии и остроухой ночницы (*Myotis blythii*) в Казахстане соответственно [16, 17]. Циркуляция родственного вирусу бешенства рабдовирусов выявлена в популяциях ЛМ на Северном Кавказе и в Средней Азии. Так, Западно-Кавказский лиссавирус летучих мышей (West Caucasian bat virus (WCBV)) обнаружен у обыкновенного длиннокрыла (*Miniopterus schreibersii*). Ещё 2 рабдовируса – Араван (Aravan virus (ARAV)) и Худжанд (Khujand virus (KHUV)) – изолированы от остроухой ночницы и усатой ночницы (*Myotis mystacinus*) соответственно на юге Киргизии [18]. В целом же зоонозные вирусы, циркулирующие в популяциях ЛМ на территории Российской Федерации, и их эпидемический потенциал остаются практически не изученными.

#### **Значение летучих мышей как природного резервуара и источника новых коронавирусных инфекций**

ЛМ рассматриваются как природный резервуар и источник многих видов альфа- и бетакоронавирусов. В частности, подковоносы (*Rhinolophus* spp.) выступают в подобном качестве для SARS-подобных агентов, включая предшественников вирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2 [19]. Всего в циркуляцию зоонозных альфа- и бетакоронавирусов вовлечено не менее 30 видов из 11 семейств отряда [20]. Коронавирусы (*Coronaviridae*) – это семейство РНК-вирусов из отряда *Nidovirales*. Их вирион покрыт липидной оболочкой и имеет размер 120–160 нм; геном представлен одноцепочечной РНК положительной поляр-

ности (плюс-цепь) длиной ~27–32 т.п.н. (крупнейший среди всех РНК-содержащих вирусов), кодирующей до 37 белков. В семейство входят 2 подсемейства, 5 родов, 26 подрода и 46 видов [21]. Подсемейство *Orthocoronavirinae* включает 4 рода, из которых *Alphacoronavirus* и *Betacoronavirus* вызывают заболевания млекопитающих, а *Deltacoronavirus* и *Gammatocoronavirus* в основном ассоциированы с птицами [22]. Формирование популяционного генофонда коронавирусов, вероятно, началось десятки миллионов лет назад и продолжается до сих пор [23].

Коронавирусы являются этиологическим фактором сезонных острых респираторных (ОРВИ) и желудочно-кишечных вирусных инфекций у людей и животных, протекающих в разных формах – от бессимптомной до среднетяжёлой. Ветеринарное значение имеют возбудители, вызывающие инфекционный бронхит птиц (*Aves*) (IBV); трансмиссивный гастроэнтерит (TGEV); эпидемическую диарею (PEDV) и синдром острой диареи свиней (*Suidae*) (SADS-CoV)), а также коронавирусные инфекции собак (*Canis familiaris*), кошек (*Felis catus*), хорьков (*Mustela*), лошадей (*Equus*), альпака (*Vicugna pacos*). Для домашних животных наиболее значимыми являются кишечный коронавирус (FECV) и вирус инфекционного перитонита кошек (FIPV); кишечный (CCoV) и респираторный коронавирусы собак (CRCoV). На хорьковых зверофермах важное значение имеет кишечный (FREC) и системный коронавирусы хорьков (FRSCV). Известны также кишечный коронавирус лошадей (ECoV) и респираторный коронавирус альпака.

Клинически коронавирусные заболевания животных могут проявляться как в бессимптомных/локализованных формах с благоприятным исходом (например, FECV, FRECV, FECV, CRCoV, ECoV), так и тяжёлым течением и практически 100%-ной летальностью (FIPV, FRSCV) [24–26]. В РФ за последние 5 лет доля коронавирусов в сезонных ОРВИ человека составила от 2,6 до 13,7% [27, 28]. Всего известны 4 «сезонных» коронавируса, принадлежащих родам *Alphacoronavirus* (HCoV-229E и HCoV-NL63) и *Betacoronavirus* (HCoV-OC43 и HCoV-NKU1) [29].

В 2002 г. в провинции Гуандун (Китайская Народная Республика, КНР) зарегистрирована вспышка заболевания, вызванного новым коронавирусом SARS-CoV и получившего название «тяжёлый острый респираторный синдром» (ТОРС, SARS – severe acute respiratory syndrome). На протяжении более чем 8 мес заболели 8089 человек и 774 погибли (смертность 9%) [30]. В результате эпидемиологического расследования выяснилось, что наиболее вероятным источником первичного заражения были пальмовые цвететы (*Nandinia binotata*) и енотовидные собаки (*Nyctereutes procyonoides*) [31]. Однако при изучении местных популяций подковоносов *Rhinolophus* spp. у них были выявлены различные штаммы SARS-CoV-подобных вирусов. Установлено, что именно подковоносы являются природным резервуаром и источником возбудителя, вызвавшего вспышку ТОРС. В ряде исследований показано, что

защитные антитела к этому патогену обнаруживались у здоровых доноров в некоторых регионах ещё в 2001 г., т.е. до возникновения вспышки [32].

Начиная с 2012 г. в Ближневосточном регионе начали регистрировать случаи новой инфекции, этиологическим агентом которой был ещё один новый коронавирус MERS-CoV, а сама болезнь названа Ближневосточным респираторным синдромом (БВРС, MERS – Middle East respiratory syndrome). На 30 сентября 2019 г. органы здравоохранения по всему миру сообщили о 2494 случаях MERS-CoV и 912 летальных исходах (37%) [33]. Практически все они были зарегистрированы в странах Ближнего Востока; отмечена также госпитальная вспышка в Республике Корея в 2015 г. [33, 34]. Природный резервуар MERS-CoV – одногорбые верблюды (*Camelus dromedarius*). На Аравийском полуострове и в Северной Африке серопревалентность среди этих животных составляет от 70 до 100% [35, 36]. У 55% заболевших выявлены контакты с верблюдами, их выделениями и/или продуктами связанных с ними производств; в остальных случаях источник инфекции установить не удалось [30]. Около половины работников из Саудовской Аравии, ухаживающих за верблюдами, имеют антитела к MERS-CoV без серьёзных респираторных заболеваний в анамнезе, что свидетельствует о перенесении ими болезни в лёгкой и бессимптомной формах [37]. Несмотря на то что основным источником инфицирования людей являются одногорбые верблюды, в качестве главного природного резервуара коронавирусов – предшественников MERS-CoV рассматриваются гладконосые летучие мыши (семейство *Vespertilionidae*). Данный возбудитель филогенетически связан с близкородственными коронавирусами (BatCoV HKU4, BatCoV HKU5, NeoCoV), обнаруженными у различных видов гладконосых мышей [38]. Результаты ретроспективного анализа сывороток животных показали, что широкое распространение MERS-CoV на Ближнем Востоке началось приблизительно с 1980-х гг. [32, 39, 40].

В конце ноября – декабре 2019 г. в Ухане (провинция Хубэй, КНР) зарегистрирована вспышка респираторного заболевания. Оно оказалось вызванным ранее неизвестным коронавирусом – SARS-CoV-2 [41–43]. Позднее инфекцию назвали COVID-19 (от англ. *Coronavirus infectious disease*, или *Coronavirus infectious disease*). Наиболее близкий (96,2%) её возбудителю штамм (BatCoV RaTG13) обнаружен у азиатского подковоноса (*Rhinolophus affinis*) в китайской провинции Юньнань. Структура рецептор-связывающего домена белка S, который ответствен за связывание рецептора ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2, ангиотензинпревращающий фермент 2) на поверхности клеток человека, у SARS-CoV-2 существенно отличается от таковой SARS-подобных вирусов ЛМ (до 75% схожести). С вирусом же RaTG13 схожесть данного участка составляет 93,1% [44]. Таким образом, ЛМ – естественный резервуар и источник новых зооантропонозных коронавирусов, послуживших за последние 20 лет причиной крупных эпидеми-

ческих вспышек и пандемии тяжёлых респираторных заболеваний [45, 46].

### Летучие мыши субтропической зоны Краснодарского края

Всего в РФ зарегистрировано не менее 45 видов ЛМ [6]. В субтропической зоне Краснодарского края вследствие климатических и географических особенностей наблюдается значительное разнообразие этих животных [47]. На территории Сочинского национального парка Минприроды России (СНП) на протяжении многих лет проводятся наблюдения за популяциями рукокрылых, обитающих как в самом парке, так и в сопредельных районах. СНП расположен на южном макросклоне Главного Кавказского хребта, который местами сложен известняками юрского и мелового периодов, изобилующими карстовыми полостями. Всего здесь насчитывается свыше 300 подобных образований – пещер, гротов, колодцев, шахт, вклюдков (карстовых источников воды) и т.д.; крупнейшей пещерой является Воронцовская система с длиной всех разведанных в настоящее время ходов >11 720 м. Все они являются естественными убежищами для ЛМ и других троглофильных (тяготеющих к пещерам) видов. Климат региона влажный субтропический; средняя температура января +5 °С, июля +22–24 °С при среднегодовом показателе +14,1 °С. На Черноморском побережье снижение температуры воздуха зимой до отрицательных значений фиксируется в течение нескольких дней. Годовое количество осадков в предгорьях составляет до 600–800 мм, а в горах – 800–3200 мм и более.

Всего по данным многолетних наблюдений с применением различных методов регистрации (отлов, визуальное наблюдение, аудиорегистрация посредством бэт-детекторов) в регионе насчитывается до 23 видов ЛМ (включая несколько видов подковоносов (*Rhinolophus* spp.)), которые служат основным резервуаром SARS-подобных коронавирусов. Троглофильные животные обитают в первую очередь в карстовых полостях – пещерах. На территории парка большинство их расположено в зоне выхода на поверхность известняковых отложений вдоль рек Хоста, Кудепста, Псеуапсе, Аше и др. Троглофильные виды ЛМ в летний период проводят днёвку также в дуплах деревьев, на чердаках домов (табл. 1). Некоторые весьма многочисленны и часто встречаются в убежищах (пещерах, чердаках и подвалах домов), другие зарегистрированы только при помощи специальных акустических детекторов. Ниже приведена информация о 5 самых многочисленных и широко распространённых в регионе видах (см. также табл. 1). Приведены семейства вирусов, которые были найдены в их популяциях в различных частях ареала. Сведения о вирусах, циркулирующих среди ЛМ на территории России в целом, в настоящее время отсутствуют.

**Подковонос малый** (*Rhinolophus hipposideros* (Bechstein, 1800)). Распространён от северо-востока Африки, Южной и Западной Европы до Средней Азии и северо-западных Гималаев. Встречается в пустынях

Таблица 1. Список видов летучих мышей, распространённых в субтропической зоне Краснодарского края России (северное побережье Чёрного моря) с указанием способа их регистрации\*

Table 1. Bat species distributed in the subtropical zone of Krasnodar Territory of Russia (northern coast of the Black sea) with indicating the method of their registration\*

Семейство Family	Род Genus	Вид Species	Масса тела, г Body weight, g	Размах кры- льев, см/длина предплечий, см Wingspan, cm/ forearm length, cm	Частота эхо- локационного сигнала, кГц Echolocation signal frequency, kHz	Способ регистрации Registration method		
						Встреча в убе- жище/отлов Meeting in the shelter/ Trapping	Акусти- ческий метод Acoustic method	
Подковоносые летучие мыши Horseshoe bats <i>Rhinolophidae</i> , (Lesson, 1827)	Подковоносы Horseshoe bats <i>Rhinolophus</i> (Lacépède, 1799)	Подковонос большой The greater horseshoe bat <i>Rh. ferrumequinum</i> (Schreber, 1774)	13–27	35–40/5,5–6,0	77–81	+	+	
		Подковонос малый The lesser horseshoe bat <i>Rh. hipposideros</i> (Bechstein, 1800)	3,6–8,0	19–25/3,5–4,0	105–111	+	+	
		Подковонос южный The Mediterranean horseshoe bat <i>Rh. euryale</i> (Blasius, 1853)	7–12	30–32/4,5–5,0	101–108	+	+	
Гладконосые летучие мыши Smooth-nosed bats <i>Vespertilionidae</i> (Gray, 1821)	Ночницы Mouse-eared bats <i>Myotis</i> (Kaup, 1829)	Ночница усатая Whiskered bat <i>M. mystacinus</i> (Kuhl, 1817)	3,3–8,0	19–23/3,0–4,0	45–50	–	+	
		Ночница трёхцветная Geoffroy's bat <i>M. emarginatus</i> (E. Geoffroy, 1806)	5–10	22–28/4,0–4,5	~55	+	+	
		Ночница остроухая** The lesser mouse-eared bat** <i>M. blythii</i> (Tomes, 1857)	15–30	38–40/5,5–6,0	32–33	+	+	
		Ночница Брандта Brandt's bat <i>M. brandtii</i> (Eversmann, 1845)	5,5–10	19–24/3,3–3,9	45–50	+	+	
		Ночница водяная Daubenton's myotis <i>M. daubentoniid</i> (Kuhl, 1817)	6–10	25–27/3,5–4,0	~45	+	+	
		Ночница Наттерера Natterer's bat <i>M. nattereri</i> (Kuhl, 1817)	6–12	24–30/3,5–5,0	~50	+	+	
		Ночница Алкифои Alcathoe bat <i>M. alcathoe</i> (Von Helversen & Heller, 2001)	3,2–5,8	~17/3,0–3,3	н.д. n.d.	+	+	
		Нетопыри Pipistrelles <i>Pipistrellus</i> (Kaup, 1829)	Нетопырь-карлик The common pipistrelle <i>P. pipistrellus</i> (Schreber, 1774)	4–8	19–22/3,0–3,5	52–58	–	+
			Нетопырь-пигмей Soprano pipistrelle <i>P. pygmaeus</i> (Leach, 1825)	3–7	18–21/2,8–3,0	~55	–	+
			Нетопырь лесной Nathusius' pipistrelle <i>P. nathusii</i> (Blasius, 1839)	5–12	23–25/3,5–3,7	35–40	+	+
Нетопырь средиземноморский (Куля) Kuhl's pipistrelle <i>P. kuhlii</i> (Kuhl, 1817)	5–10		21–24/3,3–3,7	~40	–	+		
Вечерницы Noctule bats <i>Myctalus</i> (Bowdich, 1925)	Вечерница малая (Лейслера) The lesser noctule <i>N. leisleri</i> (Kuhl, 1817)	12–20	26–32/3,8–4,5	~25	–	+		
	Вечерница рыжая The common noctule <i>N. noctula</i> (Schreber, 1774)	18–40	32–40/5,0–6,0	~20	+	+		
	Вечерница гигантская The greater noctule <i>N. lasiopterus</i> (Schreber, 1780)	41–76	41–46/6,5–7,0	18–19	+	+		

Продолжение табл.1 см. на стр. 117.

Продолжение табл. 1 со стр. 116.

Семейство Family	Род Genus	Вид Species	Масса тела, г Body weight, g	Размах кры- льев, см/длина предплечий, см Wingspan, cm/ forearm length, cm	Частота эхо- локационного сигнала, кГц Echolocation signal frequency, kHz	Способ регистрации Registration method	
						Встреча в убе- жище/отлов Meeting in the shelter/ Trapping	Акусти- ческий метод Acoustic method
	Двухцветные кожаны Vesper bats <i>Vespertilio</i> (Linnaeus, 1758)	Кожан двухцветный The parti-coloured bat <i>V. murinus</i> (Linnaeus, 1758)	8–20	27–31/4,0–5,0	25–30	–	+
	Кожаны Serotine bats <i>Eptesicus</i> (Rafinesque, 1820)	Кожан поздний The serotine bat <i>E. serotinus</i> (Schreber, 1774)	15–30	32–38/5,0–5,5	25–30	+	+
	Кожановидные нетопыри Pipistrelle bats <i>Hypsugo</i> (Kolenati, 1856)	Нетопырь кожановидный Savi's pipistrelle <i>H. savii</i> (Bonaparte, 1837)	6–10	22–24/3,0–4,0	33–35	–	+
	Длиннокрылы Bent-wing bats <i>Miniopterus</i> (Bonaparte, 1837)	Длиннокрыл обыкновенный The common bent-wing bat <i>M. schreibersii</i> (Kuhl, 1817)	9–17	30–35/4,5–5,0	45–98	+	+
	Широкоушки Barbastelles <i>Barbastella</i> (Gray, 1821)	Широкоушка европейская The western barbastelle <i>B. barbastellus</i> (Schreber, 1774)	6–15	26–31/3,5–4,0	31–32	+	+
	Ушаны Long-eared bats <i>Plecotus</i> (E. Geoffroy, 1818)	Ушан бурый Brown long-eared bat <i>P. auritus</i> (Linnaeus, 1758)	5–11	24–28/3,5–4,5	~50	+	+

**Примечание.** \* По данным наблюдений А.В. Ромашина и С.В. Газаряна, 1968–2015 гг.; \*\* В настоящее время европейский подвид выделяют в самостоятельный вид – *M. blythii oxygnathus* (Monticelli, 1885); н.д. – нет данных.

**Note.** \* According to the observations of A.V. Romashin and S.V. Gazaryan in 1968–2015; \*\* At present, the European subspecies is identified as an independent species *M. blythii oxygnathus* (Monticelli, 1885); n.d. – no data available.

(по предгорьям), лиственных лесах, парках и сельскохозяйственных угодьях; в горах – до 2000 м над уровнем моря. Ведёт преимущественно оседлый образ жизни, зимует в различных подземных убежищах (пещеры, штольни, гроты, заброшенные постройки); совершает миграции. Охотится в сумерках на небольшой высоте на мелких ночных насекомых (двукрылых (*Diptera*), бабочек (*Lepidoptera*), ручейников (*Trichoptera*) и др.), а также на пауков (*Araneae*), которых ловит как в воздухе, так и на субстрате. Спаривание происходит осенью либо на зимовках. Беременность протекает ~75 дней, роды происходят в начале лета; лактация длится ~40 дней. Выводковые колонии обычно включают несколько десятков самок, тогда как самцы держатся обособленно. Продолжительность жизни составляет до 21 года [6, 47]. Статус: по состоянию на 2017 г. находится в Красной книге Краснодарского края как уязвимый вид. Согласно литературным данным в различных популяциях малого подковоноса внутри ареала обнаружена циркуляция вирусов, принадлежащих не менее чем к 8 семействам, включая *Adenoviridae*, *Astroviridae*, *Circoviridae*, *Picornaviridae*,

*Paramyxoviridae*, *Reoviridae* и *Herpesviridae*, а также *Coronaviridae* (табл. 2) [49–51].

**Подковонос большой** (*Rh. ferrumequinum* (Schreber, 1774)). Регионы обитания – от Северной Африки, Южной и Западной Европы до Гималаев, Кореи и Японии. Населяет пустыни, лиственные леса и окультуренные ландшафты, горы высотой до 3500 м. Убежищами служат пещеры, расщелины, гроты, чердаки. Охотится в сумерках недалеко от убежищ, невысоко от земли. Питается насекомыми: совками (*Noctuidae*), жуками (*Coleoptera*), ручейниками и др. Зимует в пещерах, штольнях и подземельях. Совершает сезонные миграции (Иран, Афганистан, Китай); образует колонии до 500 особей. Продолжительность жизни – до 30 лет [6, 47]. Статус: на 2017 г. в Красной книге Краснодарского края (уязвимый вид). По данным литературы у большого подковоноса в разных частях ареала найдены вирусы семейств *Coronaviridae*, *Parvoviridae*, *Peribunyaviridae*, *Adenoviridae*, *Astroviridae*, *Caliciviridae*, *Circoviridae* (табл. 2) [49–51].

**Подковонос южный** (*Rh. euryale* (Blasius, 1853)). Распространён от Южной Европы и Северной Аф-

Таблица 2. Рукокрылые, зарегистрированные на территории Сочинского национального парка акустическим методом в 2012–2015 гг., и семейства вирусов, обнаруженные у указанных видов (по данным сайта <http://www.mgc.ac.cn/DBatVir/>)

Table 2. The bats registered in territory of Sochi National Park by acoustic methods in 2012–2015 and virus families found in mentioned species (according to <http://www.mgc.ac.cn/DBatVir/>)

Виды летучих мышей Bats species	Семейства вирусов Virus families																						
	<i>Coronaviridae</i>	<i>Pareoviridae</i>	<i>Peribunyaviridae</i>	<i>Adenoviridae</i>	<i>Astroviridae</i>	<i>Caliciviridae</i>	<i>Circoviridae</i>	<i>Picornaviridae</i>	<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Reoviridae</i>	<i>Herpesviridae</i>	<i>Hepeviridae</i>	<i>Nairoviridae</i>	<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Bornaviridae</i>	<i>Polyomaviridae</i>	<i>Flaviviridae</i>	<i>Phenuiviridae</i>	<i>Hantaviridae</i>	<i>Retroviridae</i>	<i>Papillomaviridae</i>	<i>Poxviridae</i>	
Подковонос большой The greater horseshoe bat <i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Подковонос малый The lesser horseshoe bat <i>Rh. hipposideros</i>	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Подковонос южный Southern horseshoe bat <i>Rh. euryale</i>	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ночница усатая Whiskered bat <i>Myotis mystacinus</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ночница трёхцветная Geoffroy's bat <i>M. emarginatus</i>	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ночница остроухая* The lesser mouse-eared bat* <i>M. blythii</i>	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ночница Брандта Brandt's bat <i>M. brandtii</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ночница водяная Daubenton's myotis <i>M. daubentonii</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Ночница Наттерера Natterer's bat <i>M. nattereri</i>	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Ночница Алкифои Alcathoe bat <i>M. alcathoe</i>	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Нетопырь-карлик The common pipistrelle <i>Pipistrellus pipistrellus</i>	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Нетопырь-пигмей Soprano pipistrelle <i>P. pygmaeus</i>	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Нетопырь лесной Nathusius' pipistrelle <i>P. nathusii</i>	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Нетопырь средиземноморский (Куля) Kuhl's pipistrelle <i>P. kuhlii</i>	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Вечерница малая (Лейслера) The lesser noctule <i>Nyctalus leisleri</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Вечерница рыжая The common noctule <i>N. noctula</i>	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Вечерница гигантская The greater noctule <i>N. lasiopterus</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Кожан двухцветный The parti-coloured bat <i>Vespertilio murinus</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Кожан поздний The serotine bat <i>Eptesicus serotinus</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Нетопырь кожановидный Savi's pipistrelle <i>Hypsugo savii</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Длиннокрыл обыкновенный The common bent-wing bat <i>Miniopterus schreibersii</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Широкоушка европейская The western barbastelle <i>Barbastella barbastellus</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ушан бурый The brown long-eared bat <i>Plecotus auritus</i>	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Число видов, у которых обнаружен вирус (n) Number of species in which virus was detected (n)	20	3	1	18	17	4	11	6	11	7	17	3	3	12	2	1	1	1	1	2	1	1	1

**Примечание.** «+» – встречается; «-» – не встречается. \* В настоящее время европейский подвид выделяют в самостоятельный вид – *M. blythii oxygnathus* (Monticelli, 1885).

**Note.** «+» – present; «-» – absent. \* At present, the European subspecies is identified as an independent species *M. blythii oxygnathus* (Monticelli, 1885).

рики до Кавказа, Передней, Малой и Средней Азии в субтропических горных областях, предпочитая лесистые закарстованные районы. Убежища – пещеры и чердаки. Образует скопления до 30 особей [6, 47]. Статус: по состоянию на 2017 г. позиционирован в Красной книге Краснодарского края как уязвимый вид. Семейства вирусов, зарегистрированные у южного подковоноса в пределах ареала, включают *Coronaviridae*, *Adenoviridae*, *Reoviridae*, *Picornaviridae* (табл. 2) [49–51].

**Длиннокрыл обыкновенный** (*Miniopterus schreibersii* (Kuhl, 1817)). Его ареал охватывает юг умеренного пояса, субтропики и отчасти тропики Средиземноморья, включая северо-запад Африки, юг Центральной и Восточной Европы до Карпат, а также Кавказ. Крымская популяция вида была, по-видимому, безвозвратно уничтожена в 1970-е гг., возможно, вследствие сезонных колебаний климата [48]. Длиннокрыл обыкновенный населяет разнообразные ландшафты, как аридные (глинистые и засушливые), так и умеренно увлажнённые, как правило связанные с низкогорьями; в горы поднимается до 2000 м над уровнем моря. Убежища – пещеры, скалы, руины, искусственные подземные полости, чердаки каменных зданий. Кормится над открытыми ландшафтами и кронами деревьев. Может разлетаться к кормовым угодьям на десятки километров. Совершает сезонные миграции на 500 км и более (Индия, Китай, Африка). Известны выводковые колонии вида численностью в десятки тысяч особей. Представители живут до 15 лет [6, 47]. Статус: на 2017 г. находится в Красной книге Краснодарского края (также является уязвимым видом). В разных частях ареала у обыкновенного длиннокрыла выявлены вирусы не менее 3 семейств – *Coronaviridae*, *Parvoviridae* и *Astroviridae* (табл. 2) [51].

**Нетопырь-карлик** (*Pipistrellus pipistrellus* (Schreber, 1774)). Распространён от Северной Европы и Средиземноморья (включая северо-запад Африки) до Предуралья, Средней Азии, Кашмира и Китая. Обитает в различных ландшафтах, но предпочитает антропогенные угодья; часто живёт в поселениях человека вплоть до городов. Селится в постройках человека, реже – в дуплах деревьев и других щелевидных укрытиях, нередко с другими видами ЛМ. Зимует в домах и в различных подземных укрытиях. Вылетает на охоту в ранних сумерках; охотится на мелких летающих насекомых как на небольшой высоте над опушками, просеками, аллеями, улицами, так и в кронах высокоствольных деревьев. Полёт быстрый, манёвренный. На северо-востоке ареала совершает сезонные миграции до 1150 км, но в основном проводит зимовку в местах летнего обитания. Живёт до 16 (в среднем 3–5) лет. Статус: представляет собой широко распространённый обычный вид [6, 47].

### Эктопаразиты рукокрылых

Эктопаразиты отряда рукокрылых участвуют в передаче трансмиссивных инфекций. На ЛМ паразитируют блохи (*Siphonaptera*), клопы (*Heteroptera*), аргасовые (*Argasidae*), гамазовые (*Spirtunix vespertilionis*

L.) и иксодовые (*Ixodes vespertilionis*) клещи, нектерибиды (мухи-кровососки) (*Nycteribiidae latrellei* L.). Представители последних 3 таксономических единиц были собраны с рукокрылых на территории СНП. Непосредственно у мест днёвок ЛМ в пещерах были обнаружены проводящие зимовку имаго комаров *Culex hortensis*, которые были активны в момент обследования при температуре в пещере +13,8 °C.

### Заключение

Таким образом, рукокрылые представляют собой резервуар для многих семейств вирусов, патогенных для человека. Учитывая особенности физиологии и питания, ЛМ остаются важным источником новых зоонозных и зооантропонозных вирусных инфекций. Рукокрылые активно взаимодействуют в экосистемах с другими животными. При современных тенденциях человек продолжит активно расширять и преобразовывать осваиваемую территорию; как следствие, будет возрастать интенсивность его взаимодействия в том числе с представителями данного семейства. Последние же, в свою очередь, станут осваивать антропогенные ландшафты. Поэтому в современных условиях изучение взаимоотношений популяционных генофондов ЛМ и экологически связанных с ними зоонозных вирусов остаётся актуальным [23].

### ЛИТЕРАТУРА

1. Simmons N.B. Order *Chiroptera*. In: Wilson D.E., Reeder D.M., eds. *Mammal Species World a Taxon and Geographic Reference*. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 2005: 312–529. <https://doi.org/10.1093/acprof:osobl/9780199207114.003.0001>.
2. Racey P.A. The prolonged storage and survival of spermatozoa in *Chiroptera*. *J. Reprod. Fertil.* 1979; 56(1): 391–402. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0560391>.
3. Cowled C., Stewart C.R., Likic V.A., Friedländer M.R., Tachedjian M., Jenkins K.A., et al. Characterization of novel microRNAs in the Black flying fox (*Pteropus alecto*) by deep sequencing. *BMC Genomics*. 2014; 15(1): 682. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-682>.
4. Banerjee A., Baker M.L., Kulcsar K., Misra V., Plowright R., Mossman K. Novel insights into immune systems of bats. *Front. Immunol.* 2020; 11: 26. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00026>.
5. Lagunas-Rangel F.A. Why do bats live so long? Possible molecular mechanisms. *Biogerontology*. 2020; 21(1): 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10522-019-09840-3>.
6. Крускоп С.В. Отряд *Chiroptera*. В кн.: Павлинов И.Я., Лисовский А.А., ред. *Млекопитающие России: Систематико-географический справочник. Сборник трудов Зоологического музея МГУ. Выпуск 52*. Москва: КМК; 2012: 73–126.
7. Baloun D.E., Guglielmo C.G. Energetics of migratory bats during stopover: a test of the torpor-assisted migration hypothesis. *J. Exp. Biol.* 2019; 222: jeb196691. <https://doi.org/10.1242/jeb.196691>.
8. Khan M.S., Hossain J., Gurley E.S., Nahar N., Sultana R., Luby S.P. Use of infrared camera to understand bats' access to date palm sap: implications for preventing Nipah virus transmission. *Ecohealth*. 2010; 7(4): 517–25. <https://doi.org/10.1007/s10393-010-0366-2>.
9. 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>.
10. Wang L., Cowled C. *Bats and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases*. New York: John Wiley & Sons, Inc; 2015: 23–45. <https://doi.org/10.1002/9781118818824>.
11. Ang B.S.P., Lim T.C.C., Wang L. Nipah Virus Infection. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56: e01875-17. <https://doi.org/10.1128/jcm.01875-17>.
12. Selvey L., Sheridan J. Outbreak of severe respiratory disease in humans and horses due to a previously unrecognized paramyxovirus. *J. Travel. Med.* 1995; 2(4): 275. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.1995.tb00679.x>.

13. Hasan S., Ahmad S.A., Masood R., Saeed S. Ebola virus: A global public health menace: A narrative review. *J. Family Med. Prim. Care.* 2019; 8(7): 2189–201. [https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc\\_297\\_19](https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc_297_19).
14. Singh R.K., Dhama K., Chakraborty S., Tiwari R., Natesan S., Khandia R., et al. Nipah virus: epidemiology, pathology, immunobiology and advances in diagnosis, vaccine designing and control strategies – a comprehensive review. *Vet. Q.* 2019; 39(1): 26–55. <https://doi.org/10.1080/01652176.2019.1580827>.
15. L'vov D.K., Tsyarkin Y.M., Karas F.R., Timopheev E.M., Gromashevskii V.L., Veselovskaya O.V., et al. “Sokuluk” virus, a new group B arbovirus isolated from *Vespertilio pipistrellus* Schreber, 1775, bat in the Kirghiz S.S.R. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1973; 41(3): 170–4. <https://doi.org/10.1007/bf01252762>.
16. Альховский С.В., Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г., Шетинин А.М., Самохвалов Е.И., и др. Генетическая характеристика вируса Узун-Агач (UZAV – Uzun-Agach virus) (*Bunyaviridae*, *Nairovirus*), изолированного в Казахстане от острой ночницы *Myotis blythii oxygnathus* Monticelli, 1885 (*Chiroptera*; *Vespertilionidae*). *Вопросы вирусологии.* 2014; 59(5): 23–6.
17. Альховский С.В., Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Шетинин А.М., Дерябин П.Г., Самохвалов Е.И., и др. Таксономия вируса Иссык-Куль (Issyk-Kul virus, ISKV; *Bunyaviridae*, *Nairovirus*), возбудителя Иссык-Кульской лихорадки, изолированного от летучих мышей (*Vespertilionidae*) и клещей *Argas (Carios) vespertilionis* (Latreille, 1796). *Вопросы вирусологии.* 2013; 58(5): 11–5.
18. Kuz'min V., Botvinkin A.D., Poleschuk E.M., Orciari L.A., Rupprecht C.E. Bat rabies surveillance in the former Soviet Union. *Dev. Biol. (Basel).* 2006; 125: 273–82.
19. Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J. H. et al. Bats Are Natural Reservoirs of SARS-like Coronaviruses. *Science.* 2005; 310(5748):676–79. doi: 10.1126/science.1118391.
20. Drexler J.F., Corman V.M., Drosten C. Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. *Antiviral Res.* 2014; 101: 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.10.013>.
21. Groot R.J., Baker S.C., Baric R., Enjuanes L., Gorbalenya A.E., Holmes K.V., et al. «Family Coronaviridae». In: King A.M., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* London: Elsevier; 2012: 806–28.
22. Woo P.C., Huang Y., Lau S.K., Yuen K.Y. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses.* 2010; 2(8): 1804–20. <https://doi.org/10.3390/v2081803>.
23. Львов Д.К., Гулюкин М.И., Забережный А.Д., Гулюкин А.М. Формирование популяционного генофонда потенциально угрожающих биобезопасности зоонозных вирусов. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(5): 243–58. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-5-1>.
24. Naake C., Cook S., Pusterla N., Murphy B. Coronavirus Infections in companion animals: virology, epidemiology, clinical and pathological features. *Viruses.* 2020; 12(9): 1023. <https://doi.org/10.3390/v12091023>.
25. Schulz L.L., Tonsor G.T. Assessment of the economic impacts of porcine epidemic diarrhea virus in the United States. *J. Anim. Sci.* 2015; 93(11): 5111–8. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9136>.
26. Colvero L.P., Villarreal L.Y., Torres C.A., Brañdo P.E. Assessing the economic burden of avian infectious bronchitis on poultry farms in Brazil. *Rev. Sci. Tech.* 2015; 34(3): 993–9. <https://doi.org/10.20506/rst.34.3.2411>.
27. Яцышина С.Б., Мамошина М.В., Шипулина О.Ю., Подколзин А.Т., Акимкин В.Г. Анализ циркуляции коронавирусов человека. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(5): 267–76. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-5-3>.
28. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Колобухина Л.В., Федякина И.Т., Бовин Н.В., Игнатьева А.В. и др. Особенности циркуляции вирусов гриппа и ОРВИ в эпидемическом сезоне 2019–2020 гг. в отдельных регионах России. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(6): 335–49. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-6-4>.
29. Rabaan A.A., Al-Ahmed S.H., Naqee S., Sah R., Tiwari R., Malik Y.S., et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: A comparative overview. *Infez. Med.* 2020; 28(2): 174–84.
30. Fehr A.R., Perlman S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Methods Mol. Biol.* 2015; 1282: 1–23. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1).
31. Guan Y., Zheng B.J., He Y.Q., Liu X.L., Zhuang Z.X., Cheung C.L., et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in Southern China. *Science.* 2003; 302: 276–8. <https://doi.org/10.1126/science.1087139>.
32. Banerjee A., Kulcsar K., Misra V., Frieman M., Mossman K. Bats and coronaviruses. *Viruses.* 2019; 11(1): 41. <https://doi.org/10.3390/v11010041>.
33. European Centre for Disease Prevention and Control. Distribution of confirmed cases of MERS-CoV by place of infection and month of onset. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/distribution-confirmed-cases-mers-cov-place-infection-and-month-onset-march-2012> (accessed January 14, 2021).
34. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) – Republic of Korea. Available at: <https://www.who.int/csr/don/01-june-2015-mers-korea/en/> (accessed January 14, 2021).
35. Falzarano D., Kamissoko B., de Wit E., Maïga O., Cronin J., Samaké K., et al. Dromedary camels in northern Mali have high seropositivity to MERS-CoV. *One Health.* 2017; 3: 41–3. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.03.003>.
36. Alexandersen S., Kobinger G.P., Soule G., Wernery U. Middle East respiratory syndrome coronavirus antibody reactors among camels in Dubai, United Arab Emirates, in 2005. *Transbound. Emerg. Dis.* 2014; 61(2): 105–108. <https://doi.org/10.1111/tbed.12212>.
37. Alshukairi A.N., Zheng J., Zhao J., Nehdi A., Baharoon S.A., Layqah L., et al. High prevalence of MERS-CoV infection in camel workers in Saudi Arabia. *mBio.* 2018; 9(5): e01985-18. <https://doi.org/10.1128/mbio.01985-18>.
38. Anthony S.J., Gilardi K., Menachery V.D., Goldstein T., Ssebide B., Mbabazi R., et al. Further evidence for bats as the evolutionary source of middle east respiratory syndrome coronavirus. *mBio.* 2017; 8(2): e00373-17. <https://doi.org/10.1128/mbio.00373-17>.
39. Reusken C.B., Messadi L., Feyisa A., Ularanu H., Godeke G.J., Danmarwa A., et al. Geographic distribution of MERS coronavirus among dromedary camels, Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(8): 1370–4. <https://doi.org/10.3201/eid2008.140590>.
40. Corman V.M., Jores J., Meyer B., Younan M., Liljander A., Said M.Y., et al. Antibodies against MERS coronavirus in dromedary camels, Kenya, 1992–2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(8): 1319–22. <https://doi.org/10.3201/eid2008.140596>.
41. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(8): 727–33. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001017>.
42. Li X., Wang W., Zhao X., Zai J., Zhao Q., Li Y., et al. Transmission dynamics and evolutionary history of 2019-nCoV. *J. Med. Virol.* 2020; 92(5): 501–11. <https://doi.org/10.1002/jmv.25701>.
43. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) Situation Report – 146. Available at: [https://www.who.int/docs/default-source/coronavirus/situation-reports/20200614-covid-19-sitrep-146.pdf?sfvrsn=5b89bdad\\_4](https://www.who.int/docs/default-source/coronavirus/situation-reports/20200614-covid-19-sitrep-146.pdf?sfvrsn=5b89bdad_4) (accessed January 14, 2021).
44. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020; 579(7798): 270–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.
45. Львов Д.К., Альховский С.В., Колобухина Л.В., Бурцева Е.И. Этиология эпидемической вспышки COVID-19 в г. Ухань (провинция Хубэй, Китайская Народная Республика), ассоциированной с вирусом 2019-nCoV (*Nidovirales*, *Coronaviridae*, *Coronavirinae*, *Betacoronavirus*, подрод *Sarbecovirus*): уроки эпидемии SARS-CoV. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(1): 6–15. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-6-15>.
46. Львов Д.К., Альховский С.В. Истоки пандемии COVID-19: экология и генетика коронавирусов (*Betacoronavirus: Coronaviridae*) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (подрод *Sarbecovirus*), MERS-CoV (подрод *Merbecovirus*). *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(2): 62–70. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-62-70>.
47. Газарян С.В. *Эколого-фаунистический анализ населения рукокрылых (Chiroptera) Западного Кавказа*: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. Москва; 2002.
48. Иванов С.П., Фатерыга А.В., ред. *Красная книга Республики Крым. Животные*. Симферополь: Ариал; 2015.

