

ISSN 0507-4088 (Print)
ISSN 2411-2097 (Online)



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

6

Том 66 • 2021

Volume 66 • Issue 6 • 2021

Издатель:
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
www.crie.ru

Журнал «Вопросы вирусологии» знакомит читателей с достижениями российской и мировой вирусологии, помещает статьи, посвящённые изучению вирусов и вирусных болезней человека, животных и растений. Видное место в журнале отводится публикации результатов экспериментальных работ по различным вопросам общей и частной вирусологии. В журнале печатаются материалы, способствующие внедрению в практику достижений вирусологической науки по ликвидации и снижению распространённости инфекционных заболеваний, а также их диагностике, профилактике и лечению.

В обзорных статьях обобщаются последние достижения в области вирусологии. Читатель найдет в журнале описание новых методов исследований, методических приёмов, новой аппаратуры и приспособлений.

Журнал рассчитан на вирусологов, эпидемиологов, паразитологов, фармакологов, биохимиков и других специалистов.

The Journal «Problems of virology» is focused on current advances in virology in Russia and the rest of the world. It covers research in virology and viral diseases of humans, animals, and plants. Emphasis is given to the original experimental studies on various aspects of general and special virology. The reviews of recent and historic developments in virology are regularly published.

The journal promotes the implementation of advances in virology aimed at treatment, reduction of the incidence and elimination of infectious diseases and enhancement of diagnostics, prevention, and treatment practices as well. The target audience of the journal are virologists (including medical and veterinary virologists, scientists and practitioners), epidemiologists, parasitologists, pharmacologists, biochemists and specialists in related medical disciplines.

Журнал, как входящий в международную реферативную базу данных и систем цитирования Scopus, входит в рекомендованный ВАК «Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук» (в соответствии с п.5 Правил формирования Перечня) по специальностям:

1.5.10. Вирусология (медицинские и биологические науки)

3.2.2. Эпидемиология (медицинские и биологические науки)

3.1.22. Инфекционные болезни (медицинские и биологические науки)

Свидетельство о регистрации
ПИ № ФС77-77676 от 29 января 2020 г.
ISSN 0507-4088 (Print)
ISSN 2411-2097 (Online)
DOI prefix: 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, CrossRef, EBSCOhost Biological Abstracts, EBSCOhost Wildlife & Ecology Studies Worldwide, Elsevier BV Scopus, Elsevier BV EMBASE, Index Medicus, Excerpta Medica, Index Veterinarius, MEDLINE, National Library of Medicine PubMed, Parasitology Database, Poultry Abstracts, Review of Medical and Veterinary Entomology, Thomson Reuters Biological Abstracts, Thomson Reuters BIOSIS Previews, Thomson Reuters Science Citation Index Expanded, Thomson Reuters Web of Science, Tropical Diseases Bulletin, Veterinary Science Database, Virology and AIDS Abstracts, Russian Science Citation Index (на платформе Web of Science)

Журнал открытого доступа,
не берущий плату за публикации.

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

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

Полные тексты статей журнала
доступны на сайтах:

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

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

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

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

<https://www.ebsco.com>

ИЗДАТЕЛЬ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора
111123, Москва,
ул. Новогиреевская, д. 3А.
Тел.: +7(925) 011-87-79
E-mail: 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 соответствии
с правилами для авторов
(см. <https://www.virusjour.elpub.ru>).

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

Подписано в печать 29.12.2021.

Формат 60×90^{1/8}.

Тираж 50 экз.

Отпечатано в типографии
«Буки Веди», www.bukivedi.com.
E-mail: 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.

6

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:

Белоусова Р.В. (д.в.н., проф.)

Галегов Г.А. (д.б.н., проф.)

Гулюкин М.И. (д.в.н., проф., акад. РАН)

Гурцевич В.Э. (д.м.н., проф.)

Ершов Ф.И. (д.м.н., проф., акад. РАН)

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

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

Зуев В.А. (д.м.н., проф.)

Иванова О.Е. (д.м.н., проф.)

Карганова Г.Г. (д.б.н., проф.)

Колобухина Л.В. (д.м.н., проф.)

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

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

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

Попова А.Ю. (д.м.н., проф.)