49. Drexler J.F., Gloza-Rausch F., Glende J., Corman V.M., Muth D., Goettsche M., et al. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in European bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J. Virol.* 2010; 84(21): 11336–49. <https://doi.org/10.1128/jvi.00650-10>.
50. Rihtaric D., Hostnik P., Steyer A., Grom J., Toplak I. Identification of SARS-like coronaviruses in horseshoe bats (*Rhinolophus hipposideros*) in Slovenia. *Arch. Virol.* 2010; 155(4): 507–14. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0612-5>.
51. Monchatre-Leroy E., Boué F., Boucher J.M., Renault C., Moutou F., Ar Gouilh M., et al. Identification of alpha and beta Coronavirus in wildlife species in France: bats, rodents, rabbits, and hedgehogs. *Viruses.* 2017; 9(12): 364. <https://doi.org/10.3390/v9120364>.

## References

1. Simmons N.B. Order *Chiroptera*. In: Wilson D.E., Reeder D.M., eds. *Mammal Species World a Taxon and Geographic Reference*. Baltimore: Johns Hopkins University Press; 2005: 312–529. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199207114.003.0001>.
2. Racey P.A. The prolonged storage and survival of spermatozoa in Chiroptera. *J. Reprod. Fert.* 1979; 56(1): 391–402. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0560391>.
3. Cowled C., Stewart C.R., Likić V.A., Friedländer M.R., Tachedjian M., Jenkins K.A., et al. Characterization of novel microRNAs in the Black flying fox (*Pteropus alecto*) by deep sequencing. *BMC Genomics.* 2014; 15(1): 682. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-682>.
4. Banerjee A., Baker M.L., Kulcsar K., Misra V., Plowright R., Mossman K. Novel insights into immune systems of bats. *Front. Immunol.* 2020; 11: 26. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00026>.
5. Lagunas-Rangel F.A. Why do bats live so long? Possible molecular mechanisms. *Biogerontology.* 2020; 21(1): 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10522-019-09840-3>.
6. Kruskop S.V. *Chiroptera*. In: Pavlinov I.Ya., Lisovskiy A.A., eds. *Mammals of Russia: systematic and geographical Reference. Collection of Works of the Zoological Museum of Moscow State University. Issue 52 [Mlekopitayushchie Rossii: sistematiko-geograficheskiy spravochnik. Sbornik trudov Zoologicheskogo muzeya MGU. Vypusk 52]*. Moscow: KMK; 2012: 73–126 (in Russian).
7. Baloun D.E., Guglielmo C.G. Energetics of migratory bats during stopover: a test of the torpor-assisted migration hypothesis. *J. Exp. Biol.* 2019; 222: jeb196691. <https://doi.org/10.1242/jeb.196691>.
8. Khan M.S., Hossain J., Gurley E.S., Nahar N., Sultana R., Luby S.P. Use of infrared camera to understand bats' access to date palm sap: implications for preventing Nipah virus transmission. *Ecohealth.* 2010; 7(4): 517–25. <https://doi.org/10.1007/s10393-010-0366-2>.
9. 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>.
10. Wang L., Cowled C. *Bats and Viruses: A New Frontier of Emerging Infectious Diseases*. New York: John Wiley & Sons, Inc; 2015: 23–45. <https://doi.org/10.1002/9781118818824>.
11. Ang B.S.P., Lim T.C.C., Wang L. Nipah Virus Infection. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56: e01875-17. <https://doi.org/10.1128/jcm.01875-17>.
12. Selvey L., Sheridan J. Outbreak of severe respiratory disease in humans and horses due to a previously unrecognized paramyxovirus. *J. Travel. Med.* 1995; 2(4): 275. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.1995.tb00679.x>.
13. Hasan S., Ahmad S.A., Masood R., Saeed S. Ebola virus: A global public health menace: A narrative review. *J. Family Med. Prim. Care.* 2019; 8(7): 2189–201. [https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc\\_297\\_19](https://doi.org/10.4103/jfmpc.jfmpc_297_19).
14. Singh R.K., Dhama K., Chakraborty S., Tiwari R., Natesan S., Khandia R., et al. Nipah virus: epidemiology, pathology, immunobiology and advances in diagnosis, vaccine designing and control strategies – a comprehensive review. *Vet. Q.* 2019; 39(1): 26–55. <https://doi.org/10.1080/01652176.2019.1580827>.
15. L'vov D.K., Tsyarkin Y.M., Karas F.R., Timopheev E.M., Gromashevskiy V.L., Veselovskaya O.V., et al. "Sokuluk" virus, a new group B arbovirus isolated from *Vespertilio pipistrellus* Schreber, 1775, bat in the Kirghiz S.S.R. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1973; 41(3): 170–4. <https://doi.org/10.1007/bf01252762>.
16. Al'khovskiy S.V., L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Deryabin P.G., Shchetinin A.M., Samokhvalov E.I., et al. Genetic characterization of the Uzun-Agach virus (UZAV, *Bunyaviridae*, *Nairovirus*) isolated from the bat *Myotis blythii oxygnathus* Monticelli, 1885 (*Chiroptera*; *Vespertilionidae*) in Kazakhstan [*Geneticheskaya kharakteristika virusa Uzun-Agach (UZAV – Uzun-Agach virus) (Bunyaviridae, Nairovirus), izolirovannogo v Kazakhstane ot ostroukhoy nochniitsy Myotis blythii oxygnathus Monticelli, 1885 (Chiroptera; Vespertilionidae)*]. *Voprosy virusologii.* 2014; 59(5): 23–6 (in Russian).
17. Al'khovskiy S.V., L'vov D.K., Shchelkanov M.Yu., Shchetinin A.M., Deryabin P.G., Samokhvalov E.I., et al. Taxonomy of the Sokuluk virus (SOKV) (*Flaviviridae*, *Flavivirus*, Entebbe bat virus group) isolated from bats (*Vespertilio pipistrellus* Schreber, 1774), ticks (*Argasidae* Koch, 1844), and birds in Kyrgyzstan [*Taksonomiya virusa Issyk-Kul' (Issyk-Kul virus, ISKV; Bunyaviridae, Nairovirus), vzbuditeleya Issyk-Kul'skoy likhoradki, izolirovannogo ot letuchikh myshey (Vespertilionidae) i kleshchey Argas (Carios) vespertilionis (Latreille, 1796)*]. *Voprosy virusologii.* 2013; 58(5): 11–5 (in Russian).
18. Kuz'min V., Botvinkin A.D., Poleschuk E.M., Orciari L.A., Rupprecht C.E. Bat rabies surveillance in the former Soviet Union. *Dev. Biol. (Basel).* 2006; 125: 273–82.
19. Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J. H. et al. Bats Are Natural Reservoirs of SARS-like Coronaviruses. *Science.* 2005; 310(5748):676–79. doi: 10.1126/science.1118391.
20. Drexler J.F., Corman V.M., Drosten C. Ecology, evolution and classification of bat coronaviruses in the aftermath of SARS. *Antiviral Res.* 2014; 101: 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.10.013>.
21. Groot R.J., Baker S.C., Baric R., Enjuanes L., Gorbalenya A.E., Holmes K.V., et al. «Family Coronaviridae». In: King A.M., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier; 2012: 806–28.
22. Woo P.C., Huang Y., Lau S.K., Yuen K.Y. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses.* 2010; 2(8): 1804–20. <https://doi.org/10.3390/v2081803>.
23. L'vov D.K., Gulyukin M.I., Zaberezhnyy A.D., Gulyukin A.M. Formation of population gene pools of zoonotic viruses, potentially threatening biosafety [*Formirovaniye populyatsionnogo genofonda potentsial'no ugrozhayushchikh biobezopasnosti zoonoznykh virusov*]. *Voprosy virusologii.* 2020; 65(5): 243–58. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-5-1> (in Russian).
24. Haake C., Cook S., Pusterla N., Murphy B. Coronavirus Infections in Companion Animals: Virology, Epidemiology, Clinical and Pathologic Features. *Viruses.* 2020; 12(9): 1023. <https://doi.org/10.3390/v12091023>.
25. Schulz L.L., Tonsor G.T. Assessment of the economic impacts of porcine epidemic diarrhea virus in the United States. *J. Anim. Sci.* 2015; 93(11): 5111–8. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9136>.
26. Colvero L.P., Villarreal L.Y., Torres C.A., Brañdo P.E. Assessing the economic burden of avian infectious bronchitis on poultry farms in Brazil. *Rev. Sci. Tech.* 2015; 34(3): 993–9. <https://doi.org/10.20506/rst.34.3.2411>.
27. Yatsyshina S.B., Mamoshina M.V., Shipulina O.Yu., Podkolzin A.T., Akimkin V.G. Analysis of human coronavirus circulation [*Analiz tsirkulyatsii koronavirusov cheloveka*]. *Voprosy virusologii.* 2020; 65(5): 267–76. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-5-3> (in Russian).
28. L'vov D.K., Burtseva E.I., Kolobukhina L.V., Fedyakina I.T., Bovin N.V., Ignatjeva A.V., et al. Peculiarities of the influenza and ARVI viruses circulation during epidemic season 2019–2020 in some regions of Russia [*Osobennosti tsirkulyatsii virusov grippa i ORVI v epidemicheskoy sezonye 2019–2020 gg. v ot-del'nykh regionakh Rossii*]. *Voprosy virusologii.* 2020; 65(6): 335–49. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-6-4> (in Russian).
29. Rabaan A.A., Al-Ahmed S.H., Haque S., Sah R., Tiwari R., Malik Y.S., et al. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: A comparative overview. *Infez. Med.* 2020; 28(2): 174–84.
30. Fehr A.R., Perlman S. Coronaviruses: An Overview of Their Replication and Pathogenesis. *Methods Mol. Biol.* 2015; 1282: 1–23. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7_1).
31. Guan Y., Zheng B.J., He Y.Q., Liu X.L., Zhuang Z.X., Cheung C.L., et al. Isolation and characterization of viruses related to the SARS

- coronavirus from animals in Southern China. *Science*. 2003; 302: 276–8. <https://doi.org/10.1126/science.1087139>.
32. Banerjee A., Kulcsar K., Misra V., Frieman M., Mossman K. Bats and coronaviruses. *Viruses*. 2019; 11(1): 41. <https://doi.org/10.3390/v11010041>.
  33. European Centre for Disease Prevention and Control. Distribution of confirmed cases of MERS-CoV by place of infection and month of onset. Available at: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/distribution-confirmed-cases-mers-cov-place-infection-and-month-onset-march-2012> (accessed January 14, 2021).
  34. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) – Republic of Korea. Available at: <https://www.who.int/csr/don/01-june-2015-mers-korea/en/> (accessed January 14, 2021).
  35. Falzarano D., Kamissoko B., de Wit E., Maïga O., Cronin J., Samaké K., et al. Dromedary camels in northern Mali have high seropositivity to MERS-CoV. *One Health*. 2017; 3: 41–3. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.03.003>.
  36. Alexandersen S., Kobinger G.P., Soule G., Wernery U. Middle East respiratory syndrome coronavirus antibody reactors among camels in Dubai, United Arab Emirates, in 2005. *Transbound. Emerg. Dis.* 2014; 61(2): 105–108. <https://doi.org/10.1111/tbed.12212>.
  37. Alshukairi A.N., Zheng J., Zhao J., Nehdi A., Baharoon S.A., Layqah L., et al. High prevalence of MERS-CoV infection in camel workers in Saudi Arabia. *mBio*. 2018; 9(5): e01985-18. <https://doi.org/10.1128/mbio.01985-18>.
  38. Anthony S.J., Gilardi K., Menachery V.D., Goldstein T., Ssebide B., Mbabazi R., et al. Further evidence for bats as the evolutionary source of middle east respiratory syndrome coronavirus. *mBio*. 2017; 8(2): e00373-17. <https://doi.org/10.1128/mbio.00373-17>.
  39. Reusken C.B., Messadi L., Feyisa A., Ularanu H., Godeke G.J., Danmarwa A., et al. Geographic distribution of MERS coronavirus among dromedary camels, Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(8): 1370–4. <https://doi.org/10.3201/eid2008.140590>.
  40. Corman V.M., Jores J., Meyer B., Younan M., Liljander A., Said M.Y., et al. Antibodies against MERS coronavirus in dromedary camels, Kenya, 1992–2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(8): 1319–22. <https://doi.org/10.3201/eid2008.140596>.
  41. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(8): 727–33. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2001017>.
  42. Li X., Wang W., Zhao X., Zai J., Zhao Q., Li Y., et al. Transmission dynamics and evolutionary history of 2019-nCoV. *J. Med. Virol.* 2020; 92(5): 501–11. <https://doi.org/10.1002/jmv.25701>.
  43. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) Situation Report – 146. Available at: [https://www.who.int/docs/default-source/coronavirus/situation-reports/20200614-covid-19-sitrep-146.pdf?sfvrsn=5b89bdad\\_4](https://www.who.int/docs/default-source/coronavirus/situation-reports/20200614-covid-19-sitrep-146.pdf?sfvrsn=5b89bdad_4) (accessed January 14, 2021).
  44. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020; 579(7798): 270–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>.
  45. L'vov D.K., Al'khovskiy S.V., Kolobukhina L.V., Burtseva E.I. Etiology of epidemic outbreaks COVID-19 in Wuhan, Hubei province, Chinese People Republic associated with 2019-nCoV (*Nidovirales, Coronaviridae, Coronavirinae, Betacoronavirus, Subgenus Sarbecovirus*): lessons of SARS-CoV outbreak [*Etiologiya epidemicheskoy vspyshki COVID-19 v g. Ukhan' (provintsiya Hubej, Kitayskaya Narodnaya Respublika), assotsirovannoy s virusom 2019-nCoV (Nidovirales, Coronaviridae, Coronavirinae, Betacoronavirus, podrod Sarbecovirus): uroki epidemii SARS-CoV*]. *Voprosy virusologii*. 2020; 65(1): 6–15. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-6-15> (in Russian).
  46. L'vov D.K., Al'khovskiy S.V. Source of the COVID-19 pandemic: ecology and genetics of coronaviruses (*Betacoronavirus: Coronaviridae*) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (subgenus *Sarbecovirus*), and MERS-CoV (subgenus *Merbecovirus*) [*Istoki pandemii COVID-19: ekologiya i genetika koronavirusov (Betacoronavirus: Coronaviridae) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (podrod Sarbecovirus), MERS-CoV (podrod Merbecovirus)*]. *Voprosy virusologii*. 2020; 65(2): 62–70. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-2-62-70> (in Russian).
  47. Gazaryan S.V. *Ecological and faunal analysis of the bat population (Chiroptera) Western Caucasus [Ekologo-faunisticheskij analiz naseleniya rukokrylykh (Chiroptera) Zapadnogo Kavkaza]*: Diss. Moscow; 2002 (in Russian).
  48. Ivanov S.P., Fateryga A.V., eds. *Red Book of the Republic of Crimea. Animals [Krasnaya kniga Respubliki Krym. Zhivotnye]*. Simferopol': Arial; 2015 (in Russian).
  49. Drexler J.F., Gloza-Rausch F., Glende J., Corman V.M., Muth D., Goettsche M., et al. Genomic characterization of severe acute respiratory syndrome-related coronavirus in european bats and classification of coronaviruses based on partial RNA-dependent RNA polymerase gene sequences. *J. Virol.* 2010; 84(21): 11336–49. <https://doi.org/10.1128/jvi.00650-10>.
  50. Rihtaric D., Hostnik P., Steyer A., Grom J., Toplak I. Identification of SARS-like coronaviruses in horseshoe bats (*Rhinolophus hipposideros*) in Slovenia. *Arch. Virol.* 2010; 155(4): 507–14. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0612-5>.
  51. Monchatre-Leroy E., Boué F., Boucher J.M., Renault C., Moutou F., Ar Guilh M., et al. Identification of alpha and beta Coronavirus in wildlife species in France: bats, rodents, rabbits, and hedgehogs. *Viruses*. 2017; 9(12): 364. <https://doi.org/10.3390/v9120364>.

---

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

---

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



### Активность человеческого рекомбинантного интерферона альфа-2b *in vitro* в отношении вируса SARS-CoV-2

Логинова С.Я., Щукина В.Н., Савенко С.В., Борисевич С.В.

ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны России, 141306, Сергиев Посад-6, Россия

**Введение.** Пандемическое распространение новой коронавирусной инфекции COVID-19 вызвало чрезвычайную ситуацию мирового масштаба и привлекло к себе внимание специалистов здравоохранения и населения всех стран. Значительный рост числа новых случаев инфицирования её возбудителем – вирусом SARS-CoV-2 демонстрирует актуальность поиска лекарственных средств, эффективных в отношении данного патогена.

**Целью** настоящей работы являлась оценка противовирусной активности человеческого рекомбинантного интерферона альфа-2b (ИФН-α2b) в отношении SARS-CoV-2 *in vitro*.

**Материал и методы.** Эксперименты выполняли на постоянной культуре клеток почки африканской зелёной мартышки (*Chlorocebus sabaeus*) Vero C1008. Эффективность препаратов оценивали по подавлению репродукции вируса *in vitro*. Биологическую активность определяли по формированию негативных колоний титрованием вирусосодержащей суспензии в культуре Vero C1008.

**Результаты.** Изучена активность лекарственных препаратов на основе ИФН-α2b с высоким профилем безопасности и доказанной эффективностью при профилактике и лечении гриппа и острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) относительно нового пандемического вируса SARS-CoV-2 в культуре Vero C1008. ИФН-α2b эффективно подавлял репродукцию инфекционного агента при внесении в культуру как за 24 ч до инфицирования, так и через 2 ч после него. В диапазоне концентраций 10<sup>2</sup>–10<sup>6</sup> МЕ/мл отмечалось полное подавление репродукции SARS-CoV-2.

**Обсуждение.** ИФН-α2b продемонстрировал *in vitro* высокую противовирусную активность в отношении нового коронавируса. Кроме того, вещество обладает высоким химиотерапевтическим индексом (>1000).

**Заключение.** Лекарственные препараты на основе ИФН-α2b для интраназального применения обладают высокой противовирусной активностью и перспективны для изучения *in vivo* в плане профилактики и лечения COVID-19.

**Ключевые слова:** интерферон α2b; COVID-19; SARS-CoV-2; Vero; *in vitro*; противовирусная активность

**Для цитирования:** Логинова С.Я., Щукина В.Н., Савенко С.В., Борисевич С.В. Активность человеческого рекомбинантного интерферона альфа-2b *in vitro* в отношении вируса SARS-CoV-2 *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(2): 123-128. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-13>

**Для корреспонденции:** Борисевич Сергей Владимирович, д-р биол. наук, профессор, член-корр. РАН, начальник института, ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 141306, Сергиев Посад-6, Россия. E-mail: 48cnii@mail.ru

**Участие авторов:** Логинова С.Я. – концепция и дизайн исследования, сбор литературных данных, сбор и обработка материала, написание текста, редактирование статьи; Щукина В.Н. – сбор и обработка материала, статистический анализ; написание текста; Савенко С.В. – сбор и обработка материала; Борисевич С.В. – написание текста, редактирование статьи.

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

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

Поступила 19.09.2020

Принята в печать 27.03.2021

### *In vitro* activity of human recombinant alpha-2b interferon against SARS-CoV-2 virus

Svetlana Ya. Loginova, Veronika N. Shchukina, Sergey V. Savenko, Sergey V. Borisevich

FSBI «Central Scientific Research Institute No. 48» of the Ministry of Defense of Russia, 141306, Sergiev Posad, Russia

**Introduction.** The pandemic spread of a new coronavirus infection, COVID-19, has caused a global emergency and attracted the attention of public health professionals and the population of all countries. A significant increase in the number of new cases of SARS-CoV-2 infection demonstrates the urgency of finding drugs effective against this pathogen.

The **aim** of this work was to evaluate the *in vitro* antiviral efficacy of human recombinant alpha-2b interferon (IFN-α2b) against SARS-CoV-2 virus.

**Material and methods.** The experiments had been carried out on Vero C1008, the continuous line of African green monkey (*Chlorocebus sabaeus*) kidney cells. The effectiveness of the drugs was assessed by the suppression of viral reproduction *in vitro*. The biological activity was determined using titration of a virus-containing suspension in a Vero C1008 cell culture by the formation of negative colonies.

**Results.** The antiviral efficacy of the IFN- $\alpha$ 2b-based medications, which have a high safety profile and proven efficacy in the prevention and treatment of influenza and acute respiratory viral infections (ARVI), has been studied against the new pandemic SARS-CoV-2 virus *in vitro* experiments in Vero C1008 cell culture. IFN- $\alpha$ 2b effectively inhibits the reproduction of the virus when applied both 24 hrs before and 2 hrs after infection. In the IFN- $\alpha$ 2b concentration range  $10^2$ – $10^6$  IU/ml a complete suppression of the reproduction of the SARS-CoV-2 virus had been demonstrated.

**Discussion.** IFN- $\alpha$ 2b demonstrated *in vitro* high antiviral activity against SARS-CoV-2. In addition, the substance has a high chemotherapeutic index ( $>1000$ ).

**Conclusion.** Medications for intranasal use based on IFN- $\alpha$ 2b have high antiviral activity and are promising drugs for *in vivo* study in terms of prevention and treatment of COVID-19.

**Keywords:** *interferon  $\alpha$ 2b; COVID-19; SARS-CoV-2; Vero; in vitro; antiviral activity*

**For citation:** Loginova S.Ya., Shchukina V.N., Savenko S.V., Borisevich S.V. Human recombinant alpha-2b interferon *in vitro* activity against SARS-CoV-2 virus. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(2): 123-128 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-13>

**For correspondence:** Borisevich Sergey Vladimirovich, D.Sci. (Biol.), Professor, Corresponding Member of RAS; Director, FSBI «Central Scientific Research Institute No. 48» of the Ministry of Defense of Russia, 141306, Sergiev Posad, Russia. E-mail: 48cnii@mil.ru

**Information about the authors:**

Loginova S.Ya., <http://orcid.org/0000-0001-6732-8404>

Shchukina V.N., <http://orcid.org/0000-0002-5461-3641>

Savenko S.V., <https://orcid.org/0000-0002-5175-916X>

Borisevich S.V., <http://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

**Contribution:** Loginova S.Ya. – research concept and design, literature data collection, material collection and processing, writing of the text, editing of the article; Shchukina V.N. – material collection and processing, statistical analysis, writing of the text; Savenko S.V. – material collection and processing; Borisevich S.V. – writing of the text, editing of the article.

**Acknowledgement.** The study had no sponsorship.

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

Received 19 September 2020

Accepted 27 March 2021

## Введение

Распространение новой коронавирусной инфекции COVID-19, достигшее согласно определению ВОЗ уровня пандемии, вошло в историю как чрезвычайная ситуация мирового масштаба и привлекло к себе внимание специалистов здравоохранения и населения во всех странах [1, 2]. Значительный рост числа новых случаев инфицирования её возбудителем – вирусом SARS-CoV-2 демонстрирует актуальность поиска эффективных в отношении него лекарственных препаратов. Поиск новых терапевтических агентов для лечения вновь возникшего заболевания представляет собой долгий и дорогостоящий процесс с высокой частотой выбывания потенциальных кандидатов [3, 4]. Неоправданная поспешность при разработке новых медикаментозных средств в условиях глобальной пандемии неприемлема. В связи с этим в нынешней ситуации, когда по объективным причинам современное медицинское сообщество не может предложить эффективный алгоритм профилактики и лечения COVID-19, который обладал бы достаточной доказательной базой, необходимо использовать комбинации противовирусных препаратов, ранее многократно доказавших свою безопасность и эффективность на штаммах возбудителей острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ), в том числе коронавирусов.

Особое внимание должно быть уделено интерферонам (ИФН) и их индукторам [5, 6]. Показано, что атипичная пневмония, вызванная SARS-CoV-2, способна нарушать опосредованный ИФН сигнальный путь [7]. Японские учёные продемонстрировали, что протеин, экспрессируемый под контролем гена *ORF3b* нового коронавируса, сильнее подавляет синтез интерферонов I типа (ИФН-I), чем продукт более длинного одноимённого гена возбудителя атипичной пневмонии SARS-CoV. Кроме того, естественные вариации длины гена у этого инфекционного агента оказывают влияние на активность кодируемого белка [8]. Различия при этом незначительные, но статистически значимые. Исходя из представленных выше данных можно рассматривать использование данного класса веществ как безопасное и эффективное направление в лечении COVID-19 [9].

Таким образом, ИФН-I следует вводить как можно раньше, чтобы оптимизировать противовирусную терапию и избежать нежелательных явлений [10]. Кроме того, совокупность патологических проявлений новой коронавирусной инфекции, включающая главным образом (хотя и не только) лёгочные поражения, имеет сходные с интерферопатиями характеристики. Можно предположить, что SARS-CoV-2 индуцирует чрезмерный ИФН-I-опосредованный

противовирусный ответ, приводящий к повреждению тканей. Эта гипотеза подтверждается экспериментальными исследованиями [11] и клиническими данными, показывающими, что высокое содержание воспалительных биомаркеров ассоциировано с повышенной смертностью [12]. Отсюда также следует, что назначение ИФН-I должно быть ограничено ранними фазами инфекции. Более того, на её поздних стадиях возможно применение антиинтерфероновых препаратов для смягчения течения патологического процесса [13]. Кроме того, высказано предположение, что интерфероны эффективны только в случае отсутствия у пациентов сопутствующих заболеваний [14, 15].

Целью настоящей работы явилась экспериментальное изучение противовирусной активности препаратов человеческого рекомбинантного интерферона альфа-2b (ИФН- $\alpha$ 2b) *in vitro* в отношении коронавируса SARS-CoV-2.

### Материал и методы

**Вирус.** В работе использовали вирус SARS-CoV-2 (вариант B), полученный из ФГБУ «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (ГНЦ ВБ «Вектор») Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) и хранившийся в Специализированной коллекции ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» («48 ЦНИИ») Министерства обороны России.

**Культура клеток и среды.** Эксперименты выполняли на постоянной культуре клеток почки африканской зелёной мартышки (*Chlorocebus sabaues*) – Vero C1008, инфицированных вирусом SARS-CoV-2 (вариант B). Множественность инфицирования составила 0,0001 БОЕ/кл. В качестве ростовой и поддерживающей сред применяли среду Игла MEM на солевом растворе Хенкса, содержащую соответственно 7,5 и 2% фетальной телячьей сыворотки (ФТС).

#### Исследуемые препараты.

1. Человеческий рекомбинантный ИФН- $\alpha$ 2b в форме капель назальных, серия 845, специфическая активность  $10^5$  МЕ/мл.

2. Человеческий рекомбинантный ИФН- $\alpha$ 2b форте в форме спрея назального дозированного, серия ES4, специфическая активность  $10^7$  МЕ/мл.

3. Человеческий рекомбинантный ИФН- $\alpha$ 2b, субстанция-раствор концентрированный (замороженный), серия I-05, специфическая активность  $5 \times 10^8$  МЕ/мл.

**Референс-препарат.** Ребиф® – препарат ИФН бета-1a (ИФН- $\beta$ 1a), полученный методом генной инженерии с использованием культуры клеток яичника китайского хомячка (*Cricetulus griseus*), серия RB-S403004C.

Использовали 2 схемы внесения препаратов: за 24 ч до инфицирования клеток и через 2 ч после него. По истечении срока инкубации проводили криодеструкцию клеток, пробы с одинаковой концентрацией препарата объединяли.

Биологическую активность возбудителя SARS-CoV-2 определяли по формированию негативных колоний

в объединённой пробе титрованием вирусосодержащей суспензии в клеточной культуре Vero C1008 [16]. Оценку противовирусной эффективности препаратов проводили в соответствии с рекомендациями ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» (НЦЭСМП) Минздрава России [17].

Коэффициент ингибирования (КИ, %) рассчитывали по формуле:

$$\text{КИ} = \frac{A_{\text{контр}} - A_{\text{оп}}}{A_{\text{контр}}} \times 100, \quad (1)$$

где  $A_{\text{контр}}$  – биологическая активность вируса, определённая в клетках без внесения химиопрепарата, БОЕ/мл (БОЕ – бляшкообразующая единица);

$A_{\text{оп}}$  – аналогичный показатель, определённый в клетках с внесением химиопрепарата, БОЕ/мл.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с использованием программы Microsoft Office Excel 2007. Основными параметрами оценки эффективности препаратов *in vitro* считали снижение уровня накопления вируса ( $\Delta$ lg БОЕ/мл) и коэффициент ингибирования (КИ) его репродукции (%).

### Результаты

Изучение противовирусной активности препаратов интерферона альфа-2b проводили в культуре клеток Vero C1008, инфицированных вирусом SARS-CoV-2, вариант B, по показателю ингибирования репродукции вируса. Схемы внесения препарата: за 24 ч и через 2 ч после. Культуру клеток инфицировали вирусом SARS-CoV-2, вариант B, в дозе  $10^5$  ЦПД<sub>50</sub>.

Полученные в ходе настоящего эксперимента результаты представлены в табл. 1 и 2.

При применении препаратов ИФН- $\alpha$ 2b за 24 ч до инфицирования последние в широком диапазоне концентраций формируют антивирусное состояние клетки. В концентрациях  $10^2$ – $10^6$  МЕ/мл вещества полностью подавляют репродукцию вируса SARS-CoV-2 в клеточной культуре Vero C1008. Коэффициент ингибирования составляет 100%.

Через 2 ч после инфицирования ИФН- $\alpha$ 2b в концентрациях  $10^2$ – $10^6$  МЕ/мл полностью подавляет репродукцию вируса SARS-CoV-2 в культуре Vero C1008. Коэффициент ингибирования при этом также равен 100%. Эффективность исследуемого препарата сопоставима с таковой ИФН- $\beta$ 1a относительно указанного варианта возбудителя.

### Обсуждение

Метод оценки эффективности лекарственных препаратов в отношении подавления репродукции вируса позволяет точно оценивать противовирусную активность того или иного вещества в опытах *in vitro*. Принцип такого подхода основан на способности вирусом размножаться в культуре клеток, а также на феномене ингибирования репродукции возбудителей при по-

**Таблица 1. Оценка противовирусной активности препаратов интерферона альфа-2b в отношении вируса SARS-CoV-2 (вариант B) в культуре клеток Vero C1008 при применении за 24 ч до инфицирования (n = 3)**

**Table 1. Evaluation of the antiviral activity of interferon alpha-2b against the SARS-CoV-2 virus (variant B) in a Vero C1008 cell culture when used 24 hrs before infection (n = 3)**

Препарат Medication	Доза, МЕ/мл Dose, IU/ml	Уровень накопления вируса, lg БОЕ/мл, X ± s <sub>x</sub> Virus accumulation rate, lg PFU/ml, X ± s <sub>x</sub>	Снижение уровня накопления вируса, Δlg БОЕ/мл Reduction of virus accumulation, Δlg PFU/ml	Коэффициент ингибирования, % Inhibition coefficient, %
Интерферон альфа-2b, капли назальные Interferon alpha-2b nasal drops	10 <sup>3</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>2</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
Интерферон альфа-2b форте, спрей назальный Interferon alpha-2b forte nasal spray	10 <sup>4</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>3</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>2</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
Интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный, субстанция-раствор концентрированный замороженный Interferon alpha-2b human recombinant, substance-solution concentrated frozen	10 <sup>7</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>6</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>5</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>4</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>3</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>2</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>1</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
Ребиф® (интерферон бета-1a) Rebif® (interferon beta-1a)	10 <sup>5</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>4</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>3</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>2</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
Контроль инфицирующей дозы Infectious dose control		6,44 ± 0,09		

**Примечание.** БОЕ – бляшкообразующая единица.

**Note.** PFU is plaque forming unit.

**Таблица 2. Оценка противовирусной активности препаратов интерферона альфа-2b в отношении вируса SARS-CoV-2 (вариант B) в культуре клеток Vero C1008 при применении через 2 ч после инфицирования (n = 3)**

**Table 2. Evaluation of the antiviral activity of interferon alpha-2b against the SARS-CoV-2 virus (variant B) in the Vero C1008 cell culture when used 2 hrs after infection (n = 3)**

Препарат Medication	Доза, МЕ/мл Dose, IU/ml	Уровень накопления вируса, lg БОЕ/мл, X ± s <sub>x</sub> Virus accumulation rate, lg PFU/ml, X ± s <sub>x</sub>	Снижение уровня накопления вируса, Δlg БОЕ/мл Reduction of virus accumulation, Δlg PFU/ml	Коэффициент ингибирования, % Inhibition coefficient, %
Интерферон альфа-2b, капли назальные Interferon alpha-2b nasal drops	10 <sup>3</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>2</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
Интерферон альфа-2b форте, спрей назальный Interferon alpha-2b forte nasal spray	10 <sup>4</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>3</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>2</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
Интерферон альфа-2b человеческий рекомбинантный, субстанция-раствор концентрированный замороженный Interferon alpha-2b human recombinant, substance-solution concentrated frozen	10 <sup>7</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>6</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>5</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>4</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>3</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>2</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>1</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
Ребиф® (интерферон бета-1a) Rebif® (interferon beta-1a)	10 <sup>5</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>4</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>3</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
	10 <sup>2</sup>	0,00 ± 0,00	6,44	100
Контроль инфицирующей дозы Infectious dose control		6,44 ± 0,09		

**Примечание.** БОЕ – бляшкообразующая единица.

**Note.** PFU is plaque forming unit.

мощи эффективных неспецифических медицинских средств защиты (НМСЗ). Известно, что при увеличении множественности инфицирования степень подавления репродукции уменьшается, поэтому точность определения антивирусной активности препаратов является заниженной. Согласно данным литературы, оптимальная множественность инфицирования моно-слоя клеточной культуры при оценке противовирусной эффективности должна составлять от 0,0001 до 0,001 БОЕ/кл [18]. Высокоактивные средства при данной инфицирующей дозе, как правило, полностью подавляют репродукцию возбудителя, тогда как при более высоком значении этого параметра данный эффект может быть незначительным [19].

Результаты исследования показывают, что ИФН- $\alpha 2b$  продемонстрировал *in vitro* высокую противовирусную активность в отношении SARS-CoV-2; кроме того, вещество обладает высоким химиотерапевтическим индексом ( $>1000$ ). В предыдущих исследованиях показано, что белки ORF6 и ORF3B этого вируса усечены [9] и, возможно, утратили свои антиинтерфероновые функции. Это может объяснить проявляемую возбудителем значительную чувствительность к препаратам ИФН- $\alpha$  в условиях эксперимента. Репликация патогена подавляется интерферонами не полностью, тем не менее при этом вирусные титры снижаются на несколько порядков. Тот факт, что SARS-CoV-2 существенно более чувствителен к ИФН-I, чем SARS-CoV, предполагает, по крайней мере, равную эффективность его применения в случае наличия первого из них по сравнению со вторым. В пользу этой гипотезы свидетельствуют данные китайских учёных, установивших, что использование лекарственной формы в виде спрея на основе ИФН- $\alpha 2b$  способно снизить уровень инфицирования SARS-CoV-2 [20].

### Заключение

На основании полученных экспериментальных данных могут быть сделаны следующие выводы:

1. Человеческий рекомбинантный ИФН- $\alpha 2b$  полностью подавляет репродукцию вируса SARS-CoV-2 (вариант В) в культуре клеток Vero C1008 при применении в концентрациях  $10^2$ – $10^6$  МЕ/мл через 2 ч после инфицирования.

2. Человеческий рекомбинантный ИФН- $\alpha 2b$  полностью подавляет репродукцию SARS-CoV-2 (вариант В) в культуре клеток Vero C1008 при внесении за 24 ч до инфицирования в тех же концентрациях.

3. Препараты для интраназального назначения на основе ИФН- $\alpha 2b$  обладают высокой противовирусной активностью и являются перспективными лекарственными средствами для изучения *in vivo* в плане профилактики и лечения новой коронавирусной инфекции COVID-19.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Никифоров В.В., Суранова Т.Г., Чернобровкина Т.Я., Янковская Я.Д., Бутова С.В. Новая коронавирусная инфекция (COVID-19): клинико-эпидемиологические аспекты. *Архивъ внутренней медицины*. 2020; 10(2): 87–93. <https://doi.org/10.20514/2226-6704-2020-10-2-87-93>.

2. Li G., De Clercq E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *Nat. Rev. Drug Discov*. 2020; 19(3): 149–50. <https://doi.org/10.1038/d41573-020-00016-0>.
3. Lythgoe M.P., Rhodes C.J., Ghataorhe P., Attard M., Wharton J., et al. Why drugs fail in clinical trials in pulmonary arterial hypertension, and strategies to succeed in the future. *Pharmacol. Ther*. 2016; 164: 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.04.012>.
4. Lythgoe M.P., Middleton P. Ongoing clinical trials for the management of the COVID-19 pandemic. *Trends Pharmacol. Sci*. 2020; 41(6): 363–82. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.03.006>.
5. Сологуб Т.В., Цветков В.В. Кагоцел в терапии гриппа и острых респираторных вирусных инфекций: анализ и систематизация данных по результатам доклинических и клинических исследований. *Терапевтический архив*. 2017; 89(8): 113–9. <https://doi.org/10.17116/terarkh2017898113-119>.
6. Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н. Теоретические и прикладные аспекты системы интерферонов: к 60-летию открытия интерферонов. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(1): 10–8. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-1-10-18>.
7. Sallard E., Lescure F.X., Yazdanpanah Y., Mentre F., Peiffer-Smadja N. Type I interferons as a potential treatment against COVID-19. *Antiviral Res*. 2020; 178: 104791. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104791>.
8. Kopecky-Bromberg S.A., Martinez-Sobrido L., Frieman M., Baric R.A., Palese P. Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *J. Virol*. 2007; 81(2): 548–57. <https://doi.org/10.1128/jvi.01782-06>.
9. Lokugamage K.G., Schindewolf C., Menachery V.D. SARS-CoV-2 sensitive to type I interferon pretreatment. *bioRxiv*. 2020; 03.07.982264. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.03.07.982264> (accessed March 20, 2021).
10. Channappanavar R., Fehr A.R., Zheng J., Wohlford-Lenane C., Abrahante J.E., Mack M., et al. IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes. *J. Clin. Invest*. 2019; 129(9): 3625–39. <https://doi.org/10.1172/jci126363>.
11. Siddiqi H.K., Mehra M.R. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: a clinical-therapeutic staging proposal. *J. Heart Lung Transplant*. 2020; 39(5): 405–7. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2020.03.012>.
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. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3).
13. Zhang W, Zhao Y, Zhang F, Wang Q, Li T, Liu Z., et al. The use of anti-inflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): the perspectives of clinical immunologists from China. *Clin. Immunol*. 2020; 214: 108393. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108393>.
14. Al-Tawfiq J.A., Momattin H., Dib J., Memish Z.A. Ribavirin and interferon therapy in patients infected with the Middle East respiratory syndrome coronavirus: an observational study. *Int. J. Infect. Dis*. 2014; 20: 42–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.12.003>.
15. Shalhoub S., Farahat F., Al-Jiffri A., Simhairi R., Shamma O., Siddiqi N., et al. IFN- $\alpha 2a$  or IFN- $\beta 1a$  in combination with ribavirin to treat Middle East respiratory syndrome coronavirus pneumonia: a retrospective study. *J. Antimicrob. Chemother*. 2015; 70(7): 2129–32. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv085>.
16. Сыромятникова С.И., Писцов М.Н., Борисевич С.В., Хамитов Р.А., Марков В.И., Максимов В.А. Состав агарового покрытия для титрования методом негативных колоний коронавируса – возбудителя тяжёлого острого респираторного синдрома. Патент РФ № 2325436; 2008. Приоритет изобретения от 27 ноября 2005 г.
17. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Москва: Минздрав РФ; 2013.
18. Лагуткин Н.А., Митин Н.И., Старовойтова В.А. Методические подходы к поиску антивирусных препаратов, их испытание и оценка. В кн.: Ложа В.П., Индулен М.К., Калныня В.А., Канель Н.А., ред. *Вирусные ингибиторы и механизм их действия*. Рига: Зинатне; 1977.
19. Чижов Н.П., Ершов Ф.И., Индулен М.К. *Основы экспериментальной химиотерапии вирусных инфекций*. Рига: Зинатне; 1988.

20. Shen K.L., Yang Y.H. Diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus infection in children: a pressing issue. *World J. Pediatr.* 2020; 16(3): 219–21. <https://doi.org/10.1007/s12519-020-00344-6>.

## REFERENCES

- Nikiforov V.V., Suranova T.G., Chernobrovkina T.Ya., Yankovskaya Ya.D., Burova S.V. New coronavirus infection (COVID-19): clinical and epidemiological aspects [Novaya koronavirusnaya infektsiya (COVID-19): kliniko-epidemiologicheskie aspekty]. *Arkhiv vnutrenney meditsiny.* 2020; 10(2): 87–93. <https://doi.org/10.20514/2226-6704-2020-10-2-87-93> (in Russian).
- Li G., De Clercq E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). *Nat. Rev. Drug Discov.* 2020; 19(3): 149–50. <https://doi.org/10.1038/d41573-020-00016-0>.
- Lythgoe M.P., Rhodes C.J., Ghataorhe P., Attard M., Wharton J., et al. Why drugs fail in clinical trials in pulmonary arterial hypertension, and strategies to succeed in the future. *Pharmacol. Ther.* 2016; 164: 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.04.012>.
- Lythgoe M.P., Middleton P. Ongoing clinical trials for the management of the COVID-19 pandemic. *Trends Pharmacol. Sci.* 2020; 41(6): 363–82. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.03.006>.
- Sologub T.V., Tsvetkov V.V. Gagocel in the therapy of influenza and acute respiratory viral infections: data analysis and systematization from the results of preclinical and clinical trials [Kagocel v terapii grippe i ostrykh respiratornykh virusnykh infektsiy: analiz i sistematizatsiya dannyykh po rezul'tatam doklinicheskikh i klinicheskikh issledovaniy]. *Terapevticheskiy arkhiv.* 2017; 89(8): 113–9. <https://doi.org/10.17116/terarkh2017898113-119> (in Russian).
- Ershov F.I., Narovlyanskiy A.N. Theoretical and applied aspects of the interferon system: to the 60th anniversary of the discovery of interferons [Teoreticheskie i prikladnye aspekty sistemy interferonov: k 60-letiyu otkrytiya interferonov]. *Voprosy virusologii.* 2018; 63(1): 10–8. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-1-10-18> (in Russian).
- Sallard E., Lescure F.X., Yazdanpanah Y., Mentre F., Peiffer-Smadja N. Type I interferons as a potential treatment against COVID-19. *Antiviral Res.* 2020; 178: 104791. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104791>.
- Kopecky-Bromberg S.A., Martinez-Sobrido L., Frieman M., Baric R.A., Palese P. Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists. *J. Virol.* 2007; 81(2): 548–57. <https://doi.org/10.1128/jvi.01782-06>.
- Lokugamage K.G., Schindewolf C., Menachery V.D. SARS-CoV-2 sensitive to type I interferon pretreatment. *bioRxiv.* 2020; 03.07.982264. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.03.07.982264> (accessed March 20, 2021).
- Channappanavar R., Fehr A.R., Zheng J., Wohlford-Lenane C., Abrahante J.E., Mack M., et al. IFN-I response timing relative to virus replication determines MERS coronavirus infection outcomes. *J. Clin. Invest.* 2019; 129(9): 3625–39. <https://doi.org/10.1172/jci126363>.
- Siddiqi H.K., Mehra M.R. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: a clinical-therapeutic staging proposal. *J. Heart Lung Transplant.* 2020; 39(5): 405–7. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2020.03.012>.
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3).
- Zhang W., Zhao Y., Zhang F., Wang Q., Li T., Liu Z., et al. The use of anti-inflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): the perspectives of clinical immunologists from China. *Clin. Immunol.* 2020; 214: 108393. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2020.108393>.
- Al-Tawfiq J.A., Momattin H., Dib J., Memish Z.A. Ribavirin and interferon therapy in patients infected with the Middle East respiratory syndrome coronavirus: an observational study. *Int. J. Infect. Dis.* 2014; 20: 42–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.12.003>.
- Shalhoub S., Farahat F., Al-Jiffri A., Simhairi R., Shamma O., Siddiqi N., et al. IFN- $\alpha$ 2a or IFN- $\beta$ 1a in combination with ribavirin to treat Middle East respiratory syndrome coronavirus pneumonia: a retrospective study. *J. Antimicrob. Chemother.* 2015; 70(7): 2129–32. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv085>.
- Syromyatnikova S.I., Pistsov M.N., Borisevich S.V., Khamitov R.A., Markov V.I., Maksimov V.A. Composition of agar coating for titration by negative colonies of coronavirus – the causative agent of severe acute respiratory syndrome. Patent RF No. 2325436; 2008. Priority of November 27, 2005 (in Russian).
- Guidelines for the experimental (preclinical) study of new pharmacological substances [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv]. Moscow: Ministry of Health of Russia; 2013 (in Russian).
- Lagutkin N.A., Mitin N.I., Starovoytova V.A. Methodological approaches to the search for antiviral drugs, their testing and evaluation. In: Lozha V.P., Indulen M.K., Kalnynya V.A., Kanel' N.A., eds. *Viral Inhibitors and Their Mechanism of Action [Metodicheskie podkhody k poisku antivirusnykh preparatov, ikh ispytanie i otsenka. V kn.: Lozha V.P., Indulen M.K., Kalnynya V.A., Kanel' N.A., red. Virusnye ingibitory i mekhanizm ikh deystviya]*. Riga: Zinatne; 1977 (in Russian).
- Chizhov N.P., Ershov F.I., Indulen M.K. *Fundamentals of Experimental Chemotherapy of Viral Infections [Osnovy eksperimental'noy khimioterapii virusnykh infektsiy]*. Riga: Zinatne; 1988 (in Russian).
- Shen K.L., Yang Y.H. Diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus infection in children: a pressing issue. *World J. Pediatr.* 2020; 16(3): 219–21. <https://doi.org/10.1007/s12519-020-00344-6>.



## Герпесвирусные инфекции и иммунологические нарушения при различных стадиях когнитивных расстройств альцгеймеровского типа

Крынский С.А.<sup>1</sup>, Малашенкова И.К.<sup>1,2</sup>, Огурцов Д.П.<sup>1,2</sup>, Хайлов Н.А.<sup>1</sup>, Чекулаева Е.И.<sup>1</sup>, Шипулина О.Ю.<sup>3</sup>, Пономарёва Е.В.<sup>4</sup>, Гаврилова С.И.<sup>4</sup>, Дидковский Н.А.<sup>2</sup>, Величковский Б.М.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>НИЦ «Курчатовский Институт», 123182, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», 119435, Москва, Россия;

<sup>3</sup>ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 111123, Москва, Россия;

<sup>4</sup>ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», 115522, Москва, Россия

**Введение.** Болезнь Альцгеймера (БА) – мультифакториальное заболевание, ведущее к прогрессирующему снижению памяти, зрительно-пространственных функций, эмоциональным и личностным изменениям. В настоящее время в качестве его наиболее раннего додементного клинического этапа рассматривается синдром мягкого когнитивного снижения амнестического типа (amnesic mild cognitive impairment, aMCI). В развитии и прогрессировании aMCI и начальной стадии БА играет роль нейровоспаление, которое может поддерживаться иммунологическими нарушениями системного характера. С учётом этого представляется актуальным исследование факторов (включая инфекционные), влияющих на характер иммунного статуса и выраженность системного воспалительного ответа у страдающих когнитивными расстройствами альцгеймеровского типа на различных стадиях.

**Цель** данной работы – получение новых данных о возможной роли герпесвирусов в возникновении и прогрессии aMCI и БА.

**Материал и методы.** Обследованы 100 больных с диагнозом aMCI, 45 пациентов с БА и 40 лиц контрольной группы. Определяли частоту выявления ДНК герпесвирусов (вирус Эпштейна–Барр (EBV), герпесвирусы человека 6 и 7 типов (HHV-6, HHV-7), цитомегаловирус (CMV)), уровни вирусной нагрузки, серологические маркёры герпесвирусных инфекций (ГВИ) (HHV-1- и CMV-инфекции). Иммунологические исследования включали оценку концентрации основных про- и противовоспалительных цитокинов, показателей гуморального и клеточного иммунитета.

**Результаты.** Установлены повышенная частота обнаружения EBV в слюне и более высокие уровни ДНК EBV в слюне при когнитивных расстройствах альцгеймеровского типа по сравнению с контрольной группой. Выявлено наличие связи между присутствием активной EBV-инфекции и изменениями иммунологических показателей у лиц с aMCI. Обнаружено, что уровень антител (АТ) IgG к CMV связан со стадией когнитивных расстройств у больных.

**Обсуждение.** Результаты указывают на возможную роль ГВИ, вызываемых EBV и CMV, в развитии иммунологических изменений при мягком когнитивном снижении и прогрессировании когнитивных расстройств альцгеймеровского типа.

**Заключение.** Полученные данные могут иметь значение для разработки методов прогнозирования течения БА, в том числе на её додементной стадии, и подходов к индивидуализированной терапии и профилактике.

**Ключевые слова:** *болезнь Альцгеймера; мягкое когнитивное снижение амнестического типа; воспаление; герпесвирусы; вирус Эпштейна–Барр*

**Для цитирования:** Крынский С.А., Малашенкова И.К., Огурцов Д.П., Хайлов Н.А., Чекулаева Е.И., Шипулина О.Ю., Пономарёва Е.В., Гаврилова С.И., Дидковский Н.А., Величковский Б.М. Герпесвирусные инфекции и иммунологические нарушения при различных стадиях когнитивных расстройств альцгеймеровского типа. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(2): 129-139. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-32>

**Для корреспонденции:** Крынский Сергей Андреевич, канд. мед. наук, научный сотрудник, НИЦ «Курчатовский Институт», 123182, Москва, Россия. E-mail: [srgkr002@gmail.com](mailto:srgkr002@gmail.com)

**Участие авторов:** Крынский С.А. – написание текста, статистическая обработка, создание рисунков, обзор публикаций на тему статьи; Малашенкова И.К. – разработка дизайна исследования, написание и редактирование текста, обзор публикаций на тему статьи; Огурцов Д.П. – выполнение полимеразной цепной реакции, статистическая обработка, создание рисунков, обзор публикаций на тему статьи; Хайлов Н.А. – выполнение иммуноферментного анализа, проточной цитометрии, статистическая обработка; Чекулаева Е.И. – выполнение иммуноферментного анализа, проточной цитометрии, статистическая обработка; Шипулина О.Ю. – создание тест-системы для определения HHV-7, обработка данных; Пономарёва Е.В. – набор больных в исследование и их клиническая характеристика; Гаврилова С.И. – разработка дизайна исследования, клиническая характеристика больных; Дидковский Н.А. – разработка дизайна исследования, обзор публикаций на тему статьи, редактирование текста; Величковский Б.М. – разработка дизайна исследования, обзор публикаций на тему статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках Государственного задания НИЦ «Курчатовский Институт» на 2021 г. (Тема 1.6 «Разработка основ инновационных биомедицинских технологий диагностики и терапии ряда социально значимых заболеваний»).

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность Эльвире Алексеевне Домоной и Ольге Юрьевне Сильвейстровой (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора) за предоставление реактивов для определения HHV-7.

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

Поступила 12.11.2020

Принята в печать 27.03.2021

## Herpesvirus infections and immunological disturbances in patients with different stages of Alzheimer's disease

Sergey A. Krynskiy<sup>1</sup>, Irina K. Malashenkova<sup>1,2</sup>, Daniil P. Ogurtsov<sup>1,2</sup>, Nikita A. Khailov<sup>1</sup>, Ekaterina I. Chekulaeva<sup>1</sup>, Ol'ga Y. Shipulina<sup>3</sup>, Elena V. Ponomareva<sup>4</sup>, Svetlana I. Gavrilo<sup>4</sup>, Nikolay A. Didkovsky<sup>2</sup>, Boris M. Velichkovsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup>NRC «Kurchatov Institute», 123182, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>FSBI «Federal Scientific and Clinical Center for Physico-Chemical Medicine of the Federal Medical and Biological Agency», 119435, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), 111123, Moscow, Russia;

<sup>4</sup>FSBSI «Mental Health Research Center», 115522, Moscow, Russia

**Introduction.** Alzheimer's disease (AD) is a multifactorial disease that leads to a progressive memory loss, visual-spatial impairments, emotional and personality changes. As its earliest pre-dementia clinical stage, amnesic mild cognitive impairment syndrome (aMCI) is currently considered. Neuroinflammation plays a role in the development and progression of aMCI and the initial stage of AD, which can be supported by immunological disorders of a systemic character. Study of factors, including infections, influencing immune disorders and systemic inflammatory response in patients with aMCI, is of great importance.

The **aim** of this study was to obtain new data on the possible role of herpesvirus infections in the development and progression of aMCI.

**Material and methods.** 100 patients with aMCI diagnosis, 45 patients with AD, 40 people from the control group were enrolled into the study. The frequency of DNA detection of herpesviruses (Epstein–Barr virus (EBV), human herpesviruses (HHV) type 6 and 7, cytomegalovirus (CMV)), the levels of viral load and the serological markers of herpesvirus infections (IgG to HHV-1, IgG to CMV) were determined. Immunological studies included an assessment of the level of the main pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, and indicators of humoral and cellular immunity.

**Results.** The study found an increased detection rate of EBV in saliva and a higher level of EBV DNA in saliva in aMCI and AD than in the control group. A relationship between the presence of active EBV infection and changes in immunological parameters in patients with aMCI were found. It was also discovered that the level of IgG antibodies to CMV is associated with the stage of AD.

**Discussion.** The results indicate a possible role of EBV- and CMV-induced infections in the development of immunological changes which are typical for mild cognitive impairment and in the progression of AD.

**Conclusion.** The obtained data can be important for prognostic methods addressing AD development, including its pre-dementia stage, and for new approaches to individualized treatment and prevention.

**Key words:** *Alzheimer's disease; amnesic mild cognitive impairment; inflammation; herpesviruses; Epstein–Barr virus*

**For citation:** Krynskiy S.A., Malashenkova I.K., Ogurtsov D.P., Khailov N.A., Chekulaeva E.I., Shipulina O.Yu., Ponomareva E.V., Gavrilo<sup>4</sup> S.I., Didkovsky N.A., Velichkovsky B.M. Herpesvirus infections and immunological disturbances in patients with different stages of Alzheimer's disease. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(2): 129–139. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-32>

**For correspondence:** Krynskiy Sergey Andreevich, Ph.D. (Med.), Researcher, Laboratory of Molecular Immunology and Virology, NRC «Kurchatov Institute», 123182, Moscow, Russia. E-mail: [srgkr002@gmail.com](mailto:srgkr002@gmail.com)

### Information about the authors:

Krynskiy S.A., <http://orcid.org/0000-0003-4328-865X>

Malashenkova I.K., <http://orcid.org/0000-0002-3604-9098>

Ogurtsov D.P., <http://orcid.org/0000-0003-0257-4713>

Khailov N.A., <http://orcid.org/0000-0002-3693-285X>

Chekulaeva E.I., <http://orcid.org/0000-0002-2559-2132>

Shipulina O.Yu., <http://orcid.org/0000-0003-4679-6772>

Ponomareva E.V., <http://orcid.org/0000-0002-2835-5706>

Gavrilo<sup>4</sup> S.I., <http://orcid.org/0000-0001-6683-0240>

Didkovsky N.A., <http://orcid.org/0000-0001-6567-5998>

Velichkovsky B.M., <http://orcid.org/0000-0001-7823-0605>

**Contribution:** Krynskiy S.A. – writing of the text, statistical analysis, making the figures, reviewing of publications; Malashenkova I.K. – developing the research design, writing and editing of the text, reviewing of publications; Ogurtsov D.P. – performing of the polymerase chain reaction, statistical analysis, making the figures, reviewing of publications; Khailov N.A. – performing of the enzyme-linked immunosorbent assay, flow cytometry, statistical analysis; Chekulaeva E.I. – performing of the enzyme-linked immunosorbent assay, flow cytometry, statistical analysis; Shipulina O.Yu. – making the test system for HHV-7 detection, assistance in data analysis; Ponomareva E.V. – enrollment and the clinical characterization of the patients; Gavrilova S.I. – developing the research design, clinical characterization of the patients; Didkovsky N.A. – developing the research design, reviewing publications, editing of the text; Velichkovsky B.M. – developing the research design, reviewing publications.

**Acknowledgements.** This work was done as a part of the State assignment of the NRC «Kurchatov Institute», year 2021 (1.6 «Development of the basis of innovative biomedical technologies of diagnostics and therapy of socially important diseases»).

**Acknowledgements.** The authors thank Elvira Domonova and Ol'ga Silveistrova (FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing for providing the reagents for HHV-7 detection.

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

Received 12 November 2020

Accepted 27 March 2021

## Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) – мультифакториальное заболевание, приводящее к прогрессирующему снижению памяти, зрительно-пространственных функций, эмоциональным и личностным изменениям. В большинстве случаев его симптомы развиваются у лиц >65 лет. Деменция при БА в настоящее время рассматривается как конечный этап длительно прогрессирующего нейродегенеративного поражения мозга; эффективные методы лечения при этом отсутствуют. Доклиническая стадия может длиться до 25 лет и характеризуется ускоренной по сравнению с возрастной нормой гибелью нейронов. Признаки БА начинают проявляться после утраты 75–85% их общего количества. Примерно у половины больных до начала деменции развивается синдром мягкого когнитивного снижения (amnesic mild cognitive impairment, aMCI) амнестического типа. В этих случаях сохраняются бытовая независимость и способность выполнять профессиональные функции, однако сам пациент и/или его близкие отмечают ухудшение когнитивного статуса, подтверждаемое при нейропсихологическом обследовании. При aMCI риск развития деменции составляет 10–15% на протяжении 1 года [1]. С учётом этих данных весьма актуален поиск путей её профилактики у таких лиц: терапия, которая позволила бы отложить развитие БА на 5-летний срок, может привести к уменьшению числа страдающих деменцией на 2,5 млн человек только в США [2]. Кроме того, большое значение имеет разработка методов прогноза когнитивных расстройств, лежащих в основе aMCI. В связи с этим широко изучается патогенез данного синдрома с акцентом на установление экзо- и эндогенных воздействий, влияющих на его прогрессирование [2].

Ранее нами и другими авторами была обнаружена связь уровней маркёров системного воспаления и активации гуморального иммунитета с тяжестью когнитивных изменений альцгеймеровского типа и риском прогрессирования aMCI [3–5]. Представляется важным исследование факторов, обуславливающих иммунологические нарушения и системный воспалительный ответ у таких больных. Существует гипотеза, что в развитии и поддержании воспалительной реакции

в латентном периоде нейродегенеративных заболеваний существенную роль могут играть инфекции, вызываемые условно-патогенными микроорганизмами, в том числе герпесвирусами [6–11]. Представители этой группы, включая вирус простого герпеса 1 типа (HSV-1, или HHV-1), герпесвирус человека 6 типа (HHV-6), вирус Эпштейна–Барр (EBV), цитомегаловирус (CMV), обладают тропизмом к нервной ткани и способны проникать в головной мозг. В отдельных работах показано, что они с повышенной частотой обнаруживаются в мозговых тканях больных БА [12, 13]. Даже латентное присутствие указанных инфекционных агентов активирует клетки микроглии (макрофаги, или иммунные клетки мозга), которые за счёт секреции провоспалительных цитокинов и других медиаторов вызывают окислительный стресс, повреждение и воспалительную реакцию [14–16]. В то же время до сих пор не проводились сравнительные исследования частоты выявления герпесвирусов и уровней вирусной нагрузки в слюне при БА различной тяжести и aMCI. Практически не изучалась и возможная взаимосвязь ГВИ с клиническим течением когнитивных расстройств альцгеймеровского типа.

Целью настоящей работы было получение новых сведений о возможной роли герпесвирусов в развитии и прогрессировании указанных нарушений когнитивного характера. В число задач исследования входило изучение маркёров ГВИ в группах больных aMCI и БА, связи данных вирусных поражений как с характером и выраженностью иммунологических изменений, так и со стадией заболевания. Для этого определяли частоту выявления ДНК герпесвирусов (EBV, CMV, герпесвирусы человека 6 и 7 типов (HHV-6, HHV-7)), уровни вирусной нагрузки, серологические маркёры ГВИ (HHV-1- и CMV-инфекций). Иммунологические исследования включали оценку содержания основных про- и противовоспалительных цитокинов, показателей гуморального и клеточного иммунитета.

## Материал и методы

В исследование вошли 100 пациентов с диагнозом aMCI (54–84 года, средний возраст  $72,6 \pm 4,6$  лет),

45 больных с БА (64–86 лет, средний возраст  $74,3 \pm 5,7$  лет; из них 17 с начальной, 12 с умеренной и 16 – с тяжёлой стадией деменции). Также обследованы 40 человек контрольной группы без когнитивных расстройств, сопоставимые по возрасту и полу с основной группой. Критериями включения были способность пациента подписать и датировать форму информированного согласия либо присутствие законного представителя пациента, уполномоченного выполнить указанные действия; возраст  $\geq 40$  лет; диагноз БА в соответствии с критериями NINCDS/ADRDA (National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association) и количество баллов по шкале минимальной оценки психического статуса (Mini-Mental State Examination, MMSE)  $\leq 26$  либо диагноз aMCI соответственно операциональным критериям MCI в сочетании с оценкой по шкале MMSE  $\geq 27$  баллов; оценка по шкале Хачински  $\leq 4$ ; оценка по гериатрической шкале депрессии  $\leq 10$ . У пациентов отсутствовали острые инфекционные заболевания, острые воспалительные процессы в полости рта и повреждения её слизистой оболочки. Участники и их родственники были предварительно ознакомлены с исследовательским протоколом и подписали форму добровольного информированного согласия. Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБНУ «Научный центр психического здоровья». Всем включённым в протокол проводились общеклиническое обследование, оценка когнитивных функций с использованием нейропсихологических шкал, забор слюны и крови.

Для определения в сыворотке крови пациентов концентраций цитокинов (интерлейкины IL-1 $\beta$ , -8, -10, фактор некроза опухоли  $\alpha$  – TNF- $\alpha$ ) (ООО «Цитокин», Россия), маркера острой фазы С-реактивного белка (ООО «Хема», Россия), циркулирующих иммунных комплексов (ООО «Хема»), общего иммуноглобулина G (IgG) (ООО «Хема»), антител (АТ) класса IgG к HHV-1 («Bender MedSystems», Австрия) и CMV («RADIM», Италия) использовали метод иммуноферментного анализа (ИФА). С целью изучения показателей клеточного иммунитета применяли методику проточной многоцветной цитометрии (моноклональные АТ для иммунофенотипирования («Becton Dickinson», США) к антигенам дифференцировки CD45, CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD56, HLA-DR).

Выявление и количественное определение ДНК лимфотропных вирусов герпетической группы – HHV-6, HHV-7, EBV, CMV – осуществляли посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Использовали комплект реагентов для экстракции нуклеиновых кислот из клинического материала «АмплиПрайм РИБО-преп» («АмплиСенс», Россия), гемолитик («АмплиСенс»), набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК EBV, CMV и HHV-6 в клиническом материале «АмплиСенс EBV/CMV/HHV6-скрин-FL» («АмплиСенс»), а также аналогичный набор

реагентов для детекции/количественного определения указанной методикой ДНК HHV-7 «АмплиСенс HHV7-скрин/монитор-FL» («АмплиСенс»). Данные комплекты реагентов разработаны в ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора по ТУ 9398-095-01897593-2012 и имеют регистрационное удостоверение (РУ) на медицинское изделие от 18.10.2019 № ФСР 2010/09502.

В ходе эксперимента выполнялись два этапа: амплификация участков вирусной ДНК и гибридационно-флуоресцентная детекция, производившаяся непосредственно в ходе ПЦР. С полученными ДНК-пробами проводилась реакция амплификации фрагмента нуклеиновой кислоты возбудителя при помощи специфичных к данному участку её молекулы праймеров и фермента *Taq*-полимеразы. В составе реакционной смеси присутствовали флуоресцентно-меченные олигонуклеотидные зонды, которые гибридизовались с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего интенсивность флуоресценции нарастала. При экстракции ДНК из содержащего клетки клинического материала происходила амплификация участка генома человека (фрагмент  $\beta$ -глобинового гена (ВКО Glob) – эндогенный внутренний контрольный образец), что позволило контролировать этапы ПЦР-исследования (экстракцию ДНК и проведение ПЦР) с оценкой адекватности взятия материала и его хранения. Полученные данные (кривые накопления флуоресцентного сигнала) анализировались с помощью программного обеспечения используемого прибора Rotor-Gene Q («Qiagen», Германия). Результат амплификации по каналу считался положительным, если кривая флуоресценции имела типичный для ПЦР в режиме реального времени S-образный вид и однократно пересекалась с пороговой линией в области достоверного прироста флуоресценции. На основании известных значений содержания ДНК в стандартных образцах (калибраторах) программным обеспечением прибора выполнялся автоматический расчёт концентрации ДНК вирусов в исследуемых пробах на единицу объёма и/или на заданное количество клеток.

В соответствии с методическими рекомендациями производителя к используемым наборам реагентов расчёт концентрации ДНК на 1 мл образца слюны (КПДНК) осуществлялся по формуле:

$$\text{КПДНК} = \text{КДНК} \times 100 \text{ (копий/мл)}, \quad (1)$$

где КДНК – количество копий нуклеиновой кислоты вируса в пробе ДНК.

Образцы слюны пациентов забирались согласно методическим рекомендациям «Взятие, транспортировка, хранение клинического материала для ПЦР-диагностики», разработанным в ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора. Перед получением биоматериала проводили 3-кратное полоскание полости рта физиологическим раствором. Слюну забирали в количестве не менее 1,0 мл в одноразовые

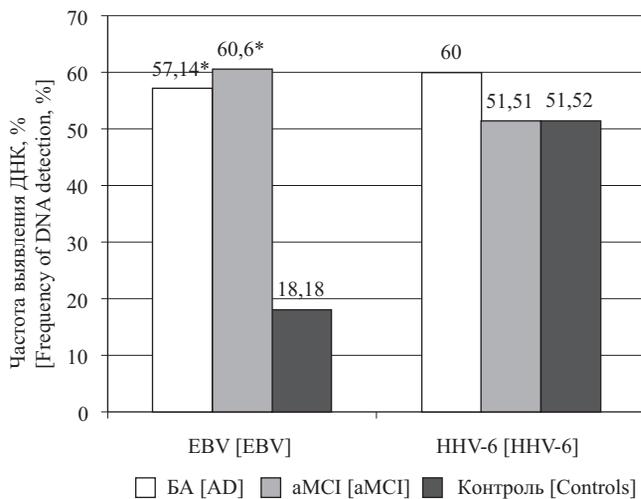
стерильные пластиковые пробирки, которые плотно закрывали крышкой.

Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных пакетов прикладных программ Excel (Microsoft 2010) и STATISTICA 10 (StatSoft 2010). Размер выборки определяли на основании статистической мощности, достаточной для получения достоверных межгрупповых различий. Средние значения количественных показателей по группам представляли как  $M \pm 95\%$  доверительный интервал. Проверку распределения на нормальность осуществляли с помощью критерия Шапиро–Уилкса. В случаях, когда распределение достоверно отличалось от нормального, выполняли логарифмическую трансформацию данных. Достоверность различий количественных показателей между группами определяли посредством Т-критерия Стьюдента; корреляции оценивали при помощи коэффициента ранговой корреляции Спирмена ( $r_s$ ). Различия считали статистически достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты

### Частота выявления герпесвирусов у пациентов с когнитивными расстройствами альцгеймеровского типа

В результате количественного определения генетического материала герпесвирусов в слюне пациентов обнаружено, что частота обнаружения и уровни ДНК EBV у пациентов с аМСИ и с БА в стадии деменции достоверно превышают эти показатели для контрольной группы (рис. 1, 2). Так, средний уровень ДНК



**Рис. 1.** Частота выявления ДНК вируса Эпштейна–Барр и герпесвируса человека 6 типа в слюне при болезни Альцгеймера (БА) ( $n = 45$ ), мягком когнитивном снижении амнестического типа (aMCI) ( $n = 100$ ) и в контрольной группе ( $n = 40$ ).

**Примечание.** \* – достоверные различия по сравнению с контролем.

**Fig. 1.** The frequency of detection of Epstein–Barr virus and of human herpesvirus type 6 in the saliva of the patients with Alzheimer's disease ( $n = 45$ ), amnesic mild cognitive impairment (aMCI) ( $n = 100$ ) and in the control group ( $n = 40$ ).

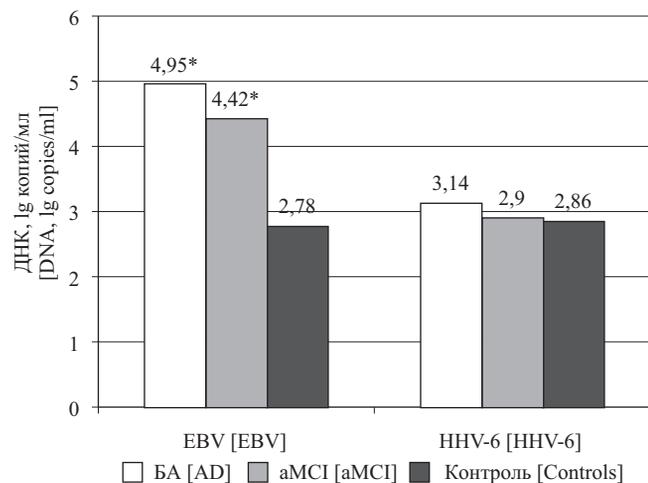
**Note.** \* – significant differences with the control group.

EBV при когнитивных расстройствах альцгеймеровского типа был выше по сравнению с группой контроля более чем на порядок. В то же время межгрупповая частота выявления в слюне нуклеиновых кислот других герпесвирусов (HHV-6, HHV-7 и CMV) достоверно не различалась; не выявлено отличий и по среднему значению содержания ДНК этих инфекционных агентов в слюне (рис. 2).

### Взаимосвязь между EBV-инфекцией с высокой вирусной нагрузкой и иммунологическими показателями при мягком когнитивном снижении амнестического типа

В ходе предыдущих исследований нами обнаружена иммунологическая неоднородность синдрома аМСИ и охарактеризованы его иммунологические варианты (таблица). Выявлено неблагоприятное прогностическое значение роста содержания медиаторов системного воспаления с сопутствующим снижением общего IgG [17]. С учётом этих данных, а также повышенной частоты обнаружения EBV при аМСИ, проанализирована связь между EBV-инфекцией с высокой вирусной нагрузкой и иммунологическими расстройствами у пациентов. В качестве критерия использовался (принимая во внимание предыдущие данные авторов) уровень ДНК вируса  $>10\,000$  копий/мл в слюне и/или  $>500$  копий/ $10^6$  клеток в крови [18].

Результаты показали, что связь EBV-инфекции с параметрами иммунитета была различной в зависимости от иммунологического варианта рассматриваемого



**Рис. 2.** Средняя концентрация ДНК вируса Эпштейна–Барр и герпесвируса человека 6 типа при болезни Альцгеймера (БА), мягком когнитивном снижении амнестического типа (aMCI) и среди добровольцев контрольной группы с обнаруженной в слюне ДНК соответствующих вирусов.

**Примечание.** \* – достоверные различия по сравнению с контролем.

**Fig. 2.** The mean concentration of the DNA of Epstein–Barr virus and of human herpesvirus type 6 in the saliva of the patients with Alzheimer's disease, amnesic mild cognitive impairment (aMCI) and of the volunteers of the control group that had the DNA of these viruses in the saliva.