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

Юминова Н.В. (д.б.н., проф.)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Акимкин В.Г. (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)
Алипер Т.И. (д.б.н., проф.; Москва, Россия)
Антонов В.А. (д.м.н., проф.; Волгоград, Россия)
Бовин Н.В. (д.х.н., проф.; Москва, Россия)
Борисевич С.В. (д.б.н., проф., член-корр. РАН; Сергиев Посад, Россия)
Брико Н.И. (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)
Васин А.В. (д.б.н.; Санкт-Петербург, Россия)
Глотов А.Г. (д.в.н., проф.; пос. Краснообск, Новосибирская обл., Россия)
Глулов В.В. (д.б.н., проф.; Новосибирск, Россия)
Заседателев А.С. (д.ф.-м.н., проф.; Москва, Россия)
Злобин В.И. (д.м.н., проф., акад. РАН; Иркутск, Россия)
Иванов А.И. (Хабаровск, Россия)

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)
Малышев 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)
Нетёсов 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)
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, Dr. Sci., Prof., RAS Full Member 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 prefix: 10.36233

The Journal is indexed by the following abstracting and indexing services:

Abstract Journals, AIDS & Cancer Research, Biocontrol News and Information, Biological Sciences, Chemical Abstracts, CrossRef, 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

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

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 29, 2021.
Print format 60 × 90^{1/8}.
Circulation 50 copies.

Produced at the Buki Vedi Printing House.
115093, 1, 1st Party lane, Moscow, Russian Federation.
E-mail: info@bukivedi.com.
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

6

Volume 66 • 2021

EDITORIAL BOARD

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

Assistant editor 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

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)

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)

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)

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

Зайнутдинов С.С., Сиволобова Г.Ф., Локтев В.Б., Кочнева Г.В.

Мукозальный иммунитет и вакцины против вирусных инфекций 399

Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Борисевич С.В.Молекулярная эволюция вируса Даби (*Phenuiviridae: Bandavirus: Dabie bandavirus*) – возбудителя острой лихорадки с тромбоцитопеническим синдромом 409

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Акимкин В.Г., Петров В.В., Красовитов К.В., Борисова Н.И., Котов И.А., Родионова Е.Н.,**Черкашина А.С., Кондрашева Л.Ю., Тиванова Е.В., Хафизов К.Ф.**

Молекулярные методы диагностики новой коронавирусной инфекции: сравнение петлевой изотермической амплификации и полимеразной цепной реакции* 417

Корзая Л.И., Догадов Д.И., Гончаренко А.М., Карлсен А.А., Кюрегян К.К., Михайлов М.И.

Распространение маркеров респираторных вирусов человека среди обезьян Адлерского приматологического центра 425

Трифорова Т.С., Моисеенко А.В., Буркальцева М.В., Шабурова О.В., Шайтан А.К., Крылов В.Н., Соколова О.С.Картирование ДНК в капсиде гигантского бактериофага phiEL (*Caudovirales: Myoviridae: Elvirus*) с помощью аналитической электронной микроскопии* 434**Чепур С.В., Алексеева И.И., Владимирова О.О., Мясников В.А.,****Тюнин М.А., Ильинский Н.С., Никишин А.С., Шевченко В.А., Смирнова А.В.**Особенности патологии дыхательной системы у сирийских хомяков (*Mesocricetus auratus*) при инфекции вирусом SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) 442**Кузнецова А.И., Громов К.Б., Киреев Д.Е., Шлыкова А.В., Лопатухин А.Э.,****Казеннова Е.В., Лебедев А.В., Туманов А.С., Ким К.В., Бобкова М.Р.**Анализ особенностей белка Tat вируса иммунодефицита человека 1 типа суб-субтипа A6 (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1*)* 452

ИНФОРМАЦИЯ

Указатель статей, опубликованных в журнале «Вопросы вирусологии» в 2021 г. 465

*Статьи опубликованы на русском и английском языках на сайте журнала: <https://virusjour.elpub.ru/jour>

CONTENTS

REVIEWS

Zainutdinov S.S., Sivolobova G.F., Loktev V.B., Kochneva G.V.