**Note.** \* – significant differences with the control group.

**Показатели иммунного статуса в зависимости от наличия системного воспаления и уровня IgG у больных аМСИ**  
**The immunity parameters depending on the presence of systemic inflammation and on IgG levels in the patients with aMCI**

Показатель Parameter	Наличие признаков системного воспаления Systemic inflammation		Отсутствие признаков системного воспаления No systemic inflammation		Контроль Controls
	IgG >10 г/л IgG >10 g/l	IgG <10 г/л IgG <10 g/l	IgG >10 г/л IgG >10 g/l	IgG <10 г/л IgG <10 g/l	
IgG, г/л IgG, g/l	14,2 ± 0,9	9,0 ± 0,3*	13,1 ± 0,9	9,1 ± 0,5*	12,1 ± 1,4
ЦИК, у.е. CIC, units	116,8 ± 17,7*	115,2 ± 24,9	87,3 ± 16,3	67,6 ± 11,6	79,3 ± 16,5
CD45+CD3+CD4+, %	49,7 ± 2,3*	42,6 ± 2,5	49,2 ± 5,5	35,3 ± 5,9	42,3 ± 2,6
CD45+CD3+CD8+, %	24,2 ± 2,5	22,6 ± 2,8	24,9 ± 4,5	27,4 ± 3,5	26,5 ± 2,4
CD3+CD4+CD25+, %	2,3 ± 0,3	1,8 ± 0,3	2,5 ± 0,1*	1,4 ± 0,3	1,8 ± 0,3
CD3–CD16+CD56+, %	15,1 ± 2,8	13,9 ± 3,7	14,7 ± 7,8	16,4 ± 5,6	13,6 ± 1,6
CD3+CD16+CD56+ TNK, %	10,7 ± 2,8*	11,0 ± 3,3*	5,8 ± 1,6	7,0 ± 2,3	4,8 ± 1,0
HLA-DR+CD3–, %	13,4 ± 1,7	11,2 ± 1,3	9,7 ± 0,9*	17,3 ± 1,4*	12,2 ± 1,3
HLA-DR+CD3+, %	3,42 ± 0,7	5,5 ± 1,6	2,7 ± 0,4	4,8 ± 2,1	2,8 ± 0,6
CD19+, %	10,21 ± 1,7	7,9 ± 0,9	8,2 ± 1,0	11,5 ± 1,5*	7,9 ± 0,8
IL-10, пг/мл IL-10, pg/ml	6,3 ± 2,1	19,4 ± 6,7*	6,6 ± 3,2	21,1 ± 16,3	5,8 ± 0,7
IL-1β, пг/мл IL-1β, pg/ml	13,8 ± 4,9*	14,0 ± 2,7*	5,2 ± 4,5*	17,6 ± 7,7*	3,4 ± 1,2
TNF-α, пг/мл TNF-α, pg/ml	2,2 ± 0,5*	3,1 ± 1,0*	3,4 ± 2,0	2,1 ± 1,3	1,3 ± 0,3
C-реактивный белок, мг/л C-reactive protein, mg/l	15,2 ± 5,5*	9,8 ± 3,4*	1,6 ± 0,5	1,6 ± 0,4	1,7 ± 0,1

**Примечание.** \* – достоверные ( $p < 0,05$ ) различия с контрольной группой.

**Note.** \* – significant ( $p < 0.05$ ) differences with the control group.

синдрома. В частности, у больных аМСИ с системным воспалением (повышение содержания С-реактивного белка >5 мг/л в сочетании с увеличением концентрации  $\geq 2$  провоспалительных цитокинов: IL-1β, IL-8, TNF-α) и уровнем общего IgG >10 г/л (29 больных из 100) активная EBV-инфекция (8 человек из 29) ассоциировалась со сниженным количеством CD3–CD16+CD56+ NK-клеток ( $8,27 \pm 1,96\%$ , в контрольной группе –  $17,9 \pm 5,62\%$ ;  $p < 0,05$ ). В то же время среди этих пациентов имела место тенденция к росту уровня CD3+CD8+ Т-клеток (Т-цитотоксические лимфоциты) до  $28,07 \pm 2,24\%$  (при отсутствии активной инфекции указанным агентом –  $22,17 \pm 1,7\%$ , контроль –  $26,5 \pm 2,4\%$ ), а также повышалось по сравнению с контролем количество CD3+CD16+CD56+ TNK-клеток ( $p < 0,05$ ) (рис. 3). Выявленные изменения могли быть связаны с ответом на инфицирование вирусом, при этом отмечалось преобладание активации приобретённых механизмов противовирусного ответа с некоторыми признаками снижения активации врождённых путей. Эти проявления возможного дисбаланса противовирусного ответа требуют дальнейшего изучения.

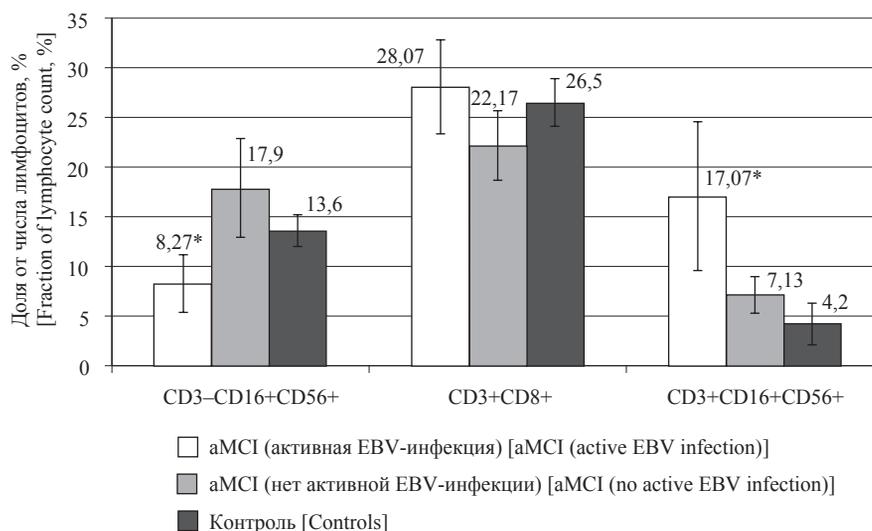
В подгруппе пациентов с аМСИ, имевших признаки системного воспалительного ответа и показатель IgG <10 г/л (37 участников из 100), активная EBV-инфекция (14 больных из 37) была ассоциирована со снижением содержания CD3+CD8+ Т-цитотоксических клеток до  $16,07 \pm 2,47\%$  (норма  $26,5 \pm 2,4\%$ ;  $p < 0,05$ ) при повышенном уровне NK-клеток и нормальном – TNK-клеток (рис. 4). Это означает, что у данной категории преобладало действие врождённых механизмов противовирус-

ного иммунитета без выраженных признаков активации адаптивных путей противовирусной защиты.

Таким образом, среди страдающих аМСИ (66 из 100) с признаками системного воспаления EBV-инфекция с высокой вирусной нагрузкой сопровождалась дисбалансом активации клеточных иммунных реакций. Не исключено, что инфицирование этим возбудителем может служить одним из факторов, поддерживающих прогностически неблагоприятные иммунологические нарушения у больных.

У пациентов с аМСИ без выраженных признаков системного воспаления (34 больных из 100) активная EBV-инфекция (15 больных из 34) ассоциировалась с повышением уровня одного из важнейших провоспалительных цитокинов – TNF-α выше контрольных значений, при этом связи с концентрацией других изучавшихся цитокинов и выраженностью показателей иммунитета не выявлено (рис. 5). Отсутствие комплекса проявлений системного воспалительного ответа в данной подгруппе независимо от уровня герпесвирусной нагрузки в слюне требует изучения возможных генетических факторов, хронических бактериальных инфекций и иных причин, способных влиять на выраженность реакций системного воспаления.

В целом с учётом иммуносупрессорных свойств EBV и его способности активировать транскрипционный фактор NF-κB, индуцируя системную воспалительную реакцию, результаты указывают на возможную связь EBV-инфекции с развитием иммунологических нарушений у больных с аМСИ.

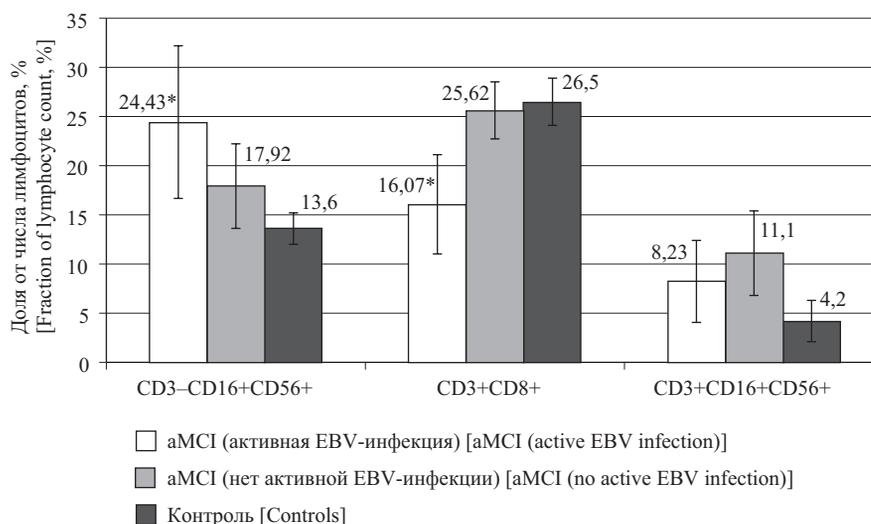


**Рис. 3.** Содержание CD3-CD16+CD56+ НК-клеток, CD3+CD16+CD56+ TNK-клеток и CD3+CD8+ цитотоксических Т-клеток в зависимости от наличия EBV-инфекции с высокой вирусной нагрузкой у пациентов с аМЦИ, имевших признаки системного воспаления и уровень IgG >10,0 г/л.

**Примечание.** \* – достоверные различия по сравнению с контролем.

**Fig. 3.** The levels of CD3-CD16+CD56+ NK-cells, CD3+CD16+CD56+ TNK-cells and CD3+CD8+ cytotoxic T-cells depending on the presence of the EBV infection with high viral load in the patients with aMCI that had systemic inflammation and IgG levels >10.0 g/l.

**Note.** \* – significant differences with the control group.



**Рис. 4.** Содержание CD3-CD16+CD56+ НК-клеток, CD3+CD16+CD56+ TNK-клеток и CD3+CD8+ цитотоксических Т-клеток в зависимости от наличия EBV-инфекции с высокой вирусной нагрузкой у пациентов с аМЦИ, имевших признаки системного воспаления и уровень IgG <10,0 г/л.

**Примечание.** \* – достоверные различия по сравнению с контролем.

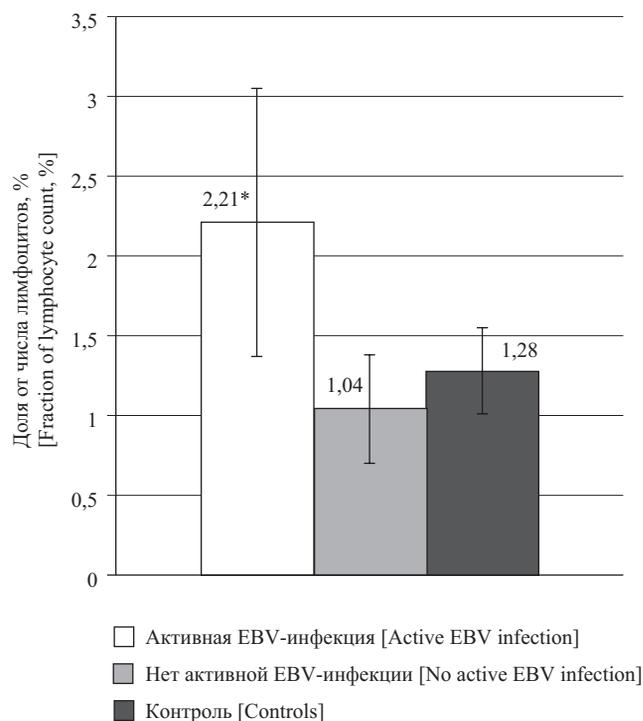
**Fig. 4.** The levels of CD3-CD16+CD56+ NK-cells, CD3+CD16+CD56+ TNK-cells and CD3+CD8+ cytotoxic T-cells depending on the presence of the EBV infection with high viral load in the patients with aMCI that had systemic inflammation and IgG levels <10.0 g/l.

**Note.** \* – significant differences with the control group.

**Серологические маркеры вирусных инфекций при различных стадиях когнитивных расстройств альцгеймеровского типа**

В ходе исследования уровня серологических маркеров вирусных инфекций при аМЦИ и БА выявлено, что уровень IgG к CMV был значимо выше у больных

БА на стадии мягкой деменции, чем в контрольной группе. При умеренной её выраженности отмечалась лишь тенденция к росту этого показателя, не достигавшая достоверности. В случаях же тяжёлой деменции значимых изменений содержания анти-CMV IgG не было (**рис. 6**). С учётом литературных данных



**Рис. 5.** Уровень фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) у пациентов с аМЦИ, не имевших комплекса признаков системного воспаления.

**Примечание.** \* – достоверные различия между группами.

**Fig. 5.** The levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) in the patients with aMCI without the signs of systemic inflammation depending on the presence of the EBV infection with high viral load.

**Note.** \* – significant differences between the groups.

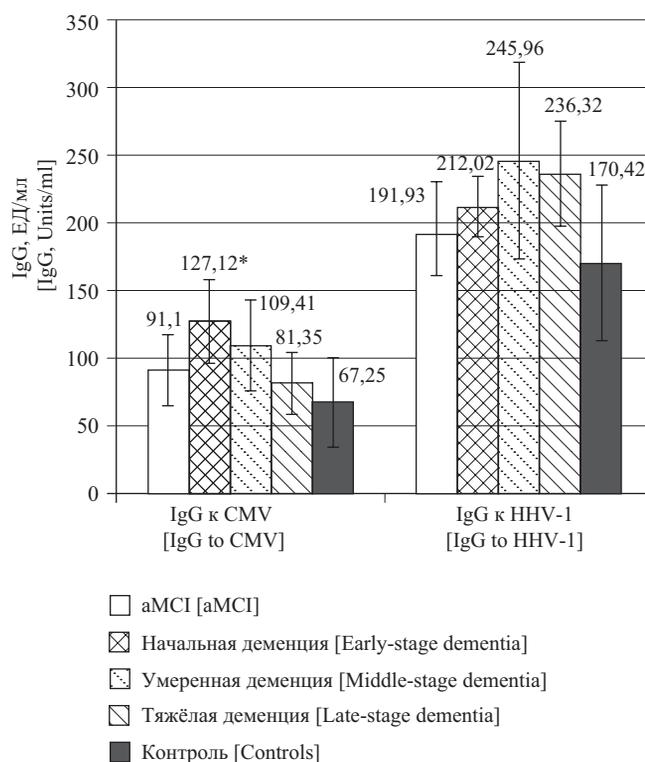
о неблагоприятном влиянии CMV на процессы старения и нейродегенерацию полученные результаты могут указывать на особую роль CMV-инфекции на этапе перехода от мягкого когнитивного снижения к собственно дементному состоянию.

В то же время значимого изменения уровня антител IgG к HSV при аМЦИ и БА не обнаружено, несмотря на то что имела место тенденция к увеличению данного показателя при БА на всех стадиях деменции.

Таким образом, в данном исследовании установлены повышенная частота обнаружения EBV в слюне и более высокий уровень ДНК этого вируса в слюне при когнитивных нарушениях альцгеймеровского типа по сравнению с контрольной группой. Выявлена связь между наличием активной EBV-инфекции и изменениями иммунологических показателей у имеющих аМЦИ. Кроме того, обнаружено, что уровень IgG к CMV связан со стадией когнитивных расстройств альцгеймеровского типа.

### Обсуждение

Полученные результаты указывают на возможную роль ГВИ, вызываемых EBV и CMV, в развитии иммунологических изменений при мягком когнитивном снижении и в прогрессировании когнитивных расстройств альцгеймеровского типа.



**Рис. 6.** Уровень IgG к цитомегаловирусу (CMV) и к вирусу простого герпеса 1 типа (HHV-1) у пациентов с аМЦИ и болезнью Альцгеймера на различных стадиях деменции.

**Примечание.** \* – достоверные различия по сравнению с контролем.

**Fig. 6.** The levels of immunoglobulin G to cytomegalovirus (CMV) and to herpes simplex virus type 1 (HHV-1) in the patients with aMCI and with Alzheimer's disease of different stages of dementia.

**Note.** \* – significant differences with the control group.

В порядке оценки значимости выявленных различий частоты обнаружения ДНК EBV у больных БА по сравнению с таковой в группе контроля необходимо отметить, что несмотря на практически 100%-ную инфицированность EBV среди взрослых, количество выделяемой со слюной нуклеиновой кислоты вируса может быть недостаточным для детекции набором «АмплиСенс EBV/CMV/HHV6-скрин-FL», аналитическая чувствительность которого при исследовании этих биологических образцов составляет 400 копий ДНК/мл. Таким образом, различия в частоте выявления ДНК данного патогена в слюне могли быть обусловлены наличием её уровней, не достигающих минимального порога определения у части обследованных.

Влияние вирусных инфекций на развитие когнитивных расстройств альцгеймеровского типа изучается достаточно давно, однако большая часть имеющихся данных относится к вирусу простого герпеса 1 типа (HHV-1). Доказательства связи вызванной им инфекции с БА исследуются на протяжении примерно 30 лет. Отмечено, что при герпесвирусном энцефалите, вызываемом HHV-1, поражаются те же области мозга, что и при БА [19]. Позже установлено, что

при большой длительности инфекции возбудитель способен проходить через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и с вероятностью более 50% выявляется при аутопсийном исследовании мозга лиц >45 лет [20]. При этом инфекционный агент обнаруживается главным образом в височных и лобных долях (наиболее поражаемых при БА) [21]; именно эти области вовлекаются в процесс и при остром герпесвирусном энцефалите. Кроме того, АТ к HHV-1 находят в ликворе большинства пожилых людей – как здоровых, так и страдающих БА. В тканях же мозга более молодых лиц и детей вирус и АТ к нему, как правило, не выявляются. Вероятно, возможность проникновения HHV-1 через ГЭБ определяется эффективностью иммунного ответа индивидуума [20]. С использованием ПЦР *in situ* и ИФА с окраской на  $\beta$ -амилоид показано, что 90% амилоидных бляшек у больных БА и 80% у здоровых содержат ДНК HHV-1. При этом в группе больных БА в бляшках локализуется 72% всей обнаруживаемой в мозге нуклеиновой кислоты вируса, а среди здоровых того же возраста – 24% [22]. Подобные данные свидетельствуют о вероятном участии HHV-1 в образовании амилоидных бляшек и нейрональном повреждении при рассматриваемой нозологической форме.

В экспериментах отмечена связь активности инфекции HHV-1 и риска развития БА. Так, у лиц с аМСИ зарегистрировано повышение уровня авидности АТ IgG к этому возбудителю по сравнению со здоровыми добровольцами и страдающими БА. Наличие указанного феномена у инфицированных служит маркером реактивации HHV-1-инфекции. Таким образом, описанный механизм может выступать патогенетическим фактором на ранних этапах развития заболевания [23]. По данным других авторов, наблюдавших в течение 12 лет за 512 пожилыми добровольцами с нормальными на момент начала исследования когнитивными функциями, среди заболевших БА (77 человек) чаще отмечалась серопозитивность по АТ IgM к HHV-1 (отношение шансов, ОШ = 2,55), что может указывать на патогенетическую роль как первичной HHV-1-инфекции, так и возможной её реактивации [7].

Работ, изучающих значение других герпесвирусов в качестве факторов риска при БА, значительно меньше, чем для HHV-1. Однако относительно EBV, CMV и HHV-6 получены некоторые сведения, которые могут свидетельствовать о такой роли. Показано, что ДНК HHV-6 достоверно чаще обнаруживается в мозге имевших БА, чем у здоровых. Более чем в половине случаев в мозговых тканях больных удаётся выявить как HHV-6, так и HHV-1. Однако данных о взаимосвязи между наличием аллеля *ApoEε4* (наиболее значимый генетический фактор риска спорадической БА) и частотой обнаружения в мозге больных генетического материала HHV-6 к настоящему времени нет. В одной из работ АТ к этому вирусу были детектированы в спинномозговой жидкости у 22% имеющих БА, но не выявлялись в контрольной группе [20]. Большой интерес представляют результаты, согласно

которым при БА повышена вероятность обнаружения ДНК EBV и HHV-6 в ядрах лейкоцитов крови [6]. Кроме того, в когортном исследовании, продолжавшемся 5 лет и включавшем 164 пожилых добровольцев с изначально нормальными когнитивными функциями, вероятность нахождения нуклеиновой кислоты EBV и/или HHV-6 в лейкоцитарных ядрах при начале исследования была значимо выше среди участников, у которых на протяжении 5-летнего периода развилась БА. С повышенным риском заболевания в этой работе ассоциировалась и серопозитивность в отношении IgG, специфичных к EBV либо к HHV-6 [6].

Существуют определённые свидетельства возможного значения CMV в патогенезе БА. Так, повышение уровня в плазме крови неоптерина (продукта катаболизма гуанозинтрифосфата), синтезирующегося макрофагами в качестве антимикробного агента, является неспецифическим маркером активной вирусной инфекции. В нескольких исследованиях показано, что неоптерин может служить индикатором острой CMV-инфекции. У больных с БА содержание этого вещества коррелирует с уровнем АТ IgM к CMV и степенью когнитивного снижения, что косвенно свидетельствует о роли последнего в прогрессировании БА [8]. Имеются также сведения, что при БА выявляется ассоциация между обнаружением АТ IgG к CMV и IgG к HHV-1. Надо отметить, что среди CMV-позитивных лиц с рассматриваемой патологией вероятность выявления анти-HHV-1 IgG повышена в отличие от контрольной группы [24]. Эти данные указывают на то, что в патогенезе БА может играть роль ассоциация герпесвирусов CMV и HHV-1. Следует подчеркнуть, что в обсуждаемой работе [24] различий между группами исследования и контроля по уровню АТ к CMV обнаружено не было, что не соответствует полученным нами результатам. Противоречие может быть обусловлено тем обстоятельством, что авторами не проводилось разделение участников в зависимости от стадии деменции [24]. Так, по нашим данным, несмотря на повышение при начальных её проявлениях, у больных с тяжёлой деменцией наблюдалась тенденция к снижению уровня IgG к CMV, что могло быть связано с более низким общим уровнем продукции IgG у данной категории пациентов [3]. Отсутствие же согласно итогам нашей работы различий по уровню IgG к HHV-1 на разных стадиях когнитивных расстройств не противоречит литературным данным, в соответствии с которыми развитие БА сопровождается ростом содержания IgM к этому возбудителю. Указанный факт подтверждает значение острой HHV-1-инфекции либо её обострений в патогенезе болезни [7].

### Заключение

Анализ данных литературы свидетельствует о наличии доказательств связи инфицирования ЦНС HHV-1 с прогрессированием БА и негативного влияния активной HHV-1-инфекции на вероятность её развития. Значительно меньше изучена связь EBV, CMV, HHV-6 и HHV-7 с риском этого заболевания. Кроме того,

крайне недостаточно изучено по литературным данным влияние ГВИ на показатели системного иммунитета при когнитивных расстройствах альцгеймеровского типа, хотя известно об иммунотропных эффектах герпесвирусов, а также об изменениях иммунологических параметров на фоне аМСИ и БА.

Нами впервые получены данные о повышенной частоте выявления EBV в слюне и более высоких уровнях ДНК этого возбудителя в слюне при аМСИ и БА, а также о связи EBV-инфекции с выраженностью и характером расстройств системы иммунитета при различных (в том числе ассоциированных с повышенным риском прогрессирования когнитивных нарушений) иммунологических вариантах синдрома аМСИ. Выявлено повышение концентрации IgG к CMV при БА в стадии мягкой деменции. Результаты указывают на возможную роль ГВИ, вызываемых EBV и CMV, в развитии иммунологических изменений при мягком когнитивном снижении и прогрессировании когнитивных расстройств альцгеймеровского типа. Полученные данные могут быть важны для разработки методов прогнозирования течения БА, в том числе на её додементной стадии, и подходов к индивидуализированному лечению и профилактике.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Manly J.J., Tang M., Schupf N., Stern Y., Vonsattel J.G., Mayeux R. Frequency and course of mild cognitive impairment in a multiethnic community. *Ann. Neurol.* 2008; 63(4): 494–506. <https://doi.org/10.1002/ana.21326>.
- Alzheimer's Disease International. *World Alzheimer Report 2018. The State of the Art of Dementia Research: New Frontiers*. London: Alzheimer's Disease International (ADI); 2018. Available at: <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2018.pdf> (accessed March 22, 2021).
- Малашенкова И.К., Крынский С.А., Хайлов Н.А., Огурцов Д.П., Пономарёва Е.В., Гаврилова С.И., и др. Адаптивный иммунитет, системное воспаление и уровень основных цитокинов у пациентов с болезнью Альцгеймера различных стадий и мягким когнитивным снижением амнестического типа. *Аллергология и иммунология*. 2018; 19(4): 206–14.
- Малашенкова И.К., Крынский С.А., Хайлов Н.А., Огурцов Д.П., Селезнева Н.Д., Фёдорова Я.Б., и др. Противовоспалительные эффекты нейротрофической терапии (применение церебролизина при мягком когнитивном снижении). *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2018; 118(5): 39–44. <https://doi.org/10.17116/jnevro20181185139>.
- Симонов А.Н., Клоушник Т.П., Андросова Л.В., Михайлова Н.М. Использование кластерного анализа и логистической регрессии для оценки риска болезни Альцгеймера у пациентов с синдромом мягкого когнитивного снижения амнестического типа. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2018; 118(12): 40–3. <https://doi.org/10.17116/jnevro201811812140>.
- Carbone I., Lazzarotto T., Ianni M., Porcellini E., Forti P., Masliah E., et al. Herpes virus in Alzheimer's disease: relation to progression of the disease. *Neurobiol. Aging*. 2014; 35(1): 122–9. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.06.024>.
- Letenneur L., Pérès K., Fleury H., Garrigue I., Barberger-Gateau P., Helmer C., et al. Seropositivity to herpes simplex virus antibodies and risk of Alzheimer's disease: a population-based cohort study. *PLoS One*. 2008; 3(11): e3637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003637>.
- Blasko I., Knaus G., Weiss E., Kemmler G., Winkler C., Falkensammer G., et al. Cognitive deterioration in Alzheimer's disease is accompanied by increase of plasma neopterin. *J. Psychiatr. Res.* 2007; 41(8): 694–701. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2006.02.001>.
- Stein P.S., Steffen M.J., Smith C., Jicha G., Ebersole J.L., Dolph D. Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement.* 2012; 8(3): 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.04.006>.
- Kamer A.R., Craiga R.G., Pirraglia E., Dasanayake A.P., Norman R.G., Boylan R.J., et al. TNF- $\alpha$  and antibodies to periodontal bacteria discriminate between Alzheimer's disease patients and normal subjects. *J. Neuroimmunol.* 2009; 216(1–2): 92–7. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.08.013>.
- Didkovskii N.A., Malashenkova I.K., Tanasova A.N., Zuikov I.A., Zuikova I.N., Khitrik N.M., et al. Pathogenetic aspects of severe course of herpetic infection. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2007; 2(76): 76–81. <https://doi.org/10.1007/s10517-007-0349-7>.
- Hemling N., Røytta M., Rinne J., Pöllänen P., Broberg E., Tapio V., et al. Herpesviruses in brains in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ann. Neurol.* 2003; 54(2): 267–71. <https://doi.org/10.1002/ana.10662>.
- Lin W.R., Wozniak M.A., Cooper R.J., Wilcock G.K., Itzhaki R.F. Herpesviruses in brain and Alzheimer's disease. *J. Pathol.* 2002; 197(3): 395–402. <https://doi.org/10.1002/path.1127>.
- Zilka N., Kazmerova Z., Jadhav S., Neradil P., Madari A., Obetkova D., et al. Who fans the flames of Alzheimer's disease brains? Misfolded tau on the crossroad of neurodegenerative and inflammatory pathways. *J. Neuroinflammation*. 2012; 9: 47. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-47>.
- Kuhla A., Ludwig S.C., Kuhla B., Münch G., Vollmar B. Advanced glycation end products are mitogenic signals and trigger cell cycle reentry of neurons in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Aging*. 2015; 36(2): 753–61. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.025>.
- Doens D., Fernández P.L. Microglia receptors and their implications in the response to amyloid  $\beta$  for Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Neuroinflammation*. 2014; 11: 48. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-48>.
- Крынский С.А., Малашенкова И.К., Хайлов Н.А., Огурцов Д.П., Чекулаева Е.И., Пономарёва Е.В., и др. Иммунологические маркеры долгосрочных эффектов терапии у пациентов с синдромом мягкого когнитивного снижения. *Медицинский академический журнал*. 2019; 19(S1): 84–6.
- Дидковский Н.А., Огурцов Д.П., Крынский С.А., Гурская О.Г., Шипулина О.Ю., Домонова Э.А., и др. Миалгический энцефаломиелит/синдром хронической усталости: уровень репликации лимфотропных герпетических вирусов и иммунная защита. *Поликлиника*. 2016; (5): 46–50.
- Denaro F.J., Staub P., Colmer J., Freed D.M. Coexistence of Alzheimer disease neuropathology with herpes simplex encephalitis. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-Grand)*. 2003; 49(8): 1233–40.
- Wozniak M.A., Shipley S.J., Combrinck M., Wilcock G.K., Itzhaki R.F. Productive herpes simplex virus in brain of elderly normal subjects and Alzheimer's disease patients. *J. Med. Virol.* 2005; 75(2): 300–6. <https://doi.org/10.1002/jmv.20271>.
- Jamieson G.A., Maitland N.J., Wilcock G.K., Yates C.M., Itzhaki R.F. Herpes simplex virus type 1 DNA is present in specific regions of brain from aged people with and without senile dementia of the Alzheimer type. *J. Pathol.* 1992; 167(4): 365–8. <https://doi.org/10.1002/path.1711670403>.
- Honjo K., van Reekum R., Verhoeff N. Alzheimer's disease and infection: Do infectious agents contribute to progression of Alzheimer's disease? *Alzheimer's Dement.* 2009; 5(4): 348–60. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2008.12.001>.
- Kobayashi N., Nagata T., Shinagawa S., Oka N., Shimada K., Shimizu A., et al. Increase in the IgG avidity index due to herpes simplex virus type 1 reactivation and its relationship with cognitive function in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013; 430(3): 907–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.054>.
- Lövheim H., Olsson J., Weidung B., Johansson A., Eriksson S., Hallmans G., et al. Interaction between cytomegalovirus and herpes simplex virus type 1 associated with the risk of Alzheimer's disease development. *J. Alzheimers Dis.* 2018; 61(3): 939–45. <https://doi.org/10.3233/JAD-161305>.

#### REFERENCES

- Manly J.J., Tang M., Schupf N., Stern Y., Vonsattel J.G., Mayeux R. Frequency and course of mild cognitive impairment in a multiethnic community. *Ann. Neurol.* 2008; 63(4): 494–506. <https://doi.org/10.1002/ana.21326>.

2. Alzheimer's Disease International. *World Alzheimer Report 2018. The State of the Art of Dementia Research: New Frontiers*. London: Alzheimer's Disease International (ADI); 2018. Available at: <https://www.alz.co.uk/research/WorldAlzheimerReport2018.pdf> (accessed March 22, 2021).
3. Malashenkova I.K., Krynskiy S.A., Khaylov N.A., Ogurtsov D.P., Ponomareva E.V., Gavrilova S.I., et al. Adaptive immunity, systemic inflammation and cytokine levels in patients with Alzheimer's disease of different severity and with amnesic mild cognitive impairment [Adaptivnyy immunitet, sistemnoe vospalenie i uroven' osnovnykh tsitokinov u patsientov s boleznyu Altsgeimera razlichnykh stadiy i myagkim kognitivnym snizheniem amnesticheskogo tipa]. *Allergologiya i immunologiya*. 2018; 19(4): 206–14 (in Russian).
4. Malashenkova I.K., Krynskiy S.A., Hailov N.A., Ogurtsov D.P., Selezneva N.D., Fedorova Y.B., et al. Anti-inflammatory effects of neurotrophic therapy (a pilot study) [Protivovospalitel'nye efekty neurotroficheskoy terapii (primeneniye tserebrovizina pri myagkom kognitivnom snizhenii)]. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2018; 118(5): 39–44. <https://doi.org/10.17116/jnevro20181185139> (in Russian).
5. Simonov A.N., Klyushnik T.P., Androsova L.V., Mikhaylova N.M. The use of cluster analysis and logistic regression for assessing the risk of Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment, amnesic type [Isopol'zovanie klasteronogo analiza i logisticheskoy regressii dlya otsenki riska bolezni Altsgeimera u patsientov s sindromom myagkogo kognitivnogo snizheniya amnesticheskogo tipa]. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2018; 118(12): 40–3. <https://doi.org/10.17116/jnevro201811812140> (in Russian).
6. Carbone I., Lazzarotto T., Ianni M., Porcellini E., Forti P., Masliah E., et al. Herpes virus in Alzheimer's disease: relation to progression of the disease. *Neurobiol. Aging*. 2014; 35(1): 122–9. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.06.024>.
7. Letenneur L., Pérès K., Fleury H., Garrigue L., Barberger-Gateau P., Helmer C., et al. Seropositivity to herpes simplex virus antibodies and risk of Alzheimer's disease: a population-based cohort study. *PLoS One*. 2008; 3(11): e3637. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003637>.
8. Blasko I., Knaus G., Weiss E., Kemmler G., Winkler C., Falkensammer G., et al. Cognitive deterioration in Alzheimer's disease is accompanied by increase of plasma neopterin. *J. Psychiatr. Res*. 2007; 41(8): 694–701. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2006.02.001>.
9. Stein P.S., Steffen M.J., Smith C., Jicha G., Ebersole J.L., Dolph D. Serum antibodies to periodontal pathogens are a risk factor for Alzheimer's disease. *Alzheimer's Dement*. 2012; 8(3): 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.04.006>.
10. Kamer A.R., Craig R.G., Pirraglia E., Dasanayake A.P., Norman R.G., Boylan R.J., et al. TNF- $\alpha$  and antibodies to periodontal bacteria discriminate between Alzheimer's disease patients and normal subjects. *J. Neuroimmunol*. 2009; 216(1–2): 92–7. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.08.013>.
11. Didkovskii N.A., Malashenkova I.K., Tanasova A.N., Zuikov I.A., Zuikova I.N., Khitrik N.M., et al. Pathogenetic aspects of severe course of herpetic infection. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2007; 2(76): 76–81. <https://doi.org/10.1007/s10517-007-0349-7>.
12. Hemling N., Røytta M., Rinne J., Pöllänen P., Broberg E., Tapio V., et al. Herpesviruses in brains in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ann. Neurol*. 2003; 54(2): 267–71. <https://doi.org/10.1002/ana.10662>.
13. Lin W.R., Wozniak M.A., Cooper R.J., Wilcock G.K., Itzhaki R.F. Herpesviruses in brain and Alzheimer's disease. *J. Pathol*. 2002; 197(3): 395–402. <https://doi.org/10.1002/path.1127>.
14. Zilka N., Kazmerova Z., Jadhav S., Neradil P., Madari A., Obetkova D., et al. Who fans the flames of Alzheimer's disease brains? Misfolded tau on the crossroad of neurodegenerative and inflammatory pathways. *J. Neuroinflammation*. 2012; 9: 47. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-47>.
15. Kuhla A., Ludwig S.C., Kuhla B., Münch G., Vollmar B. Advanced glycation end products are mitogenic signals and trigger cell cycle re-entry of neurons in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Aging*. 2015; 36(2): 753–61. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.025>.
16. Doens D., Fernández P.L. Microglia receptors and their implications in the response to amyloid  $\beta$  for Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Neuroinflammation*. 2014; 11: 48. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-48>.
17. Krynskiy S.A., Malashenkova I.K., Khaylov N.A., Ogurtsov D.P., Chekulaeva E.I., Ponomareva E.V., et al. Immunological markers of long-term effects of treatment in patients with mild cognitive impairment [Immunologicheskie markery dolgosrochnykh effektov terapii u patsientov s sindromom myagkogo kognitivnogo snizheniya]. *Meditinskiy akademicheskii zhurnal*. 2019; 19(S1): 84–6 (in Russian).
18. Didkovskiy N.A., Ogurtsov D.P., Krynskiy S.A., Gurskaya O.G., Shipulina O.Yu., Domonova E.A., et al. Myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: replication levels of lymphotropic herpesviruses and immune defense [Mialgicheskii entsefalomielit/sindrom khronicheskoy ustalosti: uroven' replikatsii limfotropnykh gerpeticheskikh virusov i immunnaya zashchita]. *Poliklinika*. 2016; (5): 46–50 (in Russian).
19. Denaro F.J., Staub P., Colmer J., Freed D.M. Coexistence of Alzheimer disease neuropathology with herpes simplex encephalitis. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-Grand)*. 2003; 49(8): 1233–40.
20. Wozniak M.A., Shipley S.J., Combrinck M., Wilcock G.K., Itzhaki R.F. Productive herpes simplex virus in brain of elderly normal subjects and Alzheimer's disease patients. *J. Med. Virol*. 2005; 75(2): 300–6. <https://doi.org/10.1002/jmv.20271>.
21. Jamieson G.A., Maitland N.J., Wilcock G.K., Yates C.M., Itzhaki R.F. Herpes simplex virus type 1 DNA is present in specific regions of brain from aged people with and without senile dementia of the Alzheimer type. *J. Pathol*. 1992; 167(4): 365–8. <https://doi.org/10.1002/path.1711670403>.
22. Honjo K., van Reekum R., Verhoeff N. Alzheimer's disease and infection: Do infectious agents contribute to progression of Alzheimer's disease? *Alzheimer's Dement*. 2009; 5(4): 348–60. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2008.12.001>.
23. Kobayashi N., Nagata T., Shinagawa S., Oka N., Shimada K., Shimizu A., et al. Increase in the IgG avidity index due to herpes simplex virus type 1 reactivation and its relationship with cognitive function in amnesic mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2013; 430(3): 907–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.12.054>.
24. Lövhelm H., Olsson J., Weidung B., Johansson A., Eriksson S., Hallmans G., et al. Interaction between cytomegalovirus and herpes simplex virus type 1 associated with the risk of Alzheimer's disease development. *J. Alzheimers Dis*. 2018; 61(3): 939–45. <https://doi.org/10.3233/JAD-161305>.



## Молекулярный мониторинг ротавирусов (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*), циркулирующих в Нижнем Новгороде (2012–2020 гг.): обнаружение штаммов с новыми генетическими характеристиками

Сашина Т.А., Морозова О.В., Епифанова Н.В., Кашников А.Ю., Леонов А.В., Новикова Н.А.

ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 603950, Нижний Новгород, Россия

**Введение.** В Российской Федерации зарегистрирована пентавалентная ротавирусная вакцина, однако при отсутствии массовой иммунизации детского населения охват целевой когорты остаётся низким, и ежегодный подъём заболеваемости ротавирусной инфекцией неизбежен. В связи с этим молекулярный мониторинг циркулирующих в нашей стране ротавирусов с целью поиска новых вариантов, обладающих эпидемиологическим потенциалом, является актуальной задачей.

**Материал и методы.** Для характеристики ротавирусов, циркулировавших в Нижнем Новгороде в 2012–2020 гг., применяли ПЦР-генотипирование и секвенирование нуклеотидных последовательностей генов VP4 и VP7. Филогенетический анализ выявленных в разных городах России штаммов проводили с использованием байесовского подхода в пакете программ BEAST.

**Результаты.** Спектр был представлен 17 генотипами с доминированием G9P[8] (37,4%). Выявлены ранее не идентифицированные на территории Нижнего Новгорода генотипы G1P[4], G1P[9], G2P[8], G4P[4], G4P[6], G8P[8] и G9P[4]. Показана циркуляция DS-1-подобных штаммов с генотипами G1P[8], G3P[8], G8P[8], G9P[8] и коротким электрофоретипом РНК. Ротавирусы основных генотипов характеризовались генетической гетерогенностью и принадлежали разным филогенетическим линиям и/или сублиниям (P[4]-IV-a; P[4]-IV-b; P[8]-3.1; P[8]-3.3; P[8]-3.4 и P[8]-3.6; G1-I; G1-II; G2-IVa-1; G2-IVa-3; G3-1; G3-3; G4-I-c; G9-III; G9-VI).

**Обсуждение.** Представленные результаты дополняют имеющиеся данные о генотиповой структуре популяций ротавирусов в России и характеризуют генетическое разнообразие нижегородских и российских штаммов. DS-1-подобные вирусы генотипа G3P[8] были представителями новой для территории РФ линии G3-1 и имели наибольшее количество аминокислотных замен в области антигенных эпитопов белка VP7.

**Заключение.** Появление и распространение в нашей стране штаммов с новыми генетическими характеристиками может способствовать преодолению ротавирусными иммунологического прессинга, создаваемого естественным и искусственным иммунитетом, и сохранению либо подъёму уровня заболеваемости ротавирусной инфекцией.

**Ключевые слова:** ротавирус; разнообразие; филогенетический анализ; генетические варианты

**Для цитирования:** Сашина Т.А., Морозова О.В., Епифанова Н.В., Кашников А.Ю., Леонов А.В., Новикова Н.А. Молекулярный мониторинг ротавирусов (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*), циркулирующих в Нижнем Новгороде (2012–2020 гг.): обнаружение штаммов с новыми генетическими характеристиками. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(2): 140-151. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-46>

**Для корреспонденции:** Сашина Татьяна Александровна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 603950, Нижний Новгород, Россия. E-mail: [tatyana.sashina@gmail.com](mailto:tatyana.sashina@gmail.com)

**Участие авторов:** Сашина Т.А. – проведение экспериментальных исследований, обработка данных, написание текста; Морозова О.В. – проведение экспериментальных исследований; Епифанова Н.В. – проведение экспериментальных исследований, общая редакция статьи; Кашников А.Ю. – проведение экспериментальных исследований, Леонов А.В. – проведение экспериментальных исследований, Новикова Н.А. – организация и контроль проведения исследований, написание текста.

**Финансирование.** Исследование проведено в рамках Государственного задания Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (№ 141-00063-18-00).

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

Поступила 02.02.2021  
Принята к печати 04.04.2021

## Molecular monitoring of the rotavirus (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*) strains circulating in Nizhny Novgorod (2012–2020): detection of the strains with the new genetic features

Tatiana A. Sashina, Ol'ga V. Morozova, Natalia V. Epifanova, Aleksandr U. Kashnikov, Artem V. Leonov, Nadezhda A. Novikova

FSBI «Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 603950, Nizhny Novgorod, Russia

**Introduction.** The pentavalent rotavirus vaccine has been registered in Russia, however, the vaccination coverage remains low, and an annual increase in the incidence of rotavirus infection is unavoidable. In this regard, molecular monitoring of rotaviruses in order to search for new variants possessing epidemic potential is an urgent task.

**Material and methods.** PCR genotyping and *VP4* and *VP7* genes sequencing were used to characterize rotaviruses circulating in Nizhny Novgorod in 2012–2020. The phylogenetic analysis of the strains was carried out using the BEAST software package.

**Results.** The spectrum included 17 genotypes with predominance of G9P[8] (37,4%). Detected in this study genotypes G1P[4], G1P[9], G2P[8], G4P[4], G4P[6], G8P[8], and G9P[4] were not previously identified in Nizhny Novgorod. The circulation of DS-1-like strains possessing genotypes G1P[8], G3P[8], G8P[8], or G9P[8] and a short RNA pattern had been shown. Rotaviruses of the common genotypes were genetically heterogeneous and belonged to different phylogenetic lineages and/or sublineages (P[4]-IV-a; P[4]-IV-b; P[8]-3.1; P[8]-3.3; P[8]-3.4 and P[8]-3.6; G1-I; G1-II; G2-IVa-1; G2-IVa-3; G3-1; G3-3; G4-I-c; G9-III; G9-VI).

**Discussion.** These results extend the available data on the genotypic structure of rotavirus populations in Russia and show the genetic diversity of viral strains. G3P[8] DS-1-like viruses were representatives of the G3-1 lineage, new for the territory of Russia, and had the largest number of amino acid substitutions in the *VP7* antigenic epitopes.

**Conclusion.** The emergence and spread of strains with new genetic features may allow rotavirus to overcome the immunological pressure formed by natural and vaccine-induced immunity, and maintain or increase the incidence of rotavirus infection.

**Key words:** rotavirus; diversity; phylogenetic analysis; genetic variants

**For citation:** Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Kashnikov A.U., Leonov A.V., Novikova N.A. Molecular monitoring of the rotavirus (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A*) strains circulating in Nizhny Novgorod (2012–2020): detection of the strains with the new genetic features. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(2): 140-151 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-46>

**For correspondence:** Sashina Tatiana Aleksandrovna, Ph.D. (Biol.), Senior Researcher of Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, FSBI «Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 603950, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: [tatyana.sashina@gmail.com](mailto:tatyana.sashina@gmail.com)

### Information about the authors:

Sashina T.A., <https://orcid.org/0000-0003-3203-7863>

Morozova O.V., <https://orcid.org/0000-0002-8058-8187>

Epifanova N.V., <https://orcid.org/0000-0001-7679-8029>

Kashnikov A.U., <https://orcid.org/0000-0003-1033-7347>

Leonov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-5486-3264>

Novikova N.A., <https://orcid.org/0000-0002-3710-6648>

**Contribution:** Sashina T.A. – performing the experiments, data processing, writing of the text; Morozova O.V. – performing the experiments; Epifanova N.V. – performing the experiments, general editing of the article; Kashnikov A.U. – performing the experiments; Leonov A.V. – performing the experiments; Novikova N.A. – organization and supervision of the experiments, writing of the text.

**Acknowledgement.** The study was funded by the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор) as part of the federal program (No. 141-00063-18-00).

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

Received 2 February 2021  
Accepted 4 April 2021

## Введение

Ротавирус А (род *Rotavirus*, семейство *Reoviridae*) (РВА) является важным инфекционным агентом и вызывает острый гастроэнтерит у детей первых лет жизни. В довакцинальный период (до 2006 г.) по всему миру ротавирусы (РВ) ежегодно были причиной приблизительно 111 млн случаев гастро-

энтерита, 2 млн госпитализаций и 453 тыс. смертей [1]. С указанного времени более 100 стран ввели ротавирусные вакцины в национальные программы иммунизации, благодаря чему к 2019 г. было достигнуто значительное снижение числа госпитализаций и уровня детской смертности от острого гастроэнтерита [2].

На территории Российской Федерации зарегистрирована живая аттенуированная пентавалентная вакцина (RV5). В 2014 г. она включена во вторую часть национального календаря профилактических прививок (по эпидемическим показаниям), а в ряде субъектов (Москва, Краснодар, Свердловская область, Смоленск, Тюмень, Ярославль, Владивосток, Санкт-Петербург, Сахалин) – в региональные календари [3]. В 2014–2018 гг. реализованы пилотные проекты по иммунизации детей первого года жизни в Москве, городах Московской (Подольск), Свердловской (Асбест, Невьянск, Красноуральск, Верхний Тагил) областей и Красноярского края (Ачинск), наиболее неблагоприятных по заболеваемости ротавирусной инфекцией (РВИ). Зафиксированы сокращение числа госпитализаций и снижение заболеваемости как в возрастной группе детей, подлежащих вакцинации, так и в более старшей, что свидетельствует о наличии популяционного эффекта иммунизации [4–6].

Тем не менее влияние проводимой в различных регионах мира вакцинации на генетическую структуру популяции РВА остаётся неясным. Применение вакцин может повлечь за собой появление новых пандемичных вариантов, реассортантов с вакцинными штаммами или реверсию последних в вирулентные штаммы [7]. В РФ ситуация усложняется тем, что охват целевой когорты за последние годы составил лишь 1–2% при неравномерном распределении объёмов вакцинации в разных субъектах [8], в связи с чем оценка эпидемиологических эффектов иммунизации и её влияния на генетическое разнообразие штаммов РВА не может быть корректной. Таким образом, в сложившихся условиях одной из важных задач является молекулярный мониторинг циркулирующих в нашей стране генетических вариантов данного возбудителя.

Вирионы РВ представляют собой безоболочечные частицы размером ~100 нм, которые состоят из 3 концентрических слоёв белка и заключают в себе геном из 11 сегментов двухнитевой РНК (днРНК). Компоненты наружного капсида вириона – VP7 и VP4 – ответственны за адсорбцию и проникновение вируса в клетку-мишень. Кроме того, они являются основными антигенами, вызывая продукцию нейтрализующих антител (АТ) в организме человека [9]. Для классификации РВ чаще всего используют бинарную номенклатуру, включающую G- и P-генотипы, определяемые на основе кодирующих белки VP7 и VP4 генов. РВА характеризуется значительным генетическим разнообразием. В настоящее время в разных странах доминируют как минимум 6 основных генотипов: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и G12P[8], в то время как число менее распространённых вариантов значительно больше [10].

Помимо этого, разработана полногеномная классификация РВ, основанная на особенностях всех 11 сегментов их генома. Генотип обозначают в виде акронима Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, где заглавная латинская буква соответствует определённому сегменту генома, а «x» – номеру его генотипа. Различают 2 обширные геногруппы ротавирусов:

Wa-подобную (генотип G1/G3/G4/G9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1) и DS-1-подобную (G2-P[4]-I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2), имеющие соответственно длинный и короткий профили миграции сегментов генома в полиакриламидном геле (ПААГ) [11]. Для них ранее установлено отсутствие обмена между собой генетическим материалом (реассортации сегментов генома). Однако в мире всё чаще отмечают появление и распространение эпидемически значимых двойных реассортантов – DS-1-подобных РВА с генотипами G1P[8], G3P[8], G8P[8], и G9P[8], которые несут генетический материал обеих геногрупп и не могут быть выявлены с помощью рутинного G- и P-генотипирования [12–15].

К настоящему времени опубликованы данные о G[P]-генотипах РВА в 11 регионах России, где преобладают варианты G4P[8] и G9P[8] [16–19]. В Нижнем Новгороде многолетние исследования генетического разнообразия РВ ведутся с 1984 г. За этот период накоплены данные о наиболее распространённых генетических вариантах ротавирусов разных типов и их смене в процессе многолетней циркуляции [20–24], определены полные генотипы нижегородских штаммов, выполнен филогенетический анализ на основе всех сегментов генома [25] и изучены их филогеографические связи [26]. Данная работа посвящена изучению генетического разнообразия РВ, циркулировавших в Нижнем Новгороде на протяжении 2012–2020 гг., и их сравнению со штаммами, выделенными в других городах России и мира.

### Материал и методы

При проведении работы использованы образцы фекалий детей в возрасте до 14 лет, госпитализированных в инфекционный стационар Нижнего Новгорода с симптомами острой кишечной инфекции (ОКИ) в 2012–2020 гг. Для экстракции нуклеиновых кислот и постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией применяли наборы реагентов РИБО-преп и РЕВЕРТА-L (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора (ЦНИИЭ), Россия). Обнаружение ротавирусной РНК проводили с использованием ПЦР-тест-системы с детекцией результата в реальном времени «АмплиСенс Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL» (ЦНИИЭ). Параллельно РНК вирусов характеризовали методом электрофореза в полиакриламидном геле (РНК-ПААГ) [24].

Определение G[P]-генотипа ротавирусов осуществляли в ходе мультиплексной ПЦР с детекцией результата с помощью электрофореза в агарозном геле. Использовали праймеры, специфичные в отношении генотипов G1-4, G9 и P[4], P[6], P[8], P[9] [24]. I- и E- генотипы определяли согласно опубликованному ранее протоколу [27]. Секвенирование комплементарной ДНК (кДНК) фрагментов генов VP4 и VP7 проводили по 2 цепям с помощью прямого и обратного праймеров, набора для постановки реакции секвенирования DTCS Quick Start Kit («Beckman Coulter», США) и системы генетического анализа Beckman

Coulter CEQ 8000 («Beckman Coulter», США) в соответствии с инструкциями производителей.

Поиск родственных последовательностей выполняли с использованием онлайн-сервиса BLAST. Для филогенетического анализа из базы данных GenBank взяты нуклеотидные последовательности генов VP7 и VP4 РВ из Нижнего Новгорода (1991–2011 гг.), а также из Москвы, Новосибирска, Омска, Красноярска, Смоленска, Владивостока и Ханты-Мансийска, размещённые Н.А. Новиковой с соавт., Е.В. Жираковской с соавт., А.Т. Подколзиным с соавт., Е.Б. Файзуловым с соавт., А.Г. Южаковым с соавт. Полученные в данной работе последовательности нуклеотидов доступны в GenBank под номерами MW132460–MW132546.

Выравнивание и первичный анализ нуклеотидных и выведенных аминокислотных последовательностей проводили в программном обеспечении MEGA X. Выборки нуклеотидных последовательностей далее анализировали с помощью программ BEAUti 1.8.2 и BEAST 1.8.2. Наиболее подходящими моделями нуклеотидных замен для выборок генов VP4 и VP7 были GTR + G и T92 + G + I соответственно. Скорость эволюции рассчитывали на базе нестрогих логнормальных молекулярных часов. Длину цепи Маркова задавали равной 60 млн шагов. Филогенетические деревья с максимальной достоверностью клейдов (maximum clade credibility, MCC) находили на основе полученных данных в программе TreeAnnotator 1.8.2 и редактировали в программе FigTree 1.4.2. Филогенетические линии и сублинии обозначили согласно принятой в литературе классификации [25, 28–32].

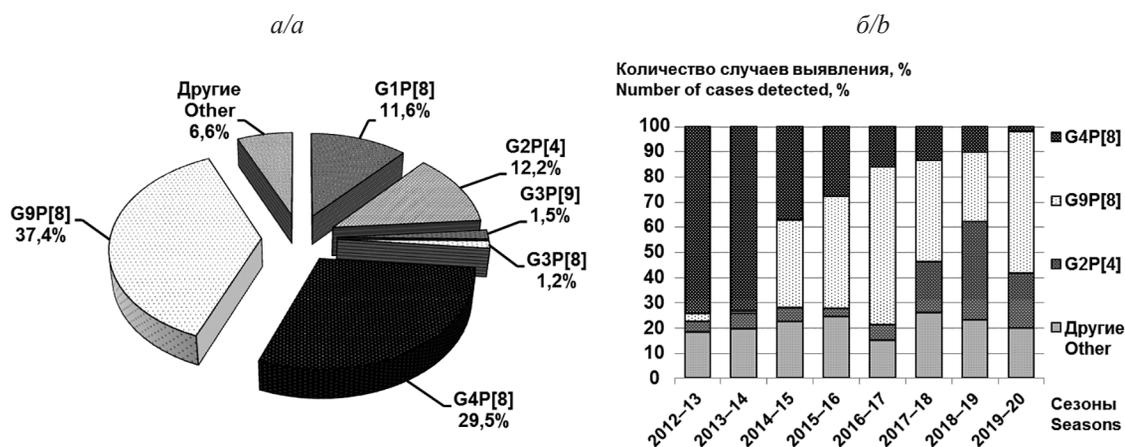
### Результаты

**Характеристика спектра G[P]-генотипов ротавируса А и выявление двойных DS-1-подобных реассортантов в Нижнем Новгороде.** Исследованы 10 866 образцов фекалий детей в возрасте до 14 лет, госпита-

лизованных с диагнозом ОКИ на протяжении 2012–2020 гг. РВ обнаружены в 2927 случаях (26,9%). Методом ПЦР в 2411 образцах (82,4%) определён G[P]-тип ротавируса. В 516 (17,6%) случаях генотип вируса не был установлен, что может свидетельствовать как о низкой концентрации комплементарной ДНК (кДНК) патогена в образце, так и о существовании в нижегородской популяции РВ генотипов, к которым не были сконструированы специфичные праймеры.

Спектр идентифицированных методом ПЦР G-генотипов РВ включал 5 широко распространённых в мире (G1, G2, G3, G4, и G9). При дополнительном исследовании методом секвенирования гена VP7 обнаружены варианты G6, G8 и G12. Набор Р-генотипов включал 4 типа, среди которых были как часто встречающиеся Р[4] и Р[8], так и редкие Р[6] и Р[9]. Генотипы выявлены в 17 комбинациях: G1P[8]; G1P[4]; G1P[9]; G2P[4]; G2P[8]; G3P[8]; G3P[9]; G4P[4]; G4P[6]; G4P[8]; G4P[9]; G6P[9]; G8P[8]; G9P[8]; G9P[4]; G9P[9] и G12P[8]. Преобладал генотип G9P[8] (37,4%), за которым следовал G4P[8] (29,5%) (рис. 1).

При анализе многолетней циркуляции РВ в Нижнем Новгороде видно, что в сезоны 2012–2014 гг. зафиксировано преобладание генотипа G4P[8] (74,4%). Затем в 2014–2015 гг. его доле вклад снизился до 37,4% на фоне усиления активности циркуляции штаммов с генотипом G9P[8] (35,0%). К сезону 2016–2017 гг. доля последнего достигла 63,1%, сократившись в следующем сезоне до 40,6%. В 2018–2019 гг. отмечены дальнейшее уменьшение доли G9P[8] до 25,1% и преобладание генотипа G2P[4] (41,2%), однако к сезону 2019–2020 гг. вариант G9P[8] вновь стал превалировать (56,5%), вытеснив G2P[4] на второе место (21,8%). Таким образом, в Нижнем Новгороде отмечены смена доминирующего генотипа G4P[8] на G9P[8] в 2015 г. и колебания доли генотипов G9P[8] и G2P[4] за период 2017–2020 гг.



**Рис. 1.** Генотипы ротавируса А в Нижнем Новгороде в 2012–2020 гг. *a* – общее распределение штаммов ротавируса А основных G[P]-генотипов (в %); *b* – временные изменения вклада ротавирусов генотипов G2P[4], G4P[8] и G9P[8] в популяционную структуру.

**Fig. 1.** Rotavirus A genotypes in Nizhny Novgorod in 2012–2020. *a* – overall distribution of rotavirus A strains possessing the common G[P] genotypes (in %); *b* – temporal changes in the contribution of G2P[4], G4P[8], and G9P[8] rotaviruses to the population structure.

В ходе дополнительного изучения штаммов РВ с применением ПЦР для определения I/E-генотипов и электрофореза РНК-ПААГ на территории Нижнего Новгорода обнаружены DS-1-подобные реассортанты генотипов G1-P[8]-I2-E2, G3P[8]-I2-E2, G8P[8]-I2-E2 и G9P[8]-I2-E2, обладающие коротким профилем миграции сегментов генома в ПААГ. К сезону 2019–2020 гг. долевым вклад таких штаммов в типовую структуру популяции возрос до 11,8%.

**Филогенетический анализ ротавирусов на основе гена VP4.** Для изучения внутригенотипового разнообразия РВ нами использованы 79 нуклеотидных последовательностей фрагмента VP8\* гена VP4 штаммов, выявленных в Нижнем Новгороде за период 2015–2020 гг. и имевших разные G-генотипы. Кроме того, из GenBank взяты 106 последовательностей гена VP4 вирусов, циркулировавших в 7 городах России, и 101 последовательность штаммов из 18 стран (Бельгия, Бразилия, Соединённые Штаты Америки (США), Малави, Иран, Таиланд, Вьетнам, Доминиканская Республика, Испания, Япония, Ливан, Сингапур, Германия, Бангладеш, Филиппины, Австралия, Пакистан). Содержащее 214 нуклеотидных последовательностей адаптированное и сокращённое филогенетическое дерево представлено на **рис. 2**.

Анализ РВ генотипа P[8] установил присутствие на территории России представителей филогенетической линии P[8]-3. Выявлена вариабельность нуклеотидной последовательности гена VP4 относящихся к ней вирусов, проявившаяся в их принадлежности 4 сублиниям. При этом штаммы сублиний P[8]-3.1, P[8]-3.3 и P[8]-3.6 были широко распространены в Нижнем Новгороде, Москве, Новосибирске в 2016–2020 гг. и ранее – в других городах, в то время как единичные представители P[8]-3.4 обнаружены в Нижнем Новгороде в 2017 г. и Омске в 2008 г.

РВ генотипа P[4], циркулировавшие в РФ, принадлежали 2 сублиниям (а и b) филогенетической линии P[4]-IV. В Нижнем Новгороде представители обеих сублиний совместно циркулировали на протяжении 5 лет (2016–2020 гг.). Аналогичная ситуация имела место в отношении вирусов из Москвы и Новосибирска. В то же время вирусы, выявленные в Омске и Смоленске, относились только к сублинии IV-b генотипа P[4].

В 2020 г. в Нижнем Новгороде обнаружен штамм с генотипом P[6], относившийся согласно принятой классификации к сублинии P[6]-I-A. В её состав вошёл также российский штамм, выделенный в Омске в 2012 г., наряду с РВ из Ганы, Бельгии, Пакистана и Конго (2010–2012 гг.). Российские штаммы генотипа P[9] были близкородственны друг другу, образовав на филогенетическом дереве 1 кластер, и имели высокий уровень гомологии нуклеотидных последовательностей (96,5–99,9%).

На основании анализа выведенной аминокислотной последовательности домена VP8\* белка VP4 в области антигенных эпитопов внутри линии P[8]-3 найдены выявлена вариабельность. В зависимости от наличия или отсутствия замен аминокислот

в позициях 113, 189, 191, 194 и 195 у нижегородских штаммов нами выделено 6 вариантов, обозначенных как P[8]-3.1/113D; P[8]-3.1/113D/195D; P[8]-3.3/113D; P[8]-3.4 без замен; P[8]-3.6/194D и P[8]-3.6/191T/194D. Они были распространены не только в Нижнем Новгороде, но и на территории других российских городов. Так, P[8]-3.1/113D, P[8]-3.1/113D/195D и P[8]-3.3/113D идентифицированы в Смоленске, Красноярске, Омске, Новосибирске, Ханты-Мансийске и Владивостоке в 2004–2018 гг. Варианты P[8]-3.6/194D и P[8]-3.6/191T/194D обнаружены в Москве, Смоленске, Новосибирске, Омске и Владивостоке в 2009–2018 гг.

РВ генотипа P[4] обеих сублиний также обладали вариабельностью аминокислот в структуре антигенных эпитопов, затронувшей 2 позиции – 87 и 114. Внутри каждой из сублиний было выделено по 2 разновидности: P[4]-IV-a без замен; P[4]-IV-a/87S; P[4]-IV-b без замен; P[4]-IV-b/114P, обнаруженные также в Москве и Новосибирске. Аминокислотная последовательность белка VP4 в области антигенных эпитопов РВ генотипа P[9], циркулировавших на территории России, была консервативной.

**Филогенетический анализ ротавирусов на основе гена VP7.** В анализ взяты нуклеотидные последовательности гена VP7 130 нижегородских штаммов генотипов G1–G4, G6, G8, G9 и G12, выявленных в период 2016–2020 гг. и ранее, а также ротавирусов человека и животных из разных городов России (88 последовательностей) и других стран (110 последовательностей). Адаптированное и сокращённое филогенетическое дерево, содержащее 212 нуклеотидных последовательностей, представлено на **рис. 3**.

На протяжении изучаемого периода в РФ идентифицированы РВ генотипа G1, принадлежащие 2 филогенетическим линиям (I и II) и 3 сублиниям (I-A, I-D и II-C). Большая часть взятых в анализ штаммов (73,6%) относилась к сублинии G1-II-C, присутствующей на территории России с 2003 г. Ротавирусы сублинии G1-I-A присутствовали на территории Нижнего Новгорода начиная с 2011 г., когда была зарегистрирована низкая активность циркуляции штаммов генотипа G1. Представители данной сублинии отмечены также в Новосибирске и Красноярске (единичные случаи) в 2009 и 2012 гг. Только 1 штамм – представитель сублинии G1-I-D детектирован в Новосибирске (2016 г.), в то время как 5 её штаммов ранее найдены в Нижнем Новгороде (2000 и 2014 гг.).

Циркулирующие на территории России РВ генотипов G2P[4] и G2P[8] были представителями 2 сублиний (1 и 3) филогенетической линии G2-IVa. Основная часть (76,2%) взятых в анализ штаммов генотипа G2P[4] принадлежала сублинии G2-IVa-3; они выявлены в Нижнем Новгороде, Москве, Омске, Новосибирске, Смоленске на протяжении 2008–2020 гг. Вирусы генотипа G2P[8], обнаруженные в Нижнем Новгороде в 2019 г., также вошли в состав G2-IVa-3. Наличие представителей сублинии G2-IVa-1 установлено в Нижнем Новгороде, Москве и Новосибирске (2010–2019 гг.).

РВ генотипов G3P[8] и G3P[9] относились к 2 филогенетическим линиям (G3-1 и G3-3) и 2 сублиниям (3-а и 3-е). Штаммы типа G3P[8], выявленные в Нижнем Новгороде и других российских городах за период 1991–2017 гг., принадлежали исключительно сублинии G3-3-а и характеризовались высоким уровнем сходства нуклеотидных последовательностей гена VP7. Появившиеся в 2017 г. в Нижнем Новгороде и Новосибирске реассортантные DS-1-подобные вирусы генотипа G3P[8] были представителями другой филогенетической линии (G3-1). Им родственны аналогичные штаммы, выделенные в Австралии, Бразилии, Доминиканской Республике, Индии, Испании, Таиланде, Тайване и Чехии в 2012–2018 гг. РВ ге-

нотипа G3P[9], циркулировавшие на территории РФ (Нижний Новгород, Москва, Новосибирск, Омск) в 1998–2020 гг., относились к сублинии G3-3-е.

На филогенетическом дереве нуклеотидные последовательности вирусов с генотипом G4P[8] вошли в состав кластеров, соответствующих линиям I и II. Нижегородские изоляты, как и большинство российских штаммов, принадлежали сублинии G4-I-с, наиболее распространённой в настоящее время по всему миру. Ближайшими родственниками были РВ из Москвы, Новосибирска, Омска, а также Италии, Бельгии, Греции, Японии, Бразилии и Парагвая. Сходство нуклеотидных последовательностей гена VP7 нижегородских ротавирусов генотипа G4P[8]

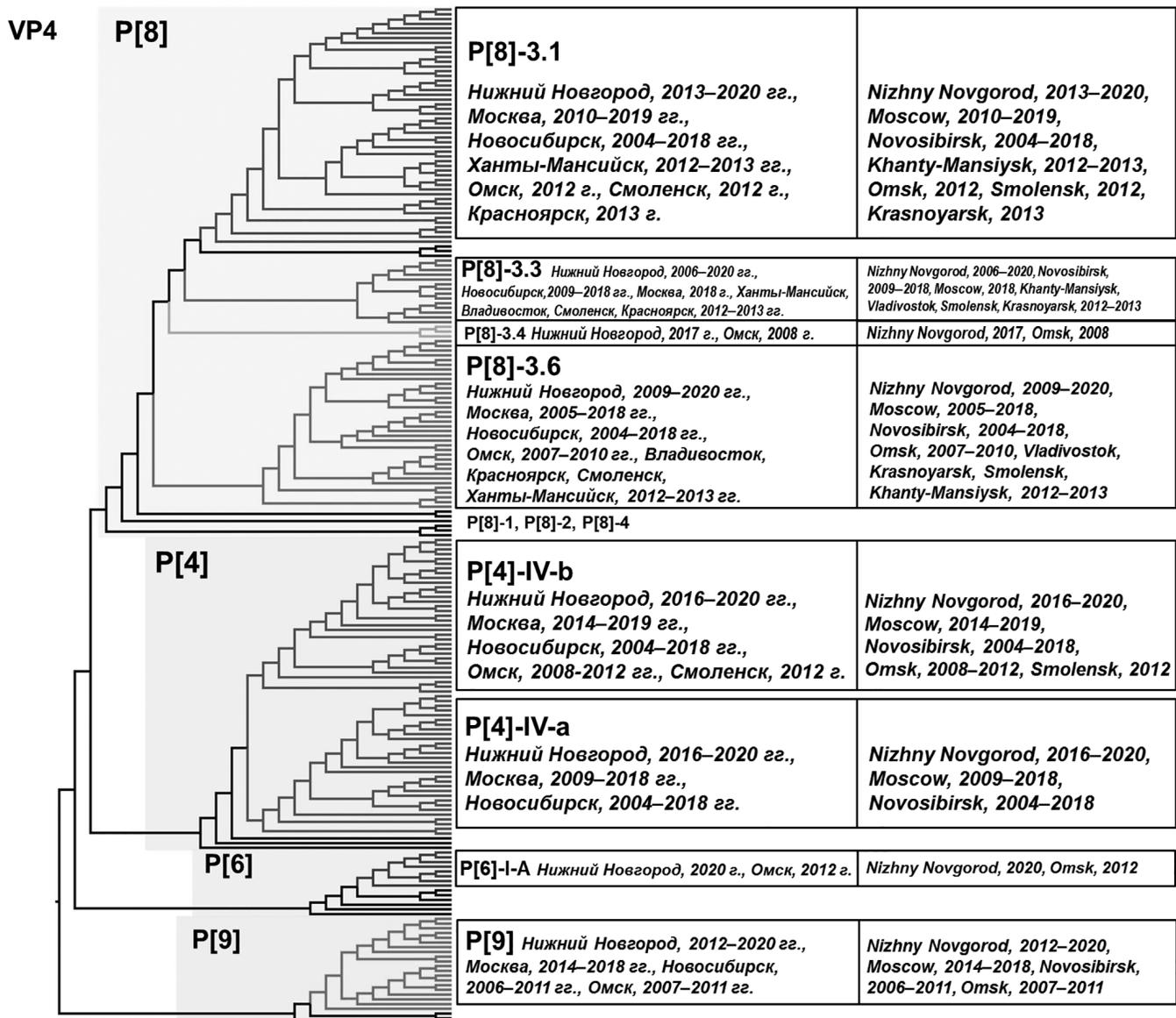


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе гена VP4 ротавирусов генотипов P[4], P[6], P[8] и P[9], выявленных в России.

Fig. 2. Phylogenetic tree based on the VP4 gene of P[4], P[6], P[8] and P[9] rotaviruses isolated in Russia.

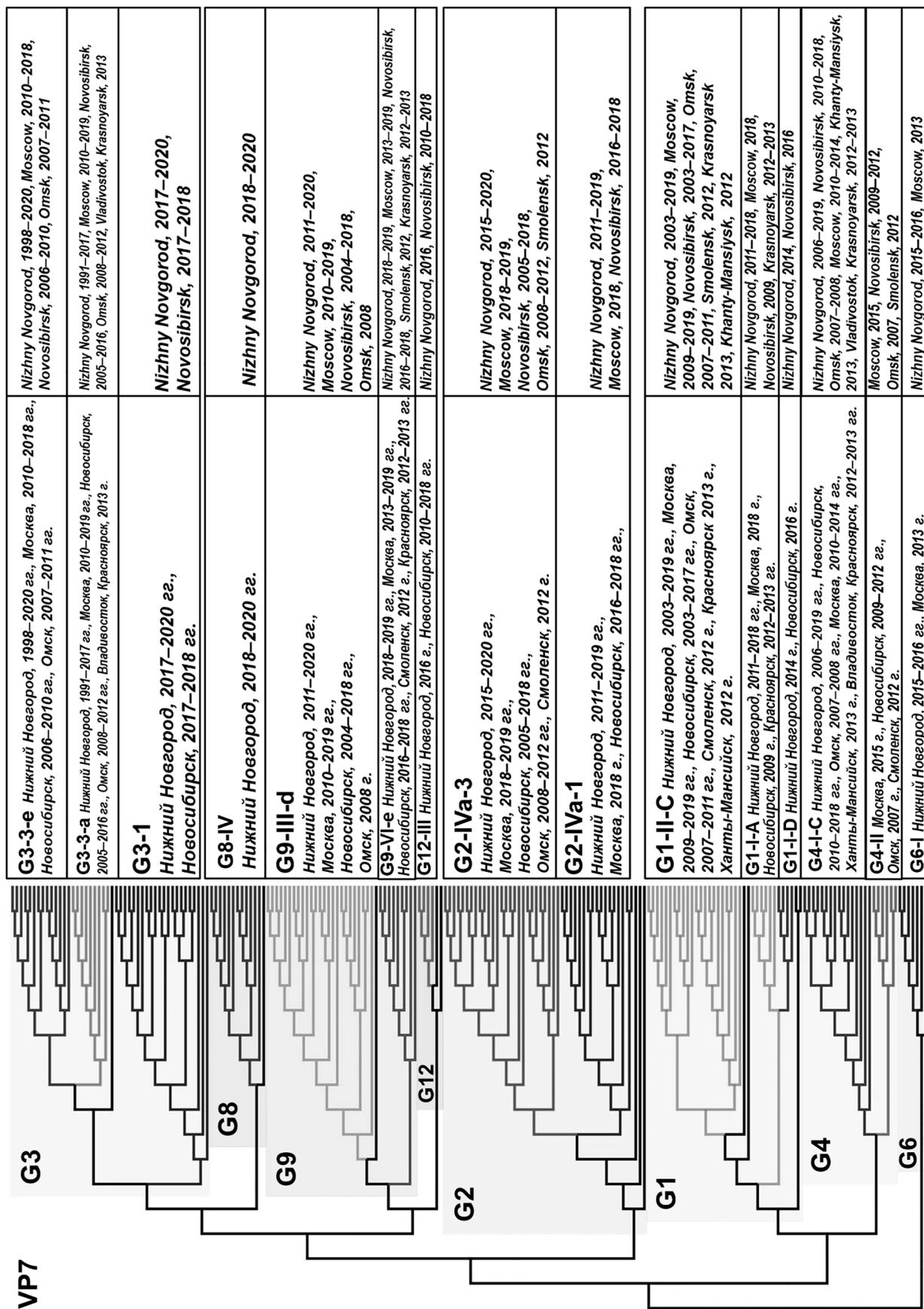


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основе гена VP7 ротавирусов разных G-генотипов, выявленных в России.  
 Fig. 3. Phylogenetic tree based on the VP7 gene of rotaviruses possessing common G-genotypes isolated in Russia.

было равным 98,2–100,0%, что указывает на стабильность данного аллеля в период 2005–2019 гг. Пять штаммов, выделенных в Новосибирске и Омске в 2007–2012 гг., принадлежали филогенетической линии G4-II.

В сезон 2015–2016 гг. в Нижнем Новгороде выявлены 2 штамма редкого генотипа G6P[9]. На филогенетическом дереве нуклеотидные последовательности их гена VP7 группировались с PB, выделенными в Москве (2013 г.), Италии (2003, 2011 гг.) и Тунисе (2008 г.), в составе линии G6-I. Нижегородские ротавирусы генотипа G8P[8] относились к сублинии G8-IV и были филогенетически близки аналогичным штаммам из Вьетнама, Испании, Таиланда и Японии, выявленным в 2013–2017 гг.

Российские PB генотипов G9P[8] и G9P[4] группировались с представителями 2 филогенетических линий – III и VI. Представители сублинии G9-III-d, циркулировавшие на территории России в 2014–2020 гг., и 1 изолят, выделенный в Москве (2010 г.), оказались филогенетически родственны штаммам из Турции, Ливана и Франции. Нижегородский изолят генотипа G9P[4], детектированный в 2020 г., кластеризовался обособленно от штаммов G9P[8]. Десять штаммов генотипа G9 из Нижнего Новгорода (2018–2019 гг.), Москвы (2013 г.), Смоленска (2012 г.) и Новосибирска (2016–2018 гг.) относились к другой филогенетической линии (G9-VI, сублиния e), что отличает их от большинства российских штаммов этого генотипа. Данный вариант составил кластер с PB человека из Китайской Народной Республики (КНР) и свиней (*Suidae*), выделенными в Японии.

В 2016 г. в Нижнем Новгороде у ребёнка с симптоматической кишечной инфекцией выявлен штамм PVA G12P[8]. На дереве он относился к наиболее распространённой в настоящее время в мире линии G12-III и сформировал отдельный кластер с вирусами из Таиланда и Пакистана, идентифицированными в 2010–2012 гг. Указанному изоляту были также родственны штаммы, выделенные в Новосибирске в 2017–2018 гг., а также во Франции, Ираке, Бельгии, Эфиопии и Италии (2007–2010 гг.).

В ходе исследования проведён анализ выведенных аминокислотных последовательностей белка VP7 российских штаммов – представителей разных филогенетических линий в области антигенных эпитопов. У PB линий G1-I и G1-II обнаружены 3 отличия в позициях 94, 123 и 217. Представители линии G3-1 имели отличия в 4 позициях (T212A, N213T, N238D, N242A) в сравнении со всеми штаммами G3-3 и ещё в 1 (T87S/N) – по сравнению с вирусами сублинии G3-3-a. Относящиеся к линии G9-VI штаммы отличались от PB сублинии G9-III-d аминокислотой в позиции 100 (D100N).