Mucosal immunity and vaccines against viral infections 399

Sizikova T.E., Lebedev V.N., Borisevich S.V.The molecular evolution of Dabie bandavirus (*Phenuiviridae: Bandavirus: Dabie bandavirus*),
the agent of severe fever with thrombocytopenia syndrome 409

ORIGINAL RESEARCHES

Akimkin V.G., Petrov V.V., Krasovitsov K.V., Borisova N.I., Kotov I.A., Rodionova E.N.,**Cherkashina A.S., Kondrasheva L.Yu., Tivanova E.V., Khafizov K.F.**Molecular methods for diagnosing novel coronavirus infection: comparison of loop-mediated isothermal
amplification and polymerase chain reaction* 417**Korzaya L.I., Dogadov D.I., Goncharenko A.M., Karlsen A.A., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I.**

Prevalence of laboratory markers of human respiratory viruses in monkeys of Adler primate center 425

**Trifonova T.S., Moiseenko A.V., Bourkaltseva M.V., Shaburova O.V., Shaytan A.K., Krylov V.N.,
Sokolova O.S.**DNA mapping in the capsid of giant bacteriophage phiEL (*Caudovirales: Myoviridae: Elvirus*)
by analytical electron microscopy* 434**Chepur S.V., Alekseeva I.I., Vladimirova O.O., Myasnikov V.A., Tyunin M.A., Ilinskii N.S., Nikishin A.S.,
Shevchenko V.A., Smirnova A.V.**Specific features of the pathology of the respiratory system in SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae:*
Betacoronavirus: Sarbecovirus) infected Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) 442**Kuznetsova A.I., Gromov K.B., Kireev D.E., Shlykova A.V., Lopatukhin A.E., Kazennova E.V.,
Lebedev A.V., Tumanov A.S., Kim K.V., Bobkova M.R.**Analysis of Tat protein characteristics in human immunodeficiency virus type 1 sub-subtype A6
(*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1*)* 452

INFORMATION

Index of articles published in the journal «Problems of Virology» in 2021 465

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

ОБЗОРЫ

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-82>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Мукозальный иммунитет и вакцины против вирусных инфекций

Зайнутдинов С.С., Сиволобова Г.Ф., Локтев В.Б., Кочнева Г.В.

ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 630559, Новосибирская область, Кольцово, Россия

Иммунитет слизистых оболочек (СО) реализуется через структурно-функциональную систему, называемую мукозо-ассоциированной лимфоидной тканью (МАЛТ; mucosa-associated lymphoid tissue, MALT). МАЛТ подразделяется на части (кластеры) в зависимости от их анатомического расположения, однако все они имеют идентичное строение: слой слизи, эпителиальная ткань, собственная пластинка СО и лимфоидные фолликулы. Плазматические клетки МАЛТ вырабатывают уникальный тип иммуноглобулинов (Ig) – IgA, обладающий способностью к полимеризации. При мукозальной иммунизации преобладающей формой этих антител (АТ) является секреторный димер (sIgA), в больших количествах концентрирующийся в СО. Мукозальные IgA действуют как первая линия защиты и эффективно нейтрализуют вирусные агенты на уровне входных ворот инфекции, предотвращая поражение эпителиальных клеток и генерализацию инфекционного процесса.

На сегодняшний день лицензированы несколько мукозальных противовирусных вакцин, в состав которых входят аттенуированные штаммы соответствующих вирусов: полиомиелита, гриппа, ротавируса. Несмотря на огромные успехи, достигнутые с применением этих вакцинных препаратов, в частности по ликвидации полиомиелита, существенными недостатками использования аттенуированных вирусных штаммов, входящих в их состав, являются риск реактогенности и возможность реверсии к вирулентному штамму в процессе вакцинации. Тем не менее именно мукозальная вакцинация, имитируя естественное инфицирование, способна индуцировать быстрый и эффективный иммунный ответ и таким образом способствовать предотвращению, а возможно, и остановке вспышек многих вирусных инфекций.

В настоящее время клинические испытания успешно проходит целый ряд интраназальных вакцин, основанных на новом векторном подходе, при котором для доставки протективно значимых иммуногенов патогенных вирусов используются безопасные вирусные векторы. Самым тестируемым вектором для интраназальных вакцинных препаратов является аденовирус, а наиболее значимым иммуногеном – S-белок SARS-CoV-2. Исследуются также мукозальные векторные вакцины против респираторно-синцитиального вируса человека и вируса иммунодефицита человека 1 типа на основе вируса Сендай, способного бессимптомно реплицироваться в клетках бронхиального эпителия.