Вариабельность аминокислотной последовательности белка VP7 показана также у представителей разных сублиний в пределах одной линии. В частности, штаммы кластера G2-IVa-3 в сравнении с G2-IVa-1 имели замену аминокислотного остатка в позиции S242N. Представители сублинии G3-3-e (генотип G3P[9]) от-

личались от вирусов G3-3-a (генотип G3P[8]) заменой в T87S. Следует отметить, что последовательность аминокислот белка VP7 в области антигенных эпитопов PB внутри сублиний G3-3-a, G3-3-e, G4-I-c и G9-III-d в изучаемый период была консервативной.

### Обсуждение

В данной работе охарактеризовано разнообразие генотипов PB, циркулировавших в Нижнем Новгороде в 2012–2020 гг. Спектр представлен 17 типами с доминированием G9P[8] (37,4%). Обнаружены ранее не идентифицированные на территории города генотипы G1P[4], G1P[9], G2P[8], G4P[4], G4P[6], G8P[8] и G9P[4]. Представленные результаты дополняют имеющиеся данные о генотиповой структуре популяций PB в России. В целом во многих городах показано широкое распространение вариантов G1P[8], G4P[8] и G9P[8], в то время как присутствие G2P[4], G3P[8] и G3P[9] варьирует в зависимости от конкретной территории [16]. Так, в Москве в 2018–2019 гг. преобладали 2 генотипа: G9P[8] (39,0%) и G4P[8] (29,3%), также детектированы G2P[4], G1P[8], G3P[8], G12P[8] и G3P[9] [19]. В Оренбургской области в сезоны 2013–2017 гг. циркулировали вирусы генотипов G4P[8] (56,9%), G9P[8] (12,9%), G2P[4], G1P[8], G3P[8], G3P[9] и G12P[8] (суммарно 30,2%) [33]. В Новосибирске в 2009–2012 гг. доминировал генотип G4P[8] (56,0%), второе место занимал G1P[8] (20,1%); выявлены также варианты G9P[8], G2P[4], G4P[6], G2P[8], G12P[8], G5P[6], G12P[6] и G3P[9] [18].

Полученные сведения служат дополнением к информации о генетических перестройках в популяции PB в процессе их многолетней циркуляции в Нижнем Новгороде. Ранее показана смена доминирующих типов PVA в 2007–2008 гг., когда генотип G4P[8] вытеснил преобладавший ранее G1P[8] [21]. С 2015 г. в Нижнем Новгороде превалирующим стал вариант G9P[8] [23]; при этом за 2017–2020 гг. отмечены колебания доли G9P[8] и G2P[4]. Наибольшее доленое участие генотипа G9P[8] приходилось на 2016–2017 гг., G2P[4] – на 2018–2019 гг. В других городах РФ за последние годы также возросло значение генотипа G9P[8]. В Москве на фоне доминирования варианта G4P[8] первоначально отмечался рост доли G9P[8], а начиная с 2013 г. – его преобладание. В сезоне 2018–2019 гг. зафиксирована совместная циркуляция PB данных генотипов [17, 19]. В Оренбурге к 2016–2017 гг. доля варианта G9P[8] возросло до 55,8%, доминировавшего до этого G4P[8] – снизилось до 26,9%. При этом ранее, в сезоны 2013–2015 гг., генотип G9P[8] отсутствовал, а в 2015–2016 гг. выявлялся лишь в единичных случаях [33].

В проведённом исследовании показана циркуляция в Нижнем Новгороде DS-1-подобных штаммов с генотипами G1P[8], G3P[8], G8P[8] и G9P[8]. Впервые реассортанты генотипа G1P[8] обнаружены в 2013–2014 гг. и охарактеризованы с помощью секвенирования генов VP4, VP4, VP6 и NSP4 [34]. К сезону 2019–2020 гг. доля реассортантных вариантов разных генотипов достигла 11,8%. В мире DS-1-подобные двойные реассортан-

ты обнаружены в 2013–2014 гг. на территории Австралии и Юго-Восточной Азии, и в настоящее время их циркуляция уже зарегистрирована во многих странах. Отмечено их доминирование в Австралии (37,6%), Индонезии (70,8%), Таиланде (89,8%) и Вьетнаме (27%) [12–15, 35]. Таким образом, на территории Нижнего Новгорода и России идентифицированы реассортантные DS-1-подобные штаммы генотипов G1P[8], G3P[8], G8P[8] и G9P[8], которые являются эпидемиологически значимыми во всём мире.

Филогенетический анализ на основе генов, кодирующих белки наружного капсида вириона, продемонстрировал большое внутригенотиповое разнообразие штаммов РВА. Вирусы основных Р-генотипов принадлежали 1 филогенетической линии внутри каждого из них (P[8]-3 и P[4]-IV), однако относились к 4 (P[8]-3.1; P[8]-3.3; P[8]-3.4 и P[8]-3.6) и 2 (P[4]-IV-a; P[4]-IV-b) сублиниям соответственно. РВ линии P[8]-3 в настоящее время наиболее распространены по всему миру [36]. Следует отметить, что ранее в РФ отмечена циркуляция представителей 2 других филогенетических линий: P[8]-1 и P[8]-4. Первая была широко представлена в Нижнем Новгороде до 2004 г., после чего её полностью вытеснили из популяции РВ линии P[8]-3 [22]. Штаммы P[8]-4 обнаружены в Западной Сибири в 2006–2011 гг., когда произошла общая активизация циркуляции этих вариантов в мире [37].

Среди циркулирующих на территории России ротавирусов основных G-генотипов также установлена вариативность нуклеотидной последовательности гена VP7. Так, штаммы генотипов G1, G3, G9, выявленные в последние годы, были представителями 2 филогенетических линий внутри соответствующих генотипов (G1-I и G1-II; G3-1 и G3-3; G9-III и G9-VI). Вирусы генотипа G2 относились к 2 сублиниям 1 линии (G2-IVa-1; G2-IVa-3).

Обращает на себя внимание тот факт, что появившиеся начиная с 2017 г. в Нижнем Новгороде и Новосибирске DS-1-подобные ротавирусы генотипа G3P[8] были представителями филогенетической линии G3-1, в то время как ранее циркулировавшие на территории России Wa-подобные штаммы данного генотипа относились к сублинии G3-3-a. Реассортанты были родственны по гену VP7 аналогичным штаммам из других стран, что свидетельствует об их недавнем заносе на территорию России.

Следует отметить присутствие в РФ вирусов генотипа G9P[8], относящихся к минорной линии G9-VI (Нижний Новгород, Москва и Новосибирск). Данные штаммы имеют родство с РВ свиней, выделенными в Японии. Ранее в Нижнем Новгороде во время доминирования G9P[8] выявлялись исключительно представители филогенетической линии G9-III-d, родственные штаммам из Турции [23]. Подобные штаммы детектированы также на территории Москвы [17].

На протяжении изучаемого периода на территории России также наблюдалась совместная циркуляция 2 генетических вариантов генотипа G2 (G2-IVa-1 и G2-IVa-3). РВ генотипа G2 постоянно эволюционируют, генерируя новые линии, смена которых приво-

дит к появлению новых глобально доминирующих вариантов каждые 7 лет [38]. В Нижнем Новгороде до 2017 г. доля ротавирусов G2P[4] была низкой и составляла в среднем 5,6%. В сезон 2017–2018 гг. произошло повышение активности циркуляции вирусов данного генотипа (22,9%), что может быть связано с привнесением нового варианта G2-IVa-3 в нижегородскую популяцию в 2015 г. из других российских городов.

Белки наружного капсида VP7 и VP4 являются индукторами вируснейтрализующих АТ и несут на своей поверхности антигенные эпитопы. Аминокислотная последовательность российских РВ генотипов P[4] и P[8] в данных регионах молекулы вариабельна, что проявилось в наличии как минимум 10 различных вариантов белка VP4. Структура эпитопов VP7 вирусов разных линий основных G-генотипов характеризуется наличием от 1 до 4 аминокислотных замен, наибольшее количество из которых наблюдается у РВ линии G3-1, новых для территории России. Следует учитывать, что замена аминокислотного остатка теоретически может быть причиной конформационных изменений полипептидной цепи в структуре антигенных эпитопов. Показано, что возможны различия среди вариантов вируса разных линий относительно антигенных свойств и реактивности со специфическими АТ, что может способствовать уклонению РВ от действия адаптивного иммунитета [36].

### Заключение

Проведение вакцинопрофилактики теоретически может оказать влияние на генетическую структуру популяции вируса. Представляется вероятным, что появление и распространение несущих новые генетические характеристики штаммов может способствовать преодолению иммунологического прессинга, создаваемого естественным и искусственным иммунитетом. В связи с этим постоянный молекулярный мониторинг циркулирующих РВ важен для своевременного выявления популяционных перестроек.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Ogilvie I., Khoury H., Khoury A.C., Goetghebeur M.M. Burden of rotavirus gastroenteritis in the pediatric population in Central and Eastern Europe: serotype distribution and burden of illness. *Hum. Vaccin.* 2011; 7(5): 523–33. <https://doi.org/10.4161/hv.7.5.14819>.
2. Burnett E., Parashar U.D., Tate J.E. Real-world effectiveness of rotavirus vaccines, 2006–19: a literature review and meta-analysis. *Lancet. Glob. Health.* 2020; 8(9): e1195–202. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30262-X](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30262-X).
3. Рычкова О.А., Грахова М.А., Сагитова А.С., Кожевникова Л.А., Старостина О.В., Кузьмичёва К.П. Ротавирусная инфекция. Возможности своевременной вакцинопрофилактики. *Медицинский совет.* 2018; (17): 215–20. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2018-17-215-219>.
4. Смирнова С.С., Голубкова А.А., Колтунов С.В. Опыт вакцинации против ротавирусного гастроэнтерита в Свердловской области. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* 2018; 17(3): 68–73. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-3-68-73>.
5. Феклисова Л.В., Шаповалова Р.Ф. Результаты массовой иммунизации против ротавирусной инфекции детей первого года жизни на отдельной территории Московской области. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* 2019; 18(4): 75–81. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-4-75-81>.

6. Мартынова Г.П., Южакова А.Г., Соловьёва И.А., Третьяков А.П. Ротавирусная инфекция у детей в Красноярском крае: первые шаги к снижению заболеваемости. *Фарматека*. 2016; (11): 45–50.
7. Кондакова О.А., Никитин Н.А., Трифонова Е.А., Атабеков И.Г., Карпова О.В. Вакцины против ротавируса: новые стратегии и разработки. *Вестник Московского университета. Серия 16: Биология*. 2017; 72(4): 199–208.
8. Кожаметова Т.А., Кулешов К.В., Кясова Д.Х., Коновалова Т.А., Паркина Н.В., Подколзин А.Т. Оценка эпидемиологических эффектов применения пентавалентной ротавирусной вакцины при низком уровне охвата вакцинацией целевой когорты. *Журнал инфектологии*. 2019; 11(3): 71–76. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-3-71-76>.
9. Estes M.K., Greenberg H.B. Rotaviruses. In: Knipe D.M., Howley P. *Fields Virology*. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2013: 1347–401.
10. Bányai K., László B., Duque J., Steele A.D., Nelson E.A., Gentsch J.R., et al. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine*. 2012; 30(Suppl. 1): A122–A130. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.111>.
11. Matthijnssens J., Ciarlet M., Heiman E., Arijis I., Delbeke T., McDonald S.M., et al. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J. Virol.* 2008; 82(7): 3204–19. <https://doi.org/10.1128/JVI.02257-07>.
12. Cowley D., Donato M., Roczo-Farkas S., Kirkwood C.D. Emergence of a novel equine-like G3P[8] inter-genogroup reassortant rotavirus strain associated with gastroenteritis in Australian children. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(2): 403–10. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000352>.
13. Hoa-Tran T.N., Nakagomi T., Vu H.M., Do L.P., Gauchan P., Agbemabiese C.A., et al. Abrupt emergence and predominance in Vietnam of rotavirus A strains possessing a bovine-like G8 on a DS-1-like background. *Arch. Virol.* 2016; 161(2): 479–82. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2682-x>.
14. Hoa-Tran T.N., Nakagomi T., Vu H.M., Nguyen T.T.T., Takemura T., Hasebe F., et al. Detection of three independently-generated DS-1-like G9P[8] reassortant rotavirus A strains during the G9P[8] dominance in Vietnam, 2016–2018. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 80: 104194. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104194>.
15. Yamamoto S.P., Kaida A., Kubo H., Iritani N. Gastroenteritis outbreaks caused by a DS-1-like G1P[8] rotavirus strain, Japan, 2012–2013. *Emerg. Inf. Dis.* 2014; 20(6): 1030–3. <https://doi.org/10.3201/eid2006.131326>.
16. Veselova O.A., Podkolzin A.T., Petukhov D.N., Kuleshov K.V., Shipulin G.A. Rotavirus group A surveillance and genotype distribution in Russian Federation in seasons 2012–2013. *Int. J. Clin. Med.* 2014; 5(7): 407–13. <https://doi.org/10.4236/ijcm.2014.57055>.
17. 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>.
18. Zhirakovskaia E., Tikunov A., Tyumentsev A., Sokolov S., Sedelnikova D., Tikunova N. Changing pattern of prevalence and genetic diversity of rotavirus, norovirus, astrovirus, and bocavirus associated with childhood diarrhea in Asian Russia, 2009–2012. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 67: 167–82. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.006>.
19. 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>.
20. Новикова Н.А., Фёдорова О.Ф., Епифанова Н.В., Морозова О.В., Фомина С.Г., Луковникова Л.Б. и др. G[P]-типы ротавируса группы А и их распространение в Нижнем Новгороде и Дзержинске в 1997–2005 гг. *Вопросы вирусологии*. 2007; 52(3): 19–23.
21. Епифанова Н.В., Сашина Т.А., Новикова Н.А., Морозова О.В., Фомина С.Г., Луковникова Л.Б. и др. Спектр генотипов ротавирусов, циркулировавших на территории Нижнего Новгорода в 2005–2012 годах. Доминирование генотипа G4P[8]. *Медицинский альманах*. 2014; (2): 52–7.
22. Novikova N.A., Morozova O.V., Fedorova O.F., Epifanova N.V., Sashina T.A., Efimov E.I. Rotavirus infection in children of Nizhny Novgorod, Russia: the gradual change of the virus allele from P[8]-1 to P[8]-3 in the period 1984–2010. *Arch. Virol.* 2012; 157(12): 2405–9. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1426-4>.
23. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Predominance of new G9P[8] rotaviruses closely related to Turkish strains in Nizhny Novgorod (Russia). *Arch. Virol.* 2017; 162(8): 2387–92. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3364-7>.
24. Novikova N.A., Sashina T.A., Epifanova N.V., Kashnikov A.U., Morozova O.V. Long-term monitoring of G1P[8] Rotaviruses circulating without vaccine pressure in Nizhny Novgorod, Russia, 1984–2019. *Arch. Virol.* 2020; 165(4): 865–75. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04553-2>.
25. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Genotype constellations of the rotavirus A strains circulating in Nizhny Novgorod, Russia, 2017–2018. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 85: 104578. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104578>.
26. Morozova O.V., Alekseeva A.E., Sashina T.A., Brusnigina N.F., Epifanova N.V., Kashnikov A.U., et al. Phylodynamics of G4P[8] and G2P[4] strains of rotavirus A isolated in Russia in 2017 based on full-genome analyse. *Virus Genes*. 2020; 56(5): 537–45. <https://doi.org/10.1007/s11262-020-01771-3>.
27. Сашина Т.А., Морозова О.В., Епифанова Н.В., Новикова Н.А. Идентификация I- и E- генотипов ротавируса А с использованием мультиплексной ПЦР. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(3): 140–4. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-140-144>.
28. Mukherjee A., Dutta D., Ghosh S., Bagchi P., Chattopadhyay S., Nagashima S., et al. Full genomic analysis of a human group A rotavirus G9P[6] strain from Eastern India provides evidence for porcine-to-human interspecies transmission. *Arch. Virol.* 2009; 154(5): 733–46. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0363-3>.
29. Ndze V.N., Esona M.D., Achidi E.A., Gonsu K.H., Dóro R., Marton S., et al. Full genome characterization of human Rotavirus A strains isolated in Cameroon, 2010–2011: diverse combinations of the G and P genes and lack of reassortment of the backbone genes. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 28: 537–60. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.009>.
30. Wang Y.H., Pang B.B., Ghosh S., Zhou X., Shintani T., Urushibara N., et al. Molecular epidemiology and genetic evolution of the whole genome of G3P[8] human rotavirus in Wuhan, China, from 2000 through 2013. *PLoS. One*. 2014; 9(3): e88850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088850>.
31. Agbemabiese C.A., Nakagomi T., Doan Y.H., Nakagomi O. Whole genomic constellation of the first human G8 rotavirus strain detected in Japan. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 35: 184–93. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.033>.
32. Rahman M., Matthijnssens J., Yang X., Delbeke T., Arijis I., Taniguchi K., et al. Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses. *J. Virol.* 2007; 81(5): 2382–90. <https://doi.org/10.1128/JVI.01622-06>.
33. Акимкин В.Г., Подколзин А.Т., Денисюк Н.Б., Горелов А.В. Эпидемиологический и молекулярно-генетический мониторинг ротавирусной инфекции в Оренбургском регионе в предвакцинальный период. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; (2): 30–6. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-2-30-36>.
34. Морозова О.В., Сашина Т.А., Новикова Н.А. Обнаружение и молекулярная характеристика reassortантных DS-1-подобных G1P[8] штаммов ротавируса группы А. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(2): 91–6. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-91-96>.
35. Roczo-Farkas S., Cowley D., Bines J.E. Australian Rotavirus Surveillance Program: Annual Report, 2017. *Commun. Dis. Intell.* 2019; 43. <https://doi.org/10.33321/cdi.2019.43.28>.
36. Zeller M., Patton J.T., Heylen E., De Coster S., Ciarlet M., Van Ranst M., et al. Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(3): 966–76. <https://doi.org/10.1128/JCM.05590-11>.
37. Zeller M., Heylen E., Damanka S., Pietsch C., Donato C., Tamura T., et al. Emerging OP354-Like P[8] rotaviruses have rapidly dispersed from Asia to other continents. *Mol. Biol. Evol.* 2015; 32(8): 2060–71. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv088>.
38. Dennis A.F., McDonald S.M., Payne D.C., Mijatovic-Rustempasic S., Esona M.D., Edwards K.M., et al. Molecular epidemiology of contemporary G2P[4] human rotaviruses cocirculating in a single US community: Footprints of a globally transitioning genotype. *J. Virol.* 2014; 88(7): 3789–801. <https://doi.org/10.1128/JVI.03516-13>.

## REFERENCES

- Ogilvie I., Khoury H., Khoury A.C., Goetghebeur M.M. Burden of rotavirus gastroenteritis in the pediatric population in Central and Eastern Europe: serotype distribution and burden of illness. *Hum. Vaccin.* 2011; 7(5): 523–33. <https://doi.org/10.4161/hv.7.5.14819>.
- Burnett E., Parashar U.D., Tate J.E. Real-world effectiveness of rotavirus vaccines, 2006–19: a literature review and meta-analysis. *Lancet. Glob. Health.* 2020; 8(9): e1195–202. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(20\)30262-X](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(20)30262-X).
- Rychkova O.A., Grakhova M.A., Sagitova A.S., Kozhevnikova L.A., Starostina O.V., Kuz'micheva K.P. Rotavirus infection. The possibilities of timely vaccination [Rotavirusnaya infektsiya. Vozmozhnosti svoevremennoy vaksino profilaktiki]. *Meditsinskiy sovet.* 2018; (17): 215–20. <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2018-17-215-219> (in Russian).
- Smirnova S.S., Golubkova A.A., Koltunov S.V. Experience of vaccination against rotavirus gastroenteritis in the Sverdlovsk region [Opyt vaksinatсии protiv rotavirusnogo gastroenterita v Sverdlovskoy oblasti]. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika.* 2018; 17(3): 68–73. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2018-17-3-68-73> (in Russian).
- Feklisova L.V., Shapovalova R.F. The results of the mass immunization program against rotavirus infection of children of the first year of life in a separate territory of the Moscow region [Rezultaty massovoy immunizatsii protiv rotavirusnoy infektsii detey pervogo goda zhizni na otdel'noy territorii Moskovskoy oblasti]. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika.* 2019; 18(4): 75–81. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-4-75-81> (in Russian).
- Martynova G.P., Yuzhakova A.G., Solov'eva I.A., Tret'yakov A.P. Rotavirus infection in children of Krasnoyarsk Region: first steps to reduce the incidence [Rotavirusnaya infektsiya u detey v Krasnoyarskom krae: pervye shagi k snizheniyu zabolevaemosti]. *Far-mateka.* 2016; (11): 45–50 (in Russian).
- Kondakova O.A., Nikitin N.A., Trifonova E.A., Atabekov I.G., Karpova O.V. Rotavirus vaccines: new strategies and approaches [Vaksiny protiv rotavirusa: novye strategii i razrabotki]. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Seriya 16: Biologiya.* 2017; 72(4): 199–208 (in Russian).
- Kozhakhmetova T.A., Kuleshov K.V., Kyasova D.Kh., Konovalova T.A., Parkina N.V., Podkolzin A.T. Assessment of the epidemiological effects of using of the pentavalent rotavirus vaccine at a low level of vaccination coverage of the target cohort [Otsenka epidemiologicheskikh effektivov primeneniya pyativalentnoy rotavirusnoy vaksiny pri nizkom urovne okhvata vaksinatсии tselevoy kogorty]. *Zhurnal infektologii.* 2019; 11(3): 71–76. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2019-11-3-71-76> (in Russian).
- Estes M.K., Greenberg H.B. Rotaviruses. In: Knipe D.M., Howley P. *Fields Virology.* New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2013: 1347–401.
- Bányai K., László B., Duque J., Steele A.D., Nelson E.A., Gentsch J.R., et al. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine.* 2012; 30(Suppl. 1): A122–30. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.111>.
- Matthijnssens J., Ciarlet M., Heiman E., Arijis I., Delbeke T., McDonald S.M., et al. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J. Virol.* 2008; 82(7): 3204–19. <https://doi.org/10.1128/JVI.02257-07>.
- Cowley D., Donato M., Roczo-Farkas S., Kirkwood C.D. Emergence of a novel equine-like G3P[8] inter-genogroup reassortant rotavirus strain associated with gastroenteritis in Australian children. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(2): 403–10. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000352>.
- Hoang-Tran T.N., Nakagomi T., Vu H.M., Do L.P., Gauchan P., Agbembiese C.A., et al. Abrupt emergence and predominance in Vietnam of rotavirus A strains possessing a bovine-like G8 on a DS-1-like background. *Arch. Virol.* 2016; 161(2): 479–82. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2682-x>.
- Hoang-Tran T.N., Nakagomi T., Vu H.M., Nguyen T.T.T., Takemura T., Hasebe F., et al. Detection of three independently-generated DS-1-like G9P[8] reassortant rotavirus A strains during the G9P[8] dominance in Vietnam, 2016–2018. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 80: 104194. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104194>.
- Yamamoto S.P., Kaida A., Kubo H., Iritani N. Gastroenteritis outbreaks caused by a DS-1-like G1P[8] rotavirus strain, Japan, 2012–2013. *Emerg. Inf. Dis.* 2014; 20(6): 1030–3. <https://doi.org/10.3201/eid2006.131326>.
- Veselova O.A., Podkolzin A.T., Petukhov D.N., Kuleshov K.V., Shipulin G.A. Rotavirus group A surveillance and genotype distribution in Russian Federation in seasons 2012–2013. *Int. J. Clin. Med.* 2014; 5(7): 407–13. <https://doi.org/10.4236/ijcm.2014.57055>.
- 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>.
- Zhirakovskaia E., Tikunov A., Tymentsev A., Sokolov S., Sedel'nikova D., Tikunova N. Changing pattern of prevalence and genetic diversity of rotavirus, norovirus, astrovirus, and bocavirus associated with childhood diarrhea in Asian Russia, 2009–2012. *Infect. Genet. Evol.* 2019; 67: 167–82. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.006>.
- 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>.
- Novikova N.A., Fedorova O.F., Epifanova N.V., Morozova O.V., Fomina S.G., Lukovnikova L.B., et al. G[P] type profiles of group A human rotavirus and their distribution in Nizhny Novgorod and Dzerzhinsk in 1997–2005 [G[P]-tipy rotavirusa gruppy A i ikh rasp-rostraneniye v Nizhnem Novgorode i Dzerzhinske v 1997–2005 gg.]. *Voprosy virusologii.* 2007; 52(3): 19–23 (in Russian).
- Epifanova N.V., Sashina T.A., Novikova N.A., Morozova O.V., Fomina S.G., Lukovnikova L.B., et al. The variety of genotypes of rotaviruses in Nizhny Novgorod in 2005–2012. The domination of G4P[8] genotype [Spektr genotipov rotavirusov, tsirkulirovavshikh na territorii Nizhnego Novgoroda v 2005–2012 godakh. Dominirovaniye genotipa G4P[8]]. *Meditsinskiy al'manakh.* 2014; (2): 52–7 (in Russian).
- Novikova N.A., Morozova O.V., Fedorova O.F., Epifanova N.V., Sashina T.A., Efimov E.I. Rotavirus infection in children of Nizhny Novgorod, Russia: the gradual change of the virus allele from P[8]-1 to P[8]-3 in the period 1984–2010. *Arch. Virol.* 2012; 157(12): 2405–9. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1426-4>.
- Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Predominance of new G9P[8] rotaviruses closely related to Turkish strains in Nizhny Novgorod (Russia). *Arch. Virol.* 2017; 162(8): 2387–92. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3364-7>.
- Novikova N.A., Sashina T.A., Epifanova N.V., Kashnikov A.U., Morozova O.V. Long-term monitoring of G1P[8] Rotaviruses circulating without vaccine pressure in Nizhny Novgorod, Russia, 1984–2019. *Arch. Virol.* 2020; 165(4): 865–75. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04553-2>.
- Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Genotype constellations of the rotavirus A strains circulating in Nizhny Novgorod, Russia, 2017–2018. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 85: 104578. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104578>.
- Morozova O.V., Alekseeva A.E., Sashina T.A., Brusnigina N.F., Epifanova N.V., Kashnikov A.U., et al. Phylogenetics of G4P[8] and G2P[4] strains of rotavirus A isolated in Russia in 2017 based on full-genome analyse. *Virus Genes.* 2020; 56(5): 537–45. <https://doi.org/10.1007/s11262-020-01771-3>.
- Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Identification of rotavirus I- and E-genotypes by multiplex PCR method [Identifikatsiya I- i E-genotipov rotavirusa A s ispol'zovaniem mul'tipleksnoy PISR]. *Voprosy virusologii.* 2019; 64(3): 140–4. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-3-140-144> (in Russian).
- Mukherjee A., Dutta D., Ghosh S., Bagchi P., Chattopadhyay S., Nagashima S., et al. Full genomic analysis of a human group A rotavirus G9P[6] strain from Eastern India provides evidence for porcine-to-human interspecies transmission. *Arch. Virol.* 2009; 154(5): 733–46. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0363-3>.
- Ndze V.N., Esona M.D., Achidi E.A., Gonsu K.H., Dóro R., Marton S., et al. Full genome characterization of human Rotavirus A strains isolated in Cameroon, 2010–2011: diverse combinations of the G and P genes and lack of reassortment of the backbone genes.

- Infect. Genet. Evol.* 2014; 28: 537–60. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.009>.
30. Wang Y.H., Pang B.B., Ghosh S., Zhou X., Shintani T., Urushibara N., et al. Molecular epidemiology and genetic evolution of the whole genome of G3P[8] human rotavirus in Wuhan, China, from 2000 through 2013. *PLoS. One.* 2014; 9(3): e88850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088850>.
  31. Agbemabiese C.A., Nakagomi T., Doan Y.H., Nakagomi O. Whole genomic constellation of the first human G8 rotavirus strain detected in Japan. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 35: 184–93. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.033>.
  32. Rahman M., Matthijssens J., Yang X., Delbeke T., Arijs I., Taniguchi K., et al. Evolutionary history and global spread of the emerging G12 human rotaviruses. *J. Virol.* 2007; 81(5): 2382–90. <https://doi.org/10.1128/JVI.01622-06>.
  33. Akimkin V.G., Podkolzin A.T., Denisjuk N.B., Gorelov A.V. Epidemiological and molecular-genetic monitoring of rotavirus infection in the Orenburg region in the period predictively [*Epidemiologicheskii i molekulyarno-geneticheskii monitoring rotavirusnoy infektsii v Orenburgskom regione v predvaksinal'nyy period*]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2019; (2): 30–6. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-2-30-36> (in Russian).
  34. Morozova O.V., Sashina T.A., Novikova N.A. Detection and molecular characterization of reassortant DS-1-like G1P[8] strains of rotavirus A [*Obnaruzheniye i molekulyarnaya kharakteristika reassortantnykh DS-1-podobnykh G1P[8] shtammov rotavirusa gruppy A*]. *Voprosy virusologii.* 2017; 62(2): 91–6. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-91-96> (in Russian).
  35. Roczo-Farkas S., Cowley D., Bines J.E. Australian Rotavirus Surveillance Program: Annual Report, 2017. *Commun. Dis. Intell.* 2019; 43. <https://doi.org/10.33321/cdi.2019.43.28>.
  36. Zeller M., Patton J.T., Heylen E., De Coster S., Ciarlet M., Van Ranst M., et al. Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(3): 966–76. <https://doi.org/10.1128/JCM.05590-11>.
  37. Zeller M., Heylen E., Damanka S., Pietsch C., Donato C., Tamura T., et al. Emerging OP354-Like P[8] rotaviruses have rapidly dispersed from Asia to other continents. *Mol. Biol. Evol.* 2015; 32(8): 2060–71. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv088>.
  38. Dennis A.F., McDonald S.M., Payne D.C., Mijatovic-Rustempasic S., Esona M.D., Edwards K.M., et al. Molecular epidemiology of contemporary G2P[4] human rotaviruses cocirculating in a single US community: Footprints of a globally transitioning genotype. *J. Virol.* 2014; 88(7): 3789–801. <https://doi.org/10.1128/JVI.03516-13>.



## Реактивация инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр (*Herpesviridae: Lymphocryptovirus*, HHV-4), на фоне COVID-19: эпидемиологические особенности

Соломай Т.В.<sup>1,2</sup>, Семенов Т.А.<sup>3,4</sup>, Филатов Н.Н.<sup>2,4</sup>, Ведунова С.Л.<sup>2</sup>, Лавров В.Ф.<sup>2,5</sup>, Смирнова Д.И.<sup>2</sup>, Грачёва А.В.<sup>2</sup>, Файзулов Е.Б.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Межрегиональное управление № 1 Федерального медико-биологического агентства, 123182, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия;

<sup>3</sup>ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия;

<sup>4</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия;

<sup>5</sup>ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993, Москва, Россия

**Введение.** Иммунодефициты, лежащие в основе развития тяжёлых форм новой коронавирусной инфекции, могут быть следствием сочетанного инфицирования SARS-CoV-2 и другими патогенами, в том числе вирусом Эпштейна–Барр (EBV).

**Цель работы** – изучение эпидемиологических особенностей активной EBV-инфекции на фоне COVID-19.

**Материал и методы.** С марта по май 2020 г. в Москве на маркёры EBV-инфекции обследованы пациенты (95 человек), находившиеся в стационаре для лечения COVID-19, и доноры крови (92 человек).

**Результаты.** При сходных показателях превалентности EBV-инфекции в исследуемых группах частота обнаружения индикаторов её активности у доноров (10,9%) была значительно ниже, чем среди пациентов (80%). Достоверные различия по данному параметру установлены также между подгруппами пациентов с интерстициальной пневмонией на фоне наличия (96,6%) либо отсутствия (97,2%) SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки и больных с лёгким течением COVID-19 (43,3%). Средние коэффициенты позитивности IgG к капсидному и ядерному антигенам вируса у доноров были больше, чем в группе пациентов ( $p < 0,05$ ). У больных с маркёрами активной EBV-инфекции значительно чаще выявлялись пневмония, превышение референсных значений активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) и относительного числа моноцитов (отношение шансов – 23,6; 3,5 и 9,7 соответственно).

**Обсуждение.** Настоящее исследование позволило изучить частоту распространения и проанализировать эпидемиологические особенности активной EBV-инфекции у пациентов с COVID-19.

**Заключение.** Значимо более высокая частота обнаружения индикаторов активной EBV-инфекции среди пациентов, находившихся на стационарном лечении по поводу COVID-19 (особенно со среднетяжёлым течением), указывает на сочетанное участие в развитии интерстициальной пневмонии SARS-CoV-2 и EBV. Наличие низких концентраций IgG к белкам последнего является предиктором реактивации вызываемого им инфекционного процесса. Превышение референсных значений активности АЛТ и относительного количества моноцитов у пациентов должно служить поводом к обследованию на маркёры EBV-инфекции.

**Ключевые слова:** вирус Эпштейна–Барр, SARS-CoV-2, COVID-19, сочетанная инфекция, интерстициальная пневмония, аланинаминотрансфераза, моноциты

**Для цитирования:** Соломай Т.В., Семенов Т.А., Филатов Н.Н., Ведунова С.Л., Лавров В.Ф., Смирнова Д.И., Грачёва А.В., Файзулов Е.Б. Реактивация инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр (*Herpesviridae: Lymphocryptovirus*, HHV-4), на фоне COVID-19: эпидемиологические особенности. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(2): 152-161. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-40>

**Для корреспонденции:** Соломай Татьяна Валерьевна, канд. мед. наук, заместитель руководителя, Межрегиональное управление № 1 Федерального медико-биологического агентства, 123182, Москва, Россия. E-mail: [solomay@rambler.ru](mailto:solomay@rambler.ru)

**Участие авторов:** Соломай Т.В. – концепция и дизайн исследования, обобщение и обработка материала, написание текста; Семенов Т.А. – концепция и дизайн исследования, редактирование статьи; Филатов Н.Н. – редактирование статьи; Ведунова С.Л. – проведение лабораторных исследований; Лавров В.Ф. – проведение лабораторных исследований; Смирнова Д.И. – проведение лабораторных исследований; Грачёва А.В. – проведение лабораторных исследований; Файзулов Е.Б. – проведение лабораторных исследований.

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

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

Поступила 19.01.2021  
Принята в печать 16.04.2021

## Reactivation of Epstein–Barr virus (*Herpesviridae: Lymphocryptovirus, HHV-4*) infection during COVID-19: epidemiological features

Tatyana V. Solomay<sup>1,2</sup>, Tatyana A. Semenenko<sup>3,4</sup>, Nikolay N. Filatov<sup>2,4</sup>, Svetlana L. Vedunova<sup>2</sup>, Vyacheslav F. Lavrov<sup>2,3</sup>, Daria I. Smirnova<sup>2</sup>, Anastasiia V. Gracheva<sup>2</sup>, Evgeny B. Faizuloev<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Interregional Department No. 1 of the Federal Medical and Biological Agency, 123182, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>FSBSI «I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 105064, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>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;

<sup>4</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119991, Russia;

<sup>5</sup>FSBEI FPE «Russian Medical Academy of Continuous Professional Education» of the Ministry of Health of Russia, 125993, Moscow, Russia

**Introduction.** Immunodeficiency underlying the development of severe forms of new coronavirus infection may be the result of mixed infection with SARS-CoV-2 and other pathogens, including Epstein–Barr virus (EBV).

**The aim** is to study the prevalence and epidemiological features of co-infection with SARS-CoV-2 and EBV.

**Material and methods.** A cross-sectional randomized study was conducted in Moscow region from March to May 2020. Two groups were examined for EBV-markers: hospital patients ( $n = 95$ ) treated for SARS-CoV-2 infection and blood donors ( $n = 92$ ).

**Results.** With equal EBV prevalence the detection of active infection markers in donors (10.9%) was noticeably lower than in SARS-CoV-2 patients (80%). Significant differences in this indicator were also found when patients from subgroups with interstitial pneumonia with the presence (96.6%) and absence (97.2%) of SARS-CoV-2 in the nasopharyngeal smear were compared with the subgroup of patients with mild COVID-19 (43.3%). The average IgG VCA and IgG EBNA positivity coefficients in donor group were higher than in patient group ( $p < 0.05$ ). Patients with active EBV infection markers were significantly more likely to have pneumonia, exceeding the reference values of ALT and the relative number of monocytes (odds ratio – 23.6; 3.5; 9.7, respectively).

**Discussion.** The present study examined the incidence and analyzed epidemiological features of active EBV infection in patients with COVID-19.

**Conclusion.** A significantly higher rate of detection of active EBV infection markers in hospital patients indicates a combined participation SARS-CoV-2 and EBV in the development of interstitial pneumonia. Low levels of specific IgG EBV serve as predictors of EBV reactivation. Exceeding the reference values of ALT and the relative number of monocytes in patients should serve as a reason for examination for active EBV infection markers.

**Keywords:** Epstein–Barr virus, SARS-CoV-2, COVID-19, co-infection, interstitial pneumonia, alanine aminotransferase, monocytes

**For citation:** Solomay T.V., Semenenko T.A., Filatov N.N., Vedunova S.L., Lavrov V.F., Smirnova D.I., Gracheva A.V., Faizuloev E.B. Reactivation of Epstein–Barr virus (*Herpesviridae: Lymphocryptovirus, HHV-4*) infection during COVID-19: epidemiological features. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(2): 152-161 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-40>

**For correspondence:** Solomay Tatyana Valeryevna, Ph.D. (Med.), Deputy Head, Interregional Department No. 1 of the Federal Medical and Biological Agency, 123182, Moscow. E-mail: [solomay@rambler.ru](mailto:solomay@rambler.ru)

### Information about the authors:

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

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

Filatov N.N., <https://orcid.org/0000-0003-4857-9624>

Vedunova S.L., <https://orcid.org/0000-0002-8992-9080>

Lavrov V.F., <https://orcid.org/0000-0001-7006-506X>

Smirnova D.I., <https://orcid.org/0000-0001-7325-0834>

Gracheva A.V., <https://orcid.org/0000-0001-8428-4482>

Faizuloev E.B., <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

**Contribution:** Solomay T.V. – concept and design of the study, synthesis and processing of the material, writing of the text; Semenenko T.A. – concept and design of the study, editing of the article; Filatov N.N. – editing of the article; Vedunova S.L. – conducting of the laboratory studies; Lavrov V.F. – conducting of the laboratory studies; Smirnova D.I. – conducting of the laboratory studies; Gracheva A.V. – conducting of the laboratory studies; Faizuloev E.B. – conducting of the laboratory studies.

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

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

Received 19 January 2021

Accepted 16 April 2021

## Введение

Эпидемиологическая ситуация, вызванная распространением нового коронавируса в 2020 г., поставила перед органами здравоохранения большинства стран мира множество вопросов, на ряд из которых ответы

до сих пор не найдены. До декабря 2019 г. возбудители острых респираторных вирусных инфекций вызывали в период сезонного подъема только локальные эпидемические вспышки, а в остальное время года регистрировалась спорадическая заболеваемость. По-

явление нового инфекционного агента, получившего название SARS-CoV-2, привело к его экспансии, принявшей характер пандемии. Человечество столкнулось с новой глобальной проблемой, потребовавшей для своего решения комплексного подхода.

В настоящее время учёными всего мира проводятся исследования по выявлению и оценке особенностей эпидемического распространения SARS-CoV-2, патогенетических механизмов взаимодействия его с организмом хозяина, изучению иммунного ответа на внедрение патогена, разработке средств специфической профилактики COVID-19. Установлено, что источниками инфекции являются больные и бессимптомные носители вируса, а заражение происходит преимущественно воздушно-капельным путём. Инкубационный период в среднем составляет 6 (от 2 до 14) сут [1]. В эпидемический процесс вовлекаются все возрастные группы населения с преобладанием в структуре лиц 40–59 (35,7%) и 19–39 лет (30,8%) [2].

По опубликованным данным заболевание в лёгкой форме переносят около 80% пациентов. Тяжесть определяется наличием пневмонии, которая развивается в 5–10% случаев и может сопровождаться дыхательной и полиорганной недостаточностью. Факторами риска осложнённого течения считаются возраст, наличие хронических сердечно-сосудистых (в том числе артериальной гипертензии) и лёгочных заболеваний, а также иммунодефицита [1, 3–6].

Нарушение иммунологической реактивности, лежащее в основе развития тяжёлых форм новой коронавирусной инфекции, может быть первичным (генетически обусловленным) либо вторичным – приобретённым вследствие воздействия на организм человека негативных факторов химической, физической и биологической природы. В перечень возбудителей, способствующих возникновению иммунодефицитных состояний вторичного характера, входят в первую очередь вирусы иммунодефицита человека (ВИЧ), герпеса (human herpesvirus, HHV), вирусы гепатитов В (hepatitis B virus, HBV) и С (hepatitis C virus, HCV) и др. [7–10]. Длительная персистенция перечисленных микроорганизмов создаёт основу для наслоения на имеющийся инфекционный процесс вызванной SARS-CoV-2 новой коронавирусной инфекции. Это может привести к синергизму вследствие транскриптно-протеомного сходства инфектов, определяющего единые патогенетические механизмы взаимодействия с организмом хозяина. Так, проведённые исследования выявили пептидное (иммуноэпитопное) родство протеинов нового коронавируса с белками других агентов – в частности, вирусов Эпштейна–Барр (Epstein–Barr virus, EBV) (*Herpesviridae: Lymphocryptovirus*, HHV-4), простого герпеса 1 типа (HSV-1, или HHV-1), гриппа А (H1N1), ВИЧ, а также *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus*. Сделан вывод о том, что именно эти патогены на фоне сочетания с COVID-19 способны усугублять её течение за счёт общих патогенетических точек приложения [11–13].

В то же время в доступной литературе практически отсутствуют сведения об эпидемиологии коинфекций, вызванных SARS-CoV-2 совместно с другими патогенами. Особую актуальность в этой связи представляет микст-инфекция с EBV, который имеет убиквитарное распространение, а маркёры хронической EBV-инфекции выявляются более чем у 90% населения планеты [14]. Важно отметить, что экспансия нового коронавируса в Российской Федерации, включая столичный регион (г. Москва и Московская область), пришлась на максимально высокие за весь период наблюдения многолетние уровни заболеваемости инфекционным мононуклеозом и совпала по времени с её сезонным подъёмом [2, 15, 16].

Целью настоящего исследования стало изучение эпидемиологических особенностей активной EBV-инфекции на фоне COVID-19.

### Материал и методы

В период с марта по май 2020 г. проведено поперечное рандомизированное исследование, в которое вошли лица обоего пола, постоянно проживающие на территории г. Москвы и Московской области, в возрасте от 18 до 60 лет, предоставившие письменное добровольное информированное согласие на выполнение соответствующих обследований. Сформированы 2 группы, сопоставимые между собой по полу и возрасту. В первую (пациенты) включены 95 человек, находившихся в стационаре с целью лечения новой коронавирусной инфекции, у которых ретроспективно были выявлены антитела (АТ) класса IgG к SARS-CoV-2. Вторую группу (доноры крови) составили 92 участника, допущенные до донации по результатам лабораторно-инструментального и клинического обследования в соответствии с требованиями действующих нормативных правовых актов.

Группа пациентов дополнительно разделена на три подгруппы:

1-я – 30 человек с лёгкой формой болезни (острый назофарингит), у которых в мазке из носоглотки обнаружена РНК SARS-CoV-2;

2-я – 29 больных со среднетяжёлым течением (интерстициальная пневмония без дыхательной недостаточности) и фоне детекции нуклеиновой кислоты SARS-CoV-2;

3-я – 36 участников со среднетяжёлым течением (интерстициальная пневмония без дыхательной недостаточности) с отрицательными результатами определения генетического материала нового коронавируса в мазке из носоглотки.

Лицам из 1-й и 2-й групп выполнены стандартное клиническое и биохимическое исследование крови, результаты которого у пациентов оценивались на момент поступления в стационар (на 3-и–7-е сут от первых клинических проявлений), а также определение маркёров HBV-, HCV- и ВИЧ-инфекций. У всех включённых в протокол указанные маркёры не обнаружены.

Наличие пневмонии в группе пациентов устанавливали по результатам многослойной (мультиспиральной) компьютерной томографии, дыхательной недо-

статочности – по насыщению (сатурации) артериальной крови кислородом, которая у всех исследуемых превышала 95%.

Все участники обследованы на наличие:

- РНК SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки;
- ДНК EBV в сыворотке крови;
- АТ класса IgM к капсидному (viral capsid antigen, VCA) антигену EBV (IgM VCA);
- АТ класса IgG к VCA, раннему (early antigen, EA) и ядерному (Epstein–Barr nuclear antigen, EBNA) антигенам EBV.

Кроме того, дополнительно проведено исследование авидности АТ IgG к VCA.

Каждый пациент обследован на наличие РНК SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки не менее 2 раз: до начала стационарного лечения и спустя 10–14 сут. При выявлении РНК SARS-CoV-2 на фоне клинической симптоматики исследуемый рассматривался как больной с лабораторно подтверждённой новой коронавирусной инфекцией (код по МКБ-10 – U07.1 Коронавирусная инфекция COVID-19, вирус идентифицирован). В случае отсутствия генетического материала, но при наличии характерных для данной нозологии клинических проявлений устанавливался диагноз «коронавирусная инфекция COVID-19, вирус не идентифицирован» (U07.2 по МКБ-10).

Обследование на маркёры активности инфекционного процесса, вызванного EBV, выполняли на 10–21-е сут от момента появления первых клинических симптомов. Присутствие анти-EBNA АТ класса IgG в сыворотке крови указывало на наличие паст-инфекции. При выявлении на фоне наличия АТ IgG к EBNA также и низкоавидных анти-VCA АТ IgG (индекс авидности <60%) состояние расценивалось как ранняя паст-инфекция. В случаях обнаружения ДНК EBV, АТ IgM к VCA, АТ IgG к EA либо их сочетания на фоне наличия/отсутствия анти-EBNA АТ IgG констатировалась активная EBV-инфекция (острая или реактивация).

Детекцию генетического материала вирусов методикой полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени осуществляли с помощью следующих комплектов реагентов в соответствии с протоколами производителей:

– набор для выявления РНК SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени «РеалБест РНК SARS-CoV-2» («Вектор-Бест», Россия);

– набор для выявления и количественного определения ДНК EBV «АмплиСенс EBV-скрин/монитор-FL» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия).

Для обнаружения специфических АТ классов IgM и IgG к EBV методом иммуноферментного анализа (ИФА) использовали соответствующие комплекты реагентов согласно инструкциям производителей («Вектор-Бест»).

Концентрацию АТ IgG к VCA и EBNA оценивали по коэффициенту позитивности (КП), представляющему собой отношение оптической плотности исследуемого образца к аналогичной критической величине.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием таблиц Microsoft Excel 2019. Рассчитывали частоту выявления маркёров реактивации инфекции, вызванной EBV, и ранней паст-инфекции, средние коэффициенты позитивности АТ IgG к VCA и EBNA, средние уровни активности аланин-аминотрансферазы (АЛТ) и содержания билирубина (мкмоль/л) в сыворотке крови (Ед/л), а также среднее значение относительного числа моноцитов в венозной крови (%). Для определения границ доверительных интервалов (ДИ) вычисляли ошибки указанных показателей. Различия считали достоверными при доверительной вероятности 95% и статистической значимости  $p < 0,05$ .

В целях количественного описания тесноты связи признаков проводили расчёт отношения шансов (ОШ) выявления повышенных значений активности АЛТ (>41 Ед/л), уровня билирубина (>17 мкмоль/л), относительного числа моноцитов (>10%) и развития пневмонии у пациентов с маркёрами реактивации EBV-инфекции и без них методом четырёхпольной таблицы:

$$\text{ОШ} = A \times D / B \times C \quad (1),$$

где А – наличие признака у пациентов с маркёрами реактивации; В – отсутствие признака у пациентов с маркёрами реактивации; С – наличие признака у пациентов без реактивации; D – отсутствие признака у пациентов без реактивации.

Значимость показателя ОШ оценивали путём определения границ 95% ДИ. Различия считали статистически значимыми ( $p < 0,05$ ) в случае, если последний не включал в себя единицу.

## Результаты

Частота детекции маркёров ранее перенесённой EBV-инфекции (АТ IgG к EBNA) в исследуемых группах не имела достоверных различий и составила 97,9% (95% ДИ: 95,0–100,8) у пациентов и 95,7% (95% ДИ: 91,5–99,9) среди доноров. Индикаторы ранней EBV-паст-инфекции (низкоавидные АТ IgG к VCA) не выявлены в группе доноров и в подгруппе больных с лёгким течением с наличием РНК SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки. В целом у пациентов они обнаруживались в 6,3% (95% ДИ: 1,4–11,2) случаев, в том числе среди имевших среднетяжёлое течение с наличием РНК SARS-CoV-2 (3,4%; 95% ДИ: 0,0–10,1) либо её отсутствием (13,9%; 95% ДИ: 2,4–25,4).

Маркёры активной EBV-инфекции в группе доноров определялись в 10,9% случаев (95% ДИ: 4,5–17,3). Для пациентов эта величина была достоверно выше как в целом (80%; 95% ДИ: 71,9–88,1), так и в каждой из подгрупп (**табл. 1**). Среди пациентов со среднетяжёлыми формами COVID-19 на фоне наличия РНК SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки и её отсутствия межгрупповые показатели частоты обнаружения индикаторов активности EBV-инфекции существенно не отличались, но при этом значимо превышали таковые для больных с лёгким течением. Во всех этих случаях в крови выявлялись также анти-EBNA АТ класса IgG.

Обращает на себя внимание тот факт, что из маркёров, указывающих на активную EBV-инфекцию, у доноров достоверно чаще обнаруживался генетический материал этого вируса (9,8%; 95% ДИ: 3,7–15,9) по сравнению с пациентами (1,1%; 95% ДИ: 0,0–3,2). У последних, в свою очередь, во много раз чаще выявлялись серологические маркёры – АТ IgM к VCA (70,5%; 95% ДИ: 61,3–79,7) и IgG к EA (56,8%; 95% ДИ: 46,8–66,8) по сравнению с донорами – 0,0 и 2,2% (95% ДИ: 0,0–5,2) соответственно.

Анализ средних КП анти-VCA и анти-EBNA АТ IgG продемонстрировал, что среди доноров оба этих показателя значимо выше, чем в группе пациентов в целом и во всех её подгруппах. Исключение составляет средний КП анти-EBNA АТ IgG у больных с лёгкими формами на фоне присутствия РНК SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки, существенно не отличающийся от такового у доноров (табл. 2).

Не выявлено достоверных различий между средними КП анти-VCA и анти-EBNA АТ IgG в группе доноров и в подгруппах больных со среднетяжёлым

течением как с наличием, так и с отсутствием РНК SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки. Напротив, у пациентов в целом и в подгруппе имеющих лёгкое течение при наличии генетического материала нового коронавируса средний КП анти-VCA АТ IgG оказался значимо ниже аналогичного показателя для EBNA.

Пневмония у пациентов с индикаторами активной EBV-инфекции выявлялась с частотой 81,6% (95% ДИ: 72,8–90,4), а среди не имеющих их – значимо реже (15,8%; 95% ДИ: 0,0–32,6). Значение ОИШ составило 23,6, что при 95% ДИ: 6,0–92,3 статистически достоверно.

Анализ средних уровней активности АЛТ в сыворотке крови показал превышение их над стандартными референсными значениями для взрослых (до 41 Ед/л) в группе пациентов – 66,3 Ед/л (95% ДИ: 38,5–94,1) за счёт подгрупп со среднетяжёлым течением при наличии нуклеиновой кислоты SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки (43,7 Ед/л) (95% ДИ: 38,0–49,4) и её отсутствии (81,8 Ед/л) (95% ДИ: 44,4–119,2) (табл. 3).

Таблица 1. Частота выявления лиц с маркёрами активной EBV-инфекции

Table 1. Frequency of detection of persons with markers of active EBV infection

Группа/подгруппа Group/subgroup		Обнаружены на фоне наличия антител IgG к EBNA Detected in the presence of IgG antibodies to EBNA			Всего лиц с маркёрами активной EBV-инфекции Total, persons with markers of active EBV infection
		ДНК EBV EBV DNA	Антитела IgM к VCA IgM antibodies to VCA	Антитела IgG к EA IgG antibodies to EA	
Лёгкое течение с наличием РНК SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки (n = 30) Mild course with the presence of SARS-CoV-2 RNA in a nasopharyngeal smear (n = 30)	Количество, n Number, n	0	11	6	13
	%	0,0	36,7	20,0	43,3
	95% ДИ 95% CI	–	19,2–54,2	5,4–34,6	25,3–61,3
Среднетяжёлое течение с наличием РНК SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки (n = 29) Moderate course with the presence of SARS-CoV-2 RNA in a nasopharyngeal smear (n = 29)	Количество, n Number, n	1	26	19	28
	%	3,4	89,7	65,5	96,6
	95% ДИ 95% CI	0,0–10,1	78,4–101,0	47,9–83,1	89,9–103,3
Среднетяжёлое течение с отсутствием РНК SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки (n = 36) Moderate course with no SARS-CoV-2 RNA in a nasopharyngeal smear (n = 36)	Количество, n Number, n	0	30	29	35
	%	0,0	83,3	80,6	97,2
	95% ДИ 95% CI	–	71,0–95,6	67,5–93,7	91,8–102,6
Всего, пациенты (n = 95) Total, patients (n = 95)	Количество, n Number, n	1	67	54	76
	%	1,1	70,5	56,8	80,0
	95% ДИ 95% CI	0,0–3,2	61,3–79,7	46,8–66,8	71,9–88,1
Всего, доноры крови (n = 92) Total, blood donors (n = 92)	Количество, n Number, n	9	0	2	10
	%	9,8	0,0	2,2	10,9
	95% ДИ 95% CI	3,7–15,9	–	0,0–5,2	4,5–17,3

Примечание. ДИ – доверительный интервал.

Note. CI is a confidence interval.

Таблица 2. Средние значения коэффициентов позитивности антител IgG к VCA и EBNA

Table 2. Average values of anti-VCA and anti-EBNA IgG antibodies positivity coefficients

Группа Group		Коэффициент позитивности Positivity coefficient	
		Антитела IgG к VCA IgG antibodies to VCA	Антитела IgG к EBNA IgG antibodies to EBNA
Лёгкое течение с наличием РНК SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки ( $n = 30$ ) Mild course with the presence of SARS-CoV-2 RNA in a nasopharyngeal smear ( $n = 30$ )	Среднее значение Average value	22,2	26,0
	95% ДИ 95% CI	20,8–23,6	24,4–27,6
Среднетяжёлое течение с наличием РНК SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки ( $n = 29$ ) Moderate course with the presence of SARS-CoV-2 RNA in a nasopharyngeal smear ( $n = 29$ )	Среднее значение Average value	18,7	20,4
	95% ДИ 95% CI	16,9–20,5	16,7–24,1
Среднетяжёлое течение с отсутствием РНК SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки ( $n = 36$ ) Moderate course with no SARS-CoV-2 RNA in a nasopharyngeal smear ( $n = 36$ )	Среднее значение Average value	18,7	21,9
	95% ДИ 95% CI	16,7–20,7	20,0–23,8
Всего, пациенты ( $n = 95$ ) Total, patients ( $n = 95$ )	Среднее значение Average value	19,8	22,7
	95% ДИ 95% CI	18,8–20,8	21,1–24,3
Всего, доноры крови ( $n = 92$ ) Total, blood donors ( $n = 92$ )	Среднее значение Average value	46,5	35,6
	95% ДИ 95% CI	34,6–58,4	27,4–43,8

Примечание. ДИ – доверительный интервал.

Note. CI is a confidence interval.

Таблица 3. Средние уровни активности аланинаминотрансферазы, содержания билирубина и относительного числа моноцитов

Table 3. Average levels of alanine aminotransferase, bilirubin and relative number of monocytes

Группа Group		Аланинамино- трансфераза (Ед/л) Alanine aminotransferase (IU/l)	Билирубин (мкмоль/л) Bilirubin ( $\mu\text{mol/l}$ )	Относительное число моноцитов (%) Relative number of monocytes (%)
Лёгкое течение с наличием РНК SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки ( $n = 30$ ) Mild course with the presence of SARS-CoV-2 RNA in a nasopharyngeal smear ( $n = 30$ )	Средний уровень Average level	26,3	9,5	8,4
	95% ДИ 95% CI	21,6–31,0	7,7–11,3	7,0–9,8
Среднетяжёлое течение с наличием РНК SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки ( $n = 29$ ) Moderate course with the presence of SARS-CoV-2 RNA in a nasopharyngeal smear ( $n = 29$ )	Средний уровень Average level	43,7	12,2	12,3
	95% ДИ 95% CI	38,0–49,4	10,3–14,1	10,9–13,7
Среднетяжёлое течение с отсутствием РНК SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки ( $n = 36$ ) Moderate course with no SARS-CoV-2 RNA in a nasopharyngeal smear ( $n = 36$ )	Средний уровень Average level	81,8	11,6	12,5
	95% ДИ 95% CI	44,4–119,2	10,0–13,2	11,3–13,7
Всего, пациенты ( $n = 95$ ) Total, patients ( $n = 95$ )	Средний уровень Average level	66,3	11,1	11,2
	95% ДИ 95% CI	38,5–94,1	10,1–12,1	10,4–12,0
Всего, доноры крови ( $n = 92$ ) Total, blood donors ( $n = 92$ )	Средний уровень Average level	17,5	9,5	5,4
	95% ДИ 95% CI	16,1–18,9	8,9–10,1	3,0–7,8

Примечание. ДИ – доверительный интервал.

Note. CI is a confidence interval.

Самая низкая средняя величина активности АЛТ зафиксирована у доноров – 17,5 Ед/л (95% ДИ: 16,1–18,9), при этом различия с аналогичными показателями группы пациентов и каждой из её подгрупп досто-

верны ( $p < 0,05$ ). Несмотря на то что среднее значение указанного параметра в подгруппе больных с лёгкими формами на фоне наличия РНК SARS-CoV-2 достоверно превышало таковое у доноров, оно оказалось

значимо ниже, чем для имеющих среднетяжёлое течение в случае наличия или отсутствия нуклеиновой кислоты данного вируса. Из 76 пациентов с маркерами активной EBV-инфекции превышение референсного значения активности этого фермента выявлено у 42, а из 19 больных без них – только у 5. ОШ составило 3,5, что при 95% ДИ: 1,13–10,6 является статистически значимым и свидетельствует о достоверно более высоком шансе превышения референсного значения у пациентов с индикаторами активности выработанной EBV инфекции.

Средний уровень билирубина сыворотки у пациентов (11,1 мкмоль/л) (95% ДИ: 10,1–12,1) в несколько раз превышал значение в группе доноров – 9,5 мкмоль/л (95% ДИ: 8,9–10,1), однако различия в этом случае недостоверны (табл. 3). Не выявлены также статистически значимые отличия между данными показателями в каждой из подгрупп пациентов. Однако в подгруппе со среднетяжёлым течением COVID-19 на фоне наличия РНК SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки эта величина составила 12,2 мкмоль/л (95% ДИ: 10,3–14,1), что достоверно выше, нежели в группе доноров. Среди пациентов с маркерами активной EBV-инфекции повышенные уровни билирубина (>17 мкмоль/л) зарегистрированы у 9 человек, без них – у 2. Шансы обнаружения повышенных показателей содержания билирубина у лиц с индикаторами активной EBV-инфекции и без таковых оказались равными (ОШ = 1,1; 95% ДИ: 0,2–5,8 – ДИ включает единицу; различия недостоверны).

Среднее значение относительного числа моноцитов было наиболее низким среди доноров – 5,4% (95% ДИ: 3,0–7,8) и в подгруппе пациентов с лёгкими формами на фоне присутствия РНК возбудителя COVID-19 в мазке из носоглотки (8,4%) (95% ДИ: 7,0–9,8), при этом различия также недостоверны (табл. 3). Значимо более высокие показатели выявлены среди пациентов в целом (11,2%) (95% ДИ: 10,4–12,0) и у имеющих среднетяжёлое течение как с наличием РНК SARS-CoV-2 – 12,3% (95% ДИ: 10,9–13,7), так и с её отсутствием – 12,5% (95% ДИ: 11,3–13,7). Доля лиц с относительным моноцитозом (>10%) была достоверно выше среди пациентов с маркерами активной EBV-инфекции – 49 человек по сравнению с не имеющими их (3 участника; ОШ = 9,7 (95% ДИ: 2,6–36,2).

### Обсуждение

Предшествующая массовому распространению SARS-CoV-2 эпидемиологическая ситуация по инфекции, вызываемой EBV, по всей видимости, способствовала созданию благоприятной основы для развития пандемии, что обусловлено в первую очередь снижением иммунологической реактивности в популяции [17]. Настоящее исследование позволило изучить частоту распространения и проанализировать эпидемиологические особенности активной EBV-инфекции у пациентов с COVID-19.

Так, несмотря на равнозначные уровни серопревалентности EBV по такому показателю, как АТ IgG к EBNA, в группе пациентов достоверно чаще, чем

среди условно здоровых лиц (доноры), выявлялись серологические маркёры активной EBV-инфекции. Более частое выявление генетического материала её возбудителя в крови доноров можно объяснить произвольным выбором момента обследования, не сопряжённым с какими-либо клиническими проявлениями болезни. У пациентов же с реактивацией EBV-инфекции имело место предшествовавшее инфицирование SARS-CoV-2, которое, наиболее вероятно, сыграло роль триггера. При этом периода времени от появления первых клинических симптомов заболевания до забора крови (10–21 сут) в группе пациентов было достаточно для исчезновения ДНК EBV и выработки анти-VCA АТ класса IgM и анти-EA АТ IgG. Однако данный срок оказался малым с точки зрения значимого увеличения концентрации АТ класса IgG к VCA и тем более – к EBNA. Именно поэтому средние КП указанных маркёров среди пациентов достоверно меньше, чем у доноров, а средний КП анти-VCA АТ IgG, определённый у пациентов, – значимо ниже аналогичного показателя для АТ IgG к EBNA (в группе доноров различия между указанными показателями недостоверны). Дополнительным подтверждением полученных результатов является выявление отсутствующих у доноров низкоавидных анти-VCA АТ IgG в группе пациентов.

Предположение о том, что наличие SARS-CoV-2 служит благоприятным фоном для EBV-инфекции, подтверждается результатами других исследований. Так, у 18 пациентов, находившихся в отделении интенсивной терапии по поводу тяжёлой COVID-19-ассоциированной пневмонии с дыхательной недостаточностью, на протяжении первых дней болезни в 78% случаев в крови детектирована ДНК EBV. В дальнейшем динамическое обследование не проводилось [18]. В другой работе установлено, что у пациента с EBV-обусловленной лимфомой, имевшего SARS-CoV-2-пневмонию, в разгар последней наблюдалось резкое транзитное снижение количества плазматических копий ДНК EBV с последующим нарастанием после разрешения пневмонии [19]. Приведённые факты подтверждают важность выбора временной точки для обнаружения генетического материала данного вируса в крови пациентов с COVID-19 в период непродолжительной вирусемии. Тем не менее ни в одном из ранее опубликованных исследований не приводятся сведения о частоте выявления серологических маркёров EBV у больных новой коронавирусной инфекцией.

Кроме того, настоящая работа показала, что более низкие уровни АТ IgG к VCA и EBNA в крови пациентов ассоциированы как с самим фактом SARS-CoV-2-инфекции, так и с развитием интерстициальной пневмонии. Существует достаточно доказательств возникновения её при моноинфицировании новым коронавирусом [17, 20] или EBV [21, 22]. Пептидное сходство данных возбудителей способно инициировать иммунную защиту против одного вируса при развитии острого инфекционного процесса, вызванного другим [11, 12]. По всей вероятности, частые

реактивации EBV-инфекции, поддерживающие высокие концентрации анти-VCA и анти-EBNA AT класса IgG, в определённой степени обеспечивают защиту от иных патогенов со сходными белковыми структурами. Напротив, низкие уровни специфических AT IgG к EBV (КП анти-VCA IgG <34,6 и анти-EBNA IgG <27,4) определяют реактивацию EBV-инфекции при инфицировании новым коронавирусом. Аналогичные взаимодействия были описаны между EBV и вирусом гриппа А: наличие активированных последним большого пула Т-клеток памяти определяло более тяжёлое клиническое течение процесса, вызванного EBV [23]. Ещё в одном исследовании продемонстрировано, что лица молодого возраста с предшествующей острой EBV-инфекцией в 2 раза реже по сравнению с серонегативными к вызывающему её возбудителю переносили острые респираторные заболевания [24].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у включённых в исследование новая коронавирусная инфекция без присутствия EBV протекала преимущественно в лёгкой форме с преобладанием поражения верхних дыхательных путей. Возникновению пневмонии в большинстве случаев способствовало наличие активной EBV-инфекции, подтверждавшейся обнаружением серологических и молекулярно-биологических маркёров. Другими авторами описаны единичные случаи вызванной SARS-CoV-2 и EBV микст-инфекции [18, 19, 25, 26], однако отсутствие надлежащей выборки не позволило проанализировать эпидемиологические особенности активной EBV-инфекции у пациентов с COVID-19 лёгкой и средней степени тяжести, что было сделано нами впервые.

В последнее время в научных публикациях активно обсуждается факт поражения печёночных клеток SARS-CoV-2 [27–29]. Приводятся данные о том, что у пациентов с COVID-19 наличие биохимических признаков поражения гепатоцитов ассоциировано с большей тяжестью течения заболевания [30, 31]. Наряду с этим выдвигаются предположения, что картина повреждения печени при новой коронавирусной инфекции не связана с действием её возбудителя [30] и может быть обусловлена побочным эффектом используемых лекарственных препаратов [32, 33], либо микст-инфекцией, в частности с участием HBV [28]. Необходимо отметить, что EBV наряду с HBV и HCV также обладает тропностью к печёночной ткани и способен изменять показатели активности АЛТ и содержания билирубина в крови [7, 8]. В настоящем исследовании впервые продемонстрировано, что повышение активности этого фермента может быть использовано в качестве критерия, указывающего не только на более тяжёлое клиническое течение болезни, но прежде всего на сочетание наличия SARS-CoV-2 и активной EBV-инфекции. Гипербилирубинемия также указывает на поражение печени, однако этот параметр в данном случае оказался менее специфичным по сравнению с АЛТ. Кроме того, одним из наиболее характерных лабораторных признаков активной EBV-инфекции служит моноцитоз. Относительное увеличение количества моноци-

тов наряду с повышенным уровнем активности АЛТ должно стать поводом для обследования на маркёры активности EBV-инфекции с целью корректировки тактики ведения больного.

### Заключение

Таким образом, достоверно более высокая частота выявления индикаторов активности EBV-инфекции у находившихся на стационарном лечении в связи с COVID-19, особенно у лиц со среднетяжёлым течением последней, указывает на сочетанную роль SARS-CoV-2 и EBV в развитии интерстициальной пневмонии.

Полученные в ходе исследования результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Маркёры активной EBV-инфекции выявляются у 80% (95% ДИ: 71,9–88,1) лиц, находящихся на стационарном лечении по поводу SARS-CoV-2, в том числе у 43,3% (95% ДИ: 25,3–61,3) имеющих лёгкое течение с наличием РНК SARS-CoV-2 в мазке из носоглотки, у 96,6% (95% ДИ: 89,9–103,3) пациентов со среднетяжёлыми формами на фоне наличия РНК SARS-CoV-2 и у 97,2% (95% ДИ: 91,8–102,6) – со среднетяжёлым течением в случае отсутствия вирусного генетического материала.

2. У участников исследования вызванная SARS-CoV-2 моноинфекция протекала преимущественно в лёгкой форме. Тяжесть клинических проявлений, выражавшуюся в развитии интерстициальной пневмонии, определяло наличие у пациентов с COVID-19 активной EBV-инфекции (ОШ возникновения интерстициальной пневмонии у пациентов с маркёрами активности EBV-инфекции и без них составляет 23,6 (95% ДИ: 6,0–92,3).

3. Инфицирование SARS-CoV-2 является триггером репродукции EBV в клетках хозяина. Наличие низких концентраций специфических AT класса IgG к белковым структурам EBV (КП анти-VCA AT IgG <34,6; КП анти-EBNA AT IgG <27,4) служит предиктором реактивации EBV-инфекции.

4. Превышение референсных значений активности АЛТ и относительного содержания моноцитов у пациентов, находящихся на лечении в стационаре по поводу COVID-19, может быть использовано в качестве критерия, указывающего не только на более тяжёлое клиническое течение заболевания, но в первую очередь на сочетание присутствия SARS-CoV-2 и активной EBV-инфекции и должно служить поводом к обследованию на маркёры последней с целью коррекции тактики ведения пациента.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Salzberger B., Buder F., Lampl B., Ehrenstein B., Hitzentichler F., Hanses F. Epidemiology of SARS-CoV-2 infection and COVID-19. *Internist (Berl)*. 2020; 61(8): 782–8. <https://doi.org/10.1007/s00108-020-00834-9> (in German).
2. Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Семенов Т.А., Плоскирева А.А., Дубоделов Д.В., Тиванова Е.В., и др. Гендерно-возрастная характеристика пациентов с COVID-19 на разных этапах эпидемии в Москве. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (3): 27–35. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-27-35>.
3. Акимкин В.Г., Кузин С.Н., Семенов Т.А., Шипулина О.Ю., Яцышина С.Б., Тиванова Е.В., и др. Закономерности эпиде-

- мического распространения SARS-CoV-2 в условиях мегаполиса. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(4): 203–11. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-203-211>.
4. Xiong Y., Sun D., Liu Y., Fan Y., Zhao L., Li X., et al. Clinical and high-resolution CT features of the COVID-19 infection: comparison of the initial and follow-up changes. *Invest. Radiol.* 2020; 55(6): 332–9. <https://doi.org/10.1097/RLI.0000000000000674>.
  5. Zhao D., Yao F., Wang L., Zheng L., Gao Y., Ye J., et al. A comparative study on the clinical features of COVID-19 pneumonia to other pneumonias. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15): 756–61. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa247>.
  6. Коган Е.А., Березовский Ю.С., Проценко Д.Д., Багдасарян Т.Р., Грецов Е.М., Демура С.А., и др. Патологическая анатомия инфекции, вызванной SARS-CoV-2. *Судебная медицина*. 2020; 6(2): 8–30. <https://doi.org/10.19048/2411-8729-2020-6-2-8-30>.
  7. Соломай Т.В., Семеновко Т.А., Иванова М.Ю. Роль Эпштейна–Барр вирусной инфекции и гепатитов В и С в патологии печени. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(5): 215–20. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-215-220>.
  8. Соломай Т.В., Семеновко Т.А. Вирусные гепатиты В, С и инфекционный мононуклеоз: эпидемиологическое сходство и различия. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(1): 27–34. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-27-34>.
  9. Na I.K., Buckland M., Agostini C., Edgar J.D.M., Friman V., Michallet M., et al. Current clinical practice and challenges in the management of secondary immunodeficiency in hematological malignancies. *Eur. J. Haematol.* 2019; 102(6): 447–56. <https://doi.org/10.1111/ejh.13223>.
  10. Chinen J., Shearer W.T. Secondary immunodeficiencies, including HIV infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 125(2 Suppl. 2): 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.08.040>.
  11. Харченко Е.П. Коронавирус SARS-Cov-2: сложности патогенеза, поиски вакцин и будущие пандемии. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2020; 19(3): 4–20. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-3-4-20>.
  12. Vavougiou G.D. Overlapping host pathways between SARS-CoV-2 and its potential copathogens: An in silico analysis. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 86: 104602. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104602>.
  13. Nieto-Moro M., Ecclesia F.G., Tomé-Masa I., De Lama Caro-Patón G., Nieto-Gordillo I., Cabrero-Hernández M., et al. SARS-CoV-2 and *Streptococcus pneumoniae* coinfection as a cause of severe pneumonia in an infant. *Pediatr. Pulmonol.* 2020; 55(9): 2198–200. <https://doi.org/10.1002/ppul.24916>.
  14. Соломай Т.В., Семеновко Т.А., Каражас Н.В., Рыбалкина Т.Н., Корниенко М.Н., Бошняк Р.Е., и др. Оценка риска инфицирования герпесвирусами при переливании донорской крови и её компонентов. *Анализ риска здоровью*. 2020; (2): 135–42. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2020.2.15.eng>.
  15. Соломай Т.В. Многолетняя динамика заболеваемости и территориальное распространение инфекционного мононуклеоза. *Здравоохранение Российской Федерации*. 2019; 63(4): 186–92. <https://doi.org/10.18821/0044-197X-2019-63-4-186-192>.
  16. Соломай Т.В., Филатов Н.Н. Сезонность инфекции, вызванной вирусом Эпштейна–Барр. *Журнал инфектологии*. 2020; 12(4): 93–100. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2020-12-4-93-100>.
  17. Taylor G.S., Long H.M., Brooks J.M., Rickinson A.B., Hislop A.D. The immunology of Epstein–Barr virus-induced disease. *Annu. Rev. Immunol.* 2015; 33: 787–821. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112326>.
  18. Lehner G.F., Klein S.J., Zoller H., Peer A., Bellmann R., Joannidis M. Correlation of interleukin-6 with Epstein–Barr virus levels in COVID-19. *Crit. Care.* 2020; 24(1): 657. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03384-6>.
  19. Pasin F., Mascalchi Calveri M., Calabrese A., Pizzarelli G., Bongiovanni I., Andreoli M., et al. Oncolytic effect of SARS-CoV2 in a patient with NK lymphoma. *Acta Biomed.* 2020; 91(3): e2020047. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i3.10141>.
  20. Liya G., Yuguang W., Jian L., Huaiping Y., Xue H., Jianwei H., et al. Studies on viral pneumonia related to novel coronavirus SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: a literature review. *APMIS.* 2020; 128(6): 423–32. <https://doi.org/10.1111/apm.13047>.
  21. Guenther J.F., Cameron J.E., Nguyen H.T., Wang Y., Sullivan D.E., Shan B., et al. Modulation of lung inflammation by the Epstein–Barr virus protein Zta. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2010; 299(6): L771–84. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00408.2009>.
  22. Tachikawa R., Tomii K., Seo R., Nagata K., Otsuka K., Nakagawa A., et al. Detection of herpes viruses by multiplex and real-time polymerase chain reaction in bronchoalveolar lavage fluid of patients with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome. *Respiration.* 2014; 87(4): 279–86. <https://doi.org/10.1159/000355200>.
  23. Aslan N., Watkin L.B., Gil A., Mishra R., Clark F.G., Welsh R.M., et al. Severity of acute infectious mononucleosis correlates with cross-reactive influenza CD8 T-cell receptor repertoires. *mBio.* 2017; 8(6): e01841-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01841-17>.
  24. He C.-S., Handzlik M., Muhamad A., Gleeson M. Influence of CMV/EBV serostatus on respiratory infection incidence during 4 months of winter training in a student cohort of endurance athletes. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2013; 113(10): 2613–9. <https://doi.org/10.1007/s00421-013-2704-x>.
  25. Morand A., Roquelaure B., Colson P., Amrane S., Bosdure E., Raoult D., et al. Child with liver transplant recovers from COVID-19 infection. A case report. *Arch. Pediatr.* 2020; 27(5): 275–6. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2020.05.004>.
  26. Garcia-Martinez F.J., Moreno-Artero E., Jahnke S. SARS-CoV-2 and EBV coinfection. *Med. Clin. (Barc.)*. 2020; 155(7): 319–20. <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2020.06.010>.
  27. Wang Y., Liu S., Liu H., Li W., Lin F., Jiang L., et al. SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. *J. Hepatol.* 2020; 73(4): 807–16. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.05.002>.
  28. Zou X., Fang M., Li S., Wu L., Gao B., Gao H., et al. Characteristics of liver function in patients with SARS-CoV-2 and chronic HBV coinfection. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2021; 19(3): 597–603. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2020.06.017>.
  29. Ma Y.L., Xia S.Y., Wang M., Zhang S.M., Du W.H., Chen Q. Clinical features of children with SARS-CoV-2 infection: an analysis of 115 cases. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi [Chinese journal of contemporary pediatrics]*. 2020; 22(4): 290–3. <https://doi.org/10.7499/j.issn.1008-8830.2003016> (in Chinese).
  30. Anastasiou O.E., Korth J., Herbstreit F., Witzke O., Lange C.M. Mild versus severe liver injury in SARS-CoV-2 infection. *Dig. Dis.* 2021; 39: 52–7. <https://doi.org/10.1159/000510758>.
  31. Ponziani F.R., Del Zompo F., Nesci A., Santopaolo F., Ianiro G., Pompili M., et al. “Gemelli against COVID-19” group. Liver involvement is not associated with mortality: results from a large cohort of SARS-CoV-2-positive patients. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2020; 52(6): 1060–8. <https://doi.org/10.1111/apt.15996>.
  32. Gendrot M., Andreani J., Boxberger M., Jardt P., Fonta I., Le Bideau M., et al. Antimalarial drugs inhibit the replication of SARS-CoV-2: An in vitro evaluation. *Travel Med. Infect. Dis.* 2020; 37: 101873. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101873>.
  33. Doyno C., Sobieraj D.M., Baker W.L. Toxicity of chloroquine and hydroxychloroquine following therapeutic use or overdose. *Clin. Toxicol. (Phila.)*. 2020; 59(1): 12–23. <https://doi.org/10.1080/15563650.2020.1817479>.

## REFERENCES

1. Salzberger B., Buder F., Lampl B., Ehrenstein B., Hitzentbichler F., Hanses F. Epidemiology of SARS-CoV-2 infection and COVID-19. *Internist (Berl)*. 2020; 61(8): 782–8. <https://doi.org/10.1007/s00108-020-00834-9> (in German).
2. Akimkin V.G., Kuzin S.N., Semenenko T.A., Ploskireva A.A., Dubodelov D.V., Tivanova E.V., et al. Gender-age distribution of patients with COVID-19 at different stages of epidemic in Moscow [Genderno-voznrastnaya kharakteristika patsientov s COVID-19 na raznykh etapakh epidemii v Moskve]. *Problemy osobno opasnykh infektsiy*. 2020; (3): 27–35. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-27-35> (in Russian).
3. Akimkin V.G., Kuzin S.N., Semenenko T.A., Shipulina O.Yu., Yatsyshina S.B., Tivanova E.V., et al. Patterns of the SARS-CoV-2 epidemic spread in a megacity [Zakonornosti epidemicheskogo rasprostraneniya SARS-CoV-2 v usloviyakh megapolisa]. *Voprosy virusologii*. 2020; 65(4): 203–11. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-4-203-211> (in Russian).
4. Xiong Y., Sun D., Liu Y., Fan Y., Zhao L., Li X., et al. Clinical and high-resolution CT features of the COVID-19 infection: comparison of the initial and follow-up changes. *Invest. Radiol.* 2020; 55(6): 332–9. <https://doi.org/10.1097/RLI.0000000000000674>.

5. Zhao D., Yao F., Wang L., Zheng L., Gao Y., Ye J., et al. A comparative study on the clinical features of COVID-19 pneumonia to other pneumonias. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15): 756–61. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa247>.
6. Kogan E.A., Berezovskiy Yu.S., Protsenko D.D., Bagdasaryan T.R., Gretsov E.M., Demura S.A., et al. Pathological anatomy of infection caused by SARS-CoV-2 [Patologicheskaya anatomiya infektsii, vyzvannoy SARS-CoV-2]. *Sudebnaya meditsina.* 2020; 6(2): 8–30. <https://doi.org/10.19048/2411-8729-2020-6-2-8-30> (in Russian).
7. Solomay T.V., Semenenko T.A., Ivanova M.Yu. The role of Epstein–Barr viral infection and hepatitis B and C in liver pathology [Rol' Epshteina–Barr virusnoy infektsii i gepatitov V i C v patologii pecheni]. *Voprosy virusologii.* 2019; 64(5): 215–20. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-215-220> (in Russian).
8. Solomay T.V., Semenenko T.A. Viral hepatitis B, C and infectious mononucleosis: epidemiological similarities and differences [Virusnye gepatity V, C i infektsionnyy mononukleoz: epidemiologicheskoe skhodstvo i razlichiya]. *Voprosy virusologii.* 2020; 65(1): 27–34. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-27-34> (in Russian).
9. Na I.K., Buckland M., Agostini C., Edgar J.D.M., Friman V., Michallet M., et al. Current clinical practice and challenges in the management of secondary immunodeficiency in hematological malignancies. *Eur. J. Haematol.* 2019; 102(6): 447–56. <https://doi.org/10.1111/ejh.13223>.
10. Chinen J., Shearer W.T. Secondary immunodeficiencies, including HIV infection. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 125(2 Suppl. 2): 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.08.040>.
11. Kharchenko E.P. The coronavirus SARS-CoV-2: the complexity of infection pathogenesis, the search of vaccines and possible future pandemics [Koronavirus SARS-Cov-2: slozhnosti patogeneza, poiski vaksini i budushchie pandemii]. *Epidemiologiya i Vaksinoprofilaktika.* 2020; 19(3): 4–20. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-3-4-20> (in Russian).
12. Vavougiou G.D. Overlapping host pathways between SARS-CoV-2 and its potential copathogens: An in silico analysis. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 86: 104602. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104602>.
13. Nieto-Moro M., Ecclesia F.G., Tomé-Masa I., De Lama Caro-Patón G., Leoz-Gordillo I., Cabrero-Hernández M., et al. SARS-CoV-2 and *Streptococcus pneumoniae* coinfection as a cause of severe pneumonia in an infant. *Pediatr. Pulmonol.* 2020; 55(9): 2198–200. <https://doi.org/10.1002/ppul.24916>.
14. Solomay T.V., Semenenko T.A., Karazhas N.V., Rybalkina T.N., Kornienko M.N., Bosh'yan R.E., et al. Assessing risks of infection with herpes viruses during transfusion of donor blood and its components. *Health Risk Analysis.* 2020; (2): 135–42. <https://doi.org/10.21668/health.risk/2020.2.15.eng>.
15. Solomay T.V. Dynamics of morbidity and territorial spread of infectious mononucleosis [Mnogoletnyaya dinamika zabolevaemosti i territorial'noe rasprostranenie infektsionnogo mononukleoz]. *Zdravookhranenie Rossiyskoy Federatsii.* 2019; 63(4): 186–92. <https://doi.org/10.18821/0044-197X-2019-63-4-186-192> (in Russian).
16. Solomay T.V., Filatov N.N. Seasonality of infection caused by the Epstein–Barr virus [Sezonnost' infektsii, vyzvannoy virusom Epshteina–Barr]. *Zhurnal infektologii.* 2020; 12(4): 93–100. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2020-12-4-93-100> (in Russian).
17. Taylor G.S., Long H.M., Brooks J.M., Rickinson A.B., Hislop A.D. The immunology of Epstein–Barr virus-induced disease. *Annu. Rev. Immunol.* 2015; 33: 787–821. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112326>.
18. Lehner G.F., Klein S.J., Zoller H., Peer A., Bellmann R., Joannidis M. Correlation of interleukin-6 with Epstein–Barr virus levels in COVID-19. *Crit. Care.* 2020; 24(1): 657. <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03384-6>.
19. Pasin F., Mascalchi Calveri M., Calabrese A., Pizzarelli G., Bongiovanni I., Andreoli M., et al. Oncolytic effect of SARS-CoV2 in a patient with NK lymphoma. *Acta Biomed.* 2020; 91(3): e2020047. <https://doi.org/10.23750/abm.v91i3.10141>.
20. Liya G., Yuguang W., Jian L., Huaiping Y., Xue H., Jianwei H., et al. Studies on viral pneumonia related to novel coronavirus SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV: a literature review. *APMIS.* 2020; 128(6): 423–32. <https://doi.org/10.1111/apm.13047>.
21. Guenther J.F., Cameron J.E., Nguyen H.T., Wang Y., Sullivan D.E., Shan B., et al. Modulation of lung inflammation by the Epstein–Barr virus protein Zta. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 2010; 299(6): L771–84. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00408.2009>.
22. Tachikawa R., Tomii K., Seo R., Nagata K., Otsuka K., Nakagawa A., et al. Detection of herpes viruses by multiplex and real-time polymerase chain reaction in bronchoalveolar lavage fluid of patients with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome. *Respiration.* 2014; 87(4): 279–86. <https://doi.org/10.1159/000355200>.
23. Aslan N., Watkin L.B., Gil A., Mishra R., Clark F.G., Welsh R.M., et al. Severity of acute infectious mononucleosis correlates with cross-reactive influenza CD8 T-cell receptor repertoires. *mBio.* 2017; 8(6): e01841-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.01841-17>.
24. He C.-S., Handzlik M., Muhamad A., Gleeson M. Influence of CMV/EBV serostatus on respiratory infection incidence during 4 months of winter training in a student cohort of endurance athletes. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2013; 113(10): 2613–9. <https://doi.org/10.1007/s00421-013-2704-x>.
25. Morand A., Roquelaure B., Colson P., Amrane S., Bosdure E., Raoult D., et al. Child with liver transplant recovers from COVID-19 infection. A case report. *Arch. Pediatr.* 2020; 27(5): 275–6. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2020.05.004>.
26. Garcia-Martinez F.J., Moreno-Artero E., Jahnke S. SARS-CoV-2 and EBV coinfection. *Med. Clin. (Barc.).* 2020; 155(7): 319–20. <https://doi.org/10.1016/j.medcle.2020.06.010>.
27. Wang Y., Liu S., Liu H., Li W., Lin F., Jiang L., et al. SARS-CoV-2 infection of the liver directly contributes to hepatic impairment in patients with COVID-19. *J. Hepatol.* 2020; 73(4): 807–16. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.05.002>.
28. Zou X., Fang M., Li S., Wu L., Gao B., Gao H., et al. Characteristics of liver function in patients with SARS-CoV-2 and chronic HBV coinfection. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2021; 19(3): 597–603. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2020.06.017>.
29. Ma Y.L., Xia S.Y., Wang M., Zhang S.M., Du W.H., Chen Q. Clinical features of children with SARS-CoV-2 infection: an analysis of 115 cases. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi [Chinese journal of contemporary pediatrics].* 2020; 22(4): 290–3. <https://doi.org/10.7499/j.issn.1008-8830.2003016> (in Chinese).
30. Anastasiou O.E., Korth J., Herbstreit F., Witzke O., Lange C.M. Mild versus severe liver injury in SARS-CoV-2 infection. *Dig. Dis.* 2021; 39: 52–7. <https://doi.org/10.1159/000510758>.
31. Ponziani F.R., Del Zompo F., Nesci A., Santopaolo F., Ianiro G., Pompili M., et al. “Gemelli against COVID-19” group. Liver involvement is not associated with mortality: results from a large cohort of SARS-CoV-2-positive patients. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2020; 52(6): 1060–8. <https://doi.org/10.1111/apt.15996>.
32. Gendrot M., Andreani J., Boxberger M., Jardot P., Fonta I., Le Bideau M., et al. Antimalarial drugs inhibit the replication of SARS-CoV-2: An in vitro evaluation. *Travel Med. Infect. Dis.* 2020; 37: 101873. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2020.101873>.
33. Doyno C., Sobieraj D.M., Baker W.L. Toxicity of chloroquine and hydroxychloroquine following therapeutic use or overdose. *Clin. Toxicol. (Phila).* 2020; 59(1): 12–23. <https://doi.org/10.1080/15563650.2020.1817479>.

## В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



### Интерференогенная активность штамма ВН-3 вируса гепатита уток I типа (*Picornaviridae: Avihepatovirus: Avihepatovirus A*)

Никитина Н.В., Леонов И.К., Явдошак Л.И.

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства» – филиал ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук, 198412, Санкт-Петербург – Ломоносов, Россия

**Введение.** Вирусный гепатит утят типа I (ВГУ-I) – малоизученное контагиозное заболевание, возбудителем которого является РНК-содержащий вирус гепатита уток (*Anatinae*) I типа (*Picornaviridae: Avihepatovirus: Avihepatovirus A*). Болезнь широко распространена во многих странах, включая Россию, и наносит значительный ущерб промышленному утководству. В решении проблемы разработки эффективных средств для борьбы с этой инфекцией среди прочего большое значение имеет изучение интерференогенной активности штаммов её возбудителя.

**Материал и методы.** В исследованиях использован штамм ВН-3 вируса гепатита уток I типа, выделенный из печени больных утят. Он адаптирован к развивающимся 10–12-суточным утиным эмбрионам, культурам куриных и утиных фибробластов. Данный штамм депонирован в Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (ФНИЦЭМ). Эксперименты проводились с применением стандартного метода тканевых культур.

**Результаты и обсуждение.** Представлены данные относительно способности вакцинного штамма ВН-3 к индукции интерферона (ИФН) и его чувствительности к действию экзогенного ИФН в культуре утиных фибробластов. Показано, что интерференогенная активность штамма находится в прямой зависимости от множественности заражения. Максимальный показатель индукции ( $1 : 256$  ЦЭПД<sub>50</sub>) отмечен при внесении вируса в дозе  $1,0$  ТЦД<sub>50</sub>/кл через 72–96 ч после инокуляции культуры клеток. Экзогенный ИФН в титре  $1 : 128$  полностью подавлял цитопатический эффект возбудителя и предотвращал гибель утиных эмбрионов при инфицировании дозой, равной  $100$  ТЦД<sub>50</sub>/кл.

**Заключение.** Полученные результаты позволяют утверждать, что вакцинный штамм ВН-3 вируса гепатита уток I типа обладает выраженной интерференогенной активностью и чувствительностью к действию экзогенного ИФН. Это может иметь значение для работ по созданию эффективных терапевтических препаратов против ВГУ-I.

**Ключевые слова:** вирус гепатита уток I типа, штамм ВН-3, интерферон, интерференогенная активность

**Для цитирования:** Никитина Н.В., Леонов И.К., Явдошак Л.И. Интерференогенная активность штамма ВН-3 вируса гепатита уток I типа (*Picornaviridae: Avihepatovirus: Avihepatovirus A*). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(2): 162-166. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-43>

**Для корреспонденции:** Никитина Нина Васильевна, канд. биол. наук, доцент, ведущий научный сотрудник отдела вирусологии и опухолевых болезней птиц им. Р.Н. Коровина ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства» – филиал ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» Российской академии наук.  
E-mail: [vnivip.nikitina@yandex.ru](mailto:vnivip.nikitina@yandex.ru)

**Участие авторов:** Никитина Н.В. – написание текста, подготовка резюме, общая редакция статьи; Леонов И.К. – проведение экспериментальных исследований, обработка материала; Явдошак Л.И. – проведение экспериментальных исследований, обработка материала.

**Финансирование.** Работа проведена за счёт ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт птицеводства» – филиал ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт птицеводства» РАН (ВНИТИП) в рамках тематики научно-исследовательских работ № 0599-2019-0024.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Редакционной политикой Журнала и Consensus author guidelines for animal use.

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

Поступила 25.01.2021  
Принята к печати 27.03.2021

## Interferonogenic activity of the strain BH-3 duck hepatitis virus type I (*Picornaviridae: Avihepatovirus: Avihepatovirus A*)

Nina V. Nikitina, Il'ya K. Leonov, Larisa I. Yavdoshak

FSBRI «All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science» – Branch of the FSBRI FSC «All-Russian Research and Technological Poultry Institute» of Russian Academy of Sciences, 198412, St. Petersburg – Lomonosov, Russia

**Introduction.** Duck viral hepatitis type I (DVH-I) is a poorly studied contagious disease caused by RNA-containing duck (*Anatinae*) hepatitis virus type I (*Picornaviridae: Avihepatovirus: Avihepatovirus A*). This infection is widespread in many countries, including Russia, and causes significant damage to industrial duck breeding. The study of interferonogenic activity of its etiologic agent strains is of great importance in solving the problem of developing effective means to control the disease.

**Material and methods.** Strain BH-3 of duck hepatitis virus type I isolated from the liver of sick ducklings was used in the study. The strain was adapted to developing 10–12 day old duck embryos, to the cell culture of chicken and duck fibroblasts and deposited in the State Collection of Viruses of the D.I. Ivanovsky Institute of Virology of FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia. Experiments were performed using the standard tissue culture method.

**Results and discussion.** Data on the ability of the viral strain BH-3 to induce interferon (IFN) and its sensitivity to the action of exogenous interferon in the culture of duck fibroblasts are presented. It has been shown that the interferonogenic activity of this strain of the hepatitis virus is in direct proportion to the multiplicity of infection. The maximum induction of IFN (1 : 256 CEPD<sub>50</sub>) was observed at a dose of 1.0 TCD<sub>50</sub>/cell in 72–96 hrs after inoculation of the cell culture. Exogenous IFN at a dose of 1 : 128 completely suppressed the cytopathic effect and death of duck embryos infected with hepatitis virus at a dose of 100 TCD<sub>50</sub>/cell.

**Conclusion.** The data obtained allow us to state that the vaccine strain BH-3 of duck hepatitis virus type I has a pronounced interferonogenic activity and sensitivity to the action of exogenous IFN. This may have implications for the development of effective therapeutic agents against DVH-I.

**Key words:** duck hepatitis virus type I, BH-3 strain, interferon, interferonogenic activity

**For citation:** Nikitina N.V., Leonov I.K., Yavdoshak L.I. Interferonogenic activity of the strain BH-3 duck hepatitis virus type I (*Picornaviridae: Avihepatovirus: Avihepatovirus A*). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(2): 162-166 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-43>

**For correspondence:** Nikitina Nina Vasil'evna, Ph.D. (Biol.), Associate Professor, Leading Researcher of the Department of Virology and Tumor Diseases of Poultry named after R.N. Korovin, FSBRI «All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science» – Branch of the FSBRI FSC «All-Russian Research and Technological Poultry Institute» of Russian Academy of Sciences. E-mail: [vnivip.nikitina@yandex.ru](mailto:vnivip.nikitina@yandex.ru)

### Information about the authors:

Nikitina N.V., <http://orcid.org/0000-0002-7500-3172>

Leonov I.K., <http://orcid.org/0000-0002-5342-1912>

Yavdoshak L.I., <http://orcid.org/0000-0002-4715-1263>

**Contribution:** Nikitina N.V. – writing of the text, preparing of resume, general edition of the article; Leonov I.K. – performing of experimental research, material processing; Yavdoshak L.I. – performing of experimental research, material processing.

**Acknowledgment.** The work was carried out at the expense of FSBRI «All-Russian Research Veterinary Institute of Poultry Science» – Branch of the FSBRI FSC «All-Russian Research and Technological Poultry Institute» of Russian Academy of Sciences, within the framework of the research topic No. 0599-2019-0024.

Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with the editorial policy of the Journal and Consensus author guidelines for animal use.

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

Received 25 January 2021

Accepted 27 March 2021

## Введение

Вирусный гепатит утят типа I (ВГУ-I) – малоизученная сверхострая контагиозная болезнь утят до 6-недельного возраста (латентно протекающая у взрослых особей), характеризующаяся поражением печени и высокой смертностью среди молодняка (95%) [1–3]. Возбудителем её является РНК-содержащий вирус гепатита уток (*Anatinae*) I типа (*Avihepatovirus A*), относящийся к семейству *Picornaviridae*, роду *Avihepatovirus*. Заболевание широко распространено во многих странах мира, в том числе в Российской

Федерации. Оно серьёзно угрожает промышленному утководству, вызывая большие экономические потери [4–6]. Санитарным кодексом Всемирной организации по охране здоровья животных (МЭБ) ВГУ-I включён в перечень особо опасных болезней.

Для специфической профилактики этой инфекции применяются аттенуированные вирусные вакцины и инактивированные препараты. Однако в последние годы на фоне относительно стабильного благополучия по ВГУ-I постоянно возникают спорадические вспышки, что связано с нарушением ветеринарных,

зоотехнических и особенно противоэпизоотических мероприятий без учёта биологических особенностей патогена.

В отечественной и зарубежной литературе имеются данные по изменчивости возбудителя заболевания как при циркуляции в естественных условиях, так и при длительных пассажах в организме восприимчивых особей [7–9].

Известно, что метод тканевых культур служит важным звеном в изучении биологических свойств вируса и в ходе многократных лабораторных пассажей позволяет провести оценку стабильности вакцинных штаммов инфекционного агента. Способность индуцировать *in vivo* или *in vitro* в определённых типах клеток выработку интерферона (ИФН) является генетически закреплённым признаком вируса [10–11] и наряду с другими наследственными характеристиками позволяет оценить однородность популяции аттенуированных штаммов, используемых в производстве вакцинных препаратов. В связи с этим исследования, направленные на изучение биологических (в том числе интерферогенных) и культуральных свойств новых регистрируемых вакцинных штаммов вируса гепатита уток I типа, остаются в настоящее время актуальными.

С учётом изложенного целью работы явилось изучение интерферогенной активности вакцинного штамма ВН-3 рассматриваемого инфекционного агента наряду с определением его чувствительности к действию экзогенного ИФН.

### Материал и методы

**Вирус.** В экспериментах использовали вакцинный штамм ВН-3 вируса гепатита уток I типа, выделенный из печени больных утят. Он адаптирован к развивающимся 10–12-суточным утиным эмбрионам, культурам фибробластов утиных эмбрионов (ФЭУ). Данный штамм депонирован в Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Иванова ФГБУ «Национальный центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (ФНИЦЭМ). Исходный титр вируса был равен  $6,75 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  (ТЦД – тканевая цитопатическая доза).

**Интерферон** получали на 48-часовом монослое культуры клеток утиных эмбрионов, выращенном в пробирках и пластиковых стерильных (PS) флаконах объёмом по 2 и 220 см<sup>3</sup> соответственно, в стационарных условиях при температуре  $(37,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ . Начальная концентрация клеточных элементов в суспензии составляла 600–650 тыс. кл/см<sup>3</sup>. Культуру заражали вакцинным штаммом вируса гепатита уток I типа в дозах 0,01; 0,1; 1,0 ТЦД<sub>50</sub>/кл. Через каждые 24 ч после инокуляции вируса отбирали пробы культуральной жидкости одновременно с контрольным образцом, после чего центрифугировали при 1000 g в течение 15 мин и термоинактивировали на протяжении 60 мин при температуре 60 °C. Образованные таким образом пробы использовали в качестве готовых препаратов ИФН. Полноту инактивации

возбудителя проверяли заражением культуры ФЭУ неразведённым препаратом ИФН.

**Определение титра интерферона** выполняли в указанной культуре методом двукратных разведений на питательной среде Игла МЕМ при температуре  $(37,5 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ . ИФН в каждом из разведений в объёме 1,0 см<sup>3</sup> вносили в 4 пробирки с культурой клеток, предварительно удалив ростовую среду. Контролем служила нормальная культуральная жидкость. Через 24 ч в опытные и контрольные пробирки с клеточной культурой вносили по 0,2 см<sup>3</sup> (100 ТЦД<sub>50</sub>) индикаторного вируса везикулярного стоматита (VSV, vesicular stomatitis virus). Активность ИФН учитывали спустя 48 ч после внесения вируса-индикатора на фоне полной дегенерации контрольных культур. Наблюдение вели с использованием инвертируемого микроскопа ЛОМО ХС0928 («ЛОМО», Россия) при увеличениях от  $\times 40$  до  $\times 400$ . Ингибирующее действие ИФН характеризовали по подавлению вирусного цитопатогенного действия (ЦПД) в опытных и контрольных пробирочных культурах с отчётливо выраженной клеточной дегенерацией.

Титром ИФН считали последнее разведение, ингибирующее ЦПД индикаторного вируса в 50% клеточных культур. Чувствительность вакцинного штамма ВН-3 вируса гепатита уток I типа к экзогенному ИФН определяли по ингибирующему действию последнего в отношении данного штамма в культуре ФЭУ и 10–12-суточных утиных эмбрионах.

Полученные результаты подвергали статистическому анализу с применением критерия Стьюдента, считая их достоверными при  $p < 0,05$  [12]. Графическое построение данных выполняли при помощи программного обеспечения Microsoft Office Excel.

### Результаты и обсуждение

Для проведения инокуляции штамма ВН-3 вируса гепатита уток I типа в культуру утиных фибробластов вирусосодержащий материал был разведён до значений 0,01; 0,1; 1,0 ТЦД<sub>50</sub>/кл. Через каждые 24 ч эксперимента из PS флаконов с испытуемым штаммом брали по 3,0 см<sup>3</sup> культуральной жидкости, которую замещали равным объёмом поддерживающей среды (Игла МЕМ + питательная среда 199), после чего определяли титр ИФН.

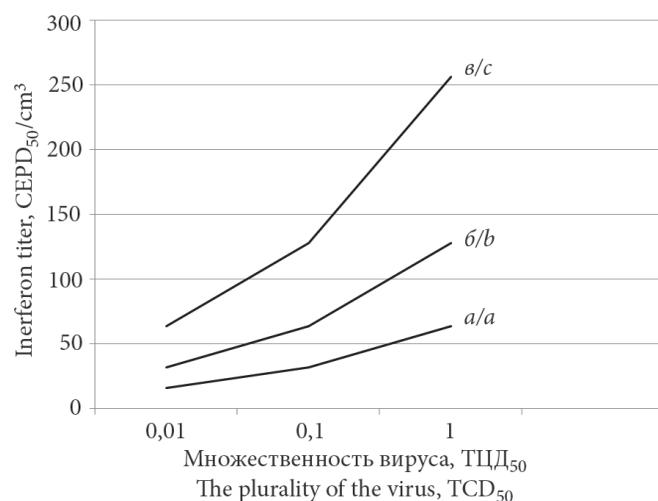
Результаты оценки способности вакцинного штамма ВН-3 к индукции ИФН представлены в **таблице**. Как можно видеть, выработка этого вещества зависит от множественности заражения вирусного штамма-индуктора и времени от момента инокуляции культуры. При этом имеющаяся зависимость носит прямой корреляционный характер. Через 24 ч после инокуляции при множественности заражения 0,01 и 0,1 ТЦД<sub>50</sub>/кл продукция ИФН отсутствовала, а в дозе 1,0 ТЦД<sub>50</sub>/кл его титр составил 1 : 8 ЦЭПД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> (ЦЭПД<sub>50</sub> – средняя доза вещества, подавляющая цитопатический эффект вируса). С увеличением временного промежутка показатель концентрации ИФН возрастал, находясь спустя 48 ч в диапазоне от 1 : 16 до 1 : 64 ЦЭПД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>.

**Интерферогенная активность штамма ВН-3 вируса гепатита уток I типа****Interferonogenic activity of the duck hepatitis virus type I strain ВН-3**

Множественность заражения, ТЦД <sub>50</sub> Multiplicity of infection, TCD <sub>50</sub>	Сроки исследования проб, ч Time points for sample testing, hrs					Значение <i>p</i> <i>p</i> value
	Титр интерферона, ЦЭПД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> Interferon titer, CEPD <sub>50</sub> /cm <sup>3</sup>					
	24	48	72	96	120	
0,01	0	1 : 16	1 : 64	1 : 64	1 : 32	<0,05
0,1	0	1 : 32	1 : 128	1 : 128	1 : 64	<0,05
1,0	1 : 8	1 : 64	1 : 256	1 : 256	1 : 128	<0,05

**Примечание.** ЦЭПД<sub>50</sub> – средняя доза интерферона, подавляющая вирусный цитопатический эффект.

**Note.** CEPD<sub>50</sub> is the average dose of interferon that suppresses the viral cytopathic effect.



Интерферогенная активность вируса гепатита уток I типа в культуре утиных фибробластов в зависимости от его множественности и времени после инфицирования: *a* – 48 ч; *b* – 120 ч; *v* – 72–96 ч.

**Примечание.** ЦЭПД<sub>50</sub> – средняя доза интерферона, подавляющая вирусный цитопатический эффект.

Interferonogenic activity of duck hepatitis virus type I in the culture of duck fibroblasts depending on the virus plurality and the time after infection: *a* – 48 hrs; *b* – 120 hrs; *c* – 72–96 hrs.

**Note.** CEPD<sub>50</sub> is the average dose of interferon that suppresses the viral cytopathic effect.

Через 72 ч после инфицирования индукция ИФН была максимальной; в зависимости от дозы внесённого вируса (0,01; 0,1; 1,0 ТЦД<sub>50</sub>/кл) титр вещества был равен 1 : 64; 1 : 128 и 1 : 256 ЦЭПД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> соответственно, что находится в рамках латентной фазы вирусного ЦПД. Активность выработки ИФН спустя 96 ч культивирования не изменялась, а затем по мере дегенерации и гибели клеток монослоя его образование уменьшалось. В ходе исследований показано, что наибольшее количество ИФН продуцируется через 72–96 ч от момента заражения клеточной культуры, а интерферогенная активность штамма ВН-3 вируса гепатита уток I типа находится в прямой зависимости от дозы возбудителя (см. рисунок).

Установленный характер процесса образования ИФН в культуре утиных фибробластов совпадает с полученными ранее данными относительно про-

дукции максимального его количества через 48–72 ч после инокуляции клеток другими штаммами вируса гепатита уток [13].

При определении чувствительности штамма ВН-3 к ингибирующему действию экзогенного ИФН в монослой культуры утиных фибробластов вещество вносили в дозе 1 : 128 ЦЭПД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> и после 24-часовой экспозиции добавляли вирус (100 ТЦД<sub>50</sub>). Результаты экспериментов показали, что экзогенный ИФН в указанном титре полностью подавлял цитопатический эффект внесённой дозы возбудителя с предотвращением гибели утиных эмбрионов. Это, в свою очередь, свидетельствует о чувствительности вакцинного штамма ВН-3 вируса гепатита уток I типа к ингибирующему действию экзогенного ИФН.

**Заключение**

На основании результатов проведённых исследований можно заключить, что вакцинный штамм ВН-3 вируса гепатита уток I типа обладает выраженной интерферогенной активностью в культуре утиных фибробластов и высокой чувствительностью к действию экзогенного ИФН. Установлена прямая зависимость степени индуцированного вирусным штаммом накопления вещества от множественности инфицирования клеток и времени после инокуляции культуры. Итоги экспериментов могут иметь значение для работ по созданию эффективных терапевтических препаратов против ВГУ-I.

**ЛИТЕРАТУРА**

- Gu C.Q., Xie C.Q., Hu X.Y., Zhang W.P., Bi D.R., Cheng G.F. Cytokine gene expression in the liver of ducklings infected with duck hepatitis virus – 1JX strain. *Poult. Science*. 2012; 91(3): 583–91. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01743>.
- Князев В.П. Вирусный гепатит утят (уток). В кн.: Князев В.П. *Болезни водоплавающих птиц*. Владимир, 2013: 70–87.
- Mao S., Wang M., Ou X., Sun D., Cheng A., Zhu D., et al. Virologic and immunologic characteristics in mature ducks with acute duck hepatitis A virus 1 infection. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1574. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01574>.
- Li J., Bi Y., Chen C., Yang L., Ding C., Liu W. Genetic characterization of duck hepatitis A viruses isolated in China. *Virus Res.* 2013; 178(2): 211–6. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.10.007>.
- Erfan A.M., Selim A.A., Moursi M.K., Nassef S.A., Abdelwhab E.M. Epidemiology and molecular characterisation of duck hepatitis A virus from different duck breeds in Egypt. *Vet. Microbiol.* 2015; 177(3–4): 347–52. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.03.020>.
- Bayoumie H.A.A., Abd-El Samie L.K. Molecular characterization of a duck virus hepatitis isolated from Sharkia governorate. *Assiut. Vet. Med. J.* 2015; 61(147): 56–65.

7. Норкина С.Н., Гребенникова Т.В., Плотников Н.А., Алипер Т.И. Вирусный гепатит утят. В кн.: *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. Москва: МИА; 2013; 1197–8.
8. Chen L.L., Xu Q., Zhang R.H., Yang L., Li J.X., Xie Z.J., et al. Improved duplex RP-PCR assay for differential diagnosis of mixed infection of duck hepatitis A virus type 1 and type 3 in ducklings. *J. Virol. Methods*. 2013; 192(1–2): 12–7. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.04.012>.
9. Wen X.J., Cheng A.C., Wang M.S., Jia R.Y., Zhu D.K., Chen S., et al. Detection, differentiation, and VP1 sequencing of duck hepatitis A virus type 1 and type 3 by a 1-step duplex reverse-transcription PCR assay. *Poult. Sci.* 2014; 93(9): 2184–92. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-04024>.
10. Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н. Использование индукторов интерферона при вирусных инфекциях. *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(2): 5–10.
11. Полосков В.В., Ершов Ф.И. Активаторы синтеза эндогенных интерферонов (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2017; 1(18): 188–92.
12. Белоусова Р.В., Троценко Н.И., Преображенская Э.А. *Практикум по ветеринарной вирусологии*. Москва: Колос; 2013.
13. Бубашко О.А. Маркерные свойства штамма вирусного гепатита утят КМИЭВ-16. *Эпизоотология, иммунология, фармакология и санитария*. 2005; (1): 46–9.
4. Li J., Bi Y., Chen C., Yang L., Ding C., Liu W. Genetic characterization of duck hepatitis A viruses isolated in China. *Virus Res.* 2013; 178(2): 211–6. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.10.007>.
5. Erfan A.M., Selim A.A., Moursi M.K., Nasef S.A., Abdelwhab E.M. Epidemiology and molecular characterisation of duck hepatitis A virus from different duck breeds in Egypt. *Vet. Microbiol.* 2015; 177(3–4): 347–52. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.03.020>.
6. Bayoumie H.A.A., Abd-El Samie L.K. Molecular characterization of a duck virus hepatitis isolated from Sharkia governorate. *Assiut. Vet. Med. J.* 2015; 61(147): 56–65.
7. Norkina S.N., Grebennikova T.V., Plotnikov N.A., Aliper T.I. Viral hepatitis of ducklings. In: *Guide to Virology. Viruses and Viral Infections in Humans and Animals [Virusnyy gepatit utyat. V kn.: Rukovodstvo po virusologii. Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013; 1197–8 (in Russian).
8. Chen L.L., Xu Q., Zhang R.H., Yang L., Li J.X., Xie Z.J., et al. Improved duplex RP-PCR assay for differential diagnosis of mixed infection of duck hepatitis A virus type 1 and type 3 in ducklings. *J. Virol. Methods*. 2013; 192(1–2): 12–7. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.04.012>.
9. Wen X.J., Cheng A.C., Wang M.S., Jia R.Y., Zhu D.K., Chen S., et al. Detection, differentiation, and VP1 sequencing of duck hepatitis A virus type 1 and type 3 by a 1-step duplex reverse-transcription PCR assay. *Poult. Sci.* 2014; 93(9): 2184–92. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-04024>.
10. Ershov F.I., Narovlyanskiy A.N. Usage of interferon inducers during viral infections [*Ispol'zovaniye induktorov interferona pri virusnykh infektsiyakh*]. *Voprosy virusologii*. 2015; (2): 5–10 (in Russian).
11. Poloskov V.V., Ershov F.I. Activation of synthesis of endogenous interferon (review) [*Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv (obzor)*]. 2017; 1(18): 188–92 (in Russian).
12. Belousova R.V., Trotsenko N.I., Preobrazhenskaya E.A. *Workshop on Veterinary Virology [Praktikum po veterinarnoy virusologii]*. Moscow: Kolos; 2013 (in Russian).
13. Bubashko O.A. Marker properties of the strain of viral hepatitis in ducklings KMIEV-16 [*Markernye svoystva shtamma virusnogo gepatita utyat KMIEV-16*]. *Epizootologiya, immunologiya, farmakologiya i sanitariya*. 2005; (1): 46–9 (in Russian).

### References

1. Gu C.Q., Xie C.Q., Hu X.Y., Zhang W.P., Bi D.R., Cheng G.F. Cytokine gene expression in the liver of ducklings infected with duck hepatitis virus – 1JX strain. *Poult. Science*. 2012; 91(3): 583–91. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01743>.
2. Knyazev V.P. Viral hepatitis of ducklings (ducks). In: *Diseases of Waterfowl [Virusnyy gepatit utyat (utok). V kn.: Bolezni vodoplavayushchikh ptits]*. Vladimir; 2013: 70–87 (in Russian).
3. Mao S., Wang M., Ou X., Sun D., Cheng A., Zhu D., et al. Virologic and immunologic characteristics in mature ducks with acute duck hepatitis A virus 1 infection. *Front. Immunol.* 2017; 8: 1574. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01574>.