Ключевые слова: обзор; слизистые оболочки; мукозальные вакцины; иммуноглобулины класса А (IgA); респираторные вирусные инфекции

Для цитирования: Зайнутдинов С.С., Сиволобова Г.Ф., Локтев В.Б., Кочнева Г.В. Мукозальный иммунитет и вакцины против вирусных инфекций. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(6): 399–408. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-82>

Для корреспонденции: Кочнева Галина Вадимовна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией вирусных гепатитов, ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), 630559, Новосибирская область, Кольцово, Россия. E-mail: kochneva@vector.nsc.ru; g.v.kochneva@yandex.ru

Участие авторов: Зайнутдинов С.С. – поиск и анализ литературы, написание первоначального текста; Сиволобова Г.Ф. – поиск и анализ литературы, написание первоначального текста; Локтев В.Б. – написание и утверждение окончательного варианта статьи, общее руководство; Кочнева Г.В. – написание окончательного текста статьи, общее руководство.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» ГЗ-37/21.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 08.10.2021

Принята в печать 14.11.2021

Опубликована 30.12.2021

REVIEW ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-82>

Mucosal immunity and vaccines against viral infections

Sergei S. Zainutdinov, Galina F. Sivolobova, Valery B. Loktev, Galina V. Kochneva

FSBI State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor), 630559, Novosibirsk Region, Kol'tsovo, Russia

Mucosal immunity is realized through a structural and functional system called mucosa-associated lymphoid tissue (MALT). MALT is subdivided into parts (clusters) depending on their anatomical location, but they all have a similar structure: mucus layer, epithelial tissue, lamina propria and lymphoid follicles. Plasma cells of MALT produce a unique type of immunoglobulins, IgA, which have the ability to polymerize. In mucosal immunization, the predominant form of IgA is a secretory dimer, sIgA, which is concentrated in large quantities in the mucosa. Mucosal IgA acts as a first line of defense and neutralizes viruses efficiently at the portal of entry, preventing infection of epithelial cells and generalization of infection.

To date, several mucosal antiviral vaccines have been licensed, which include attenuated strains of the corresponding viruses: poliomyelitis, influenza, and rotavirus. Despite the tremendous success of these vaccines, in particular, in the eradication of poliomyelitis, significant disadvantages of using attenuated viral strains in their composition are the risk of reactogenicity and the possibility of reversion to a virulent strain during vaccination. Nevertheless, it is mucosal vaccination, which mimics a natural infection, is able to induce a fast and effective immune response and thus help prevent and possibly stop outbreaks of many viral infections.

Currently, a number of intranasal vaccines based on a new vector approach are successfully undergoing clinical trials. In these vaccines, the safe viral vectors are used to deliver protectively significant immunogens of pathogenic viruses. The most tested vector for intranasal vaccines is adenovirus, and the most significant immunogen is SARS-CoV-2 S protein. Mucosal vector vaccines against human respiratory syncytial virus and human immunodeficiency virus type 1 based on Sendai virus, which is able to replicate asymptotically in cells of bronchial epithelium, are also being investigated.

Key words: review; mucous membranes; mucosal vaccines; class A immunoglobulins (IgA); respiratory viral infections

For citation: Zainutdinov S.S., Sivolobova G.F., Loktev V.B., Kochneva G.V. Mucosal immunity and vaccines against viral infections. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(6): 399-408 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-82>

For correspondence: Galina V. Kochneva, Dr.Sci. (Biol.), Leading Researcher, Head of the Viral Hepatitis Laboratory, FSBI State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor) (FSBI SRC VB «Vector»), 630559, Novosibirsk Region, Kol'tsovo, Russia. E-mail: kochneva@vector.nsc.ru; g.v.kochneva@yandex.ru

Information about the authors:Zainutdinov S.S., <http://orcid.org/0000-0001-5818-4402>Sivolobova G.F., <http://orcid.org/0000-0002-8362-0314>Loktev V.B., <https://orcid.org/0000-0002-0229-321X>Kochneva G.V., <http://orcid.org/0000-0002-2420-0483>

Contribution: Zainutdinov S.S. – literature analysis, writing of the text; Sivolobova G.F. – literature analysis, writing of the text; Loktev V.B. – approval of the final version of the article, general guidance; Kochneva G.V. – writing of the final version of the article, general guidance.

Funding. This study was performed as part of state assignment FSBI SRC VB «Vector» GZ-37/21.

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

Received 08 October 2021

Accepted 14 November 2021

Published 30 December 2021

Введение

В настоящее время большинство разрабатываемых и используемых для профилактики вирусных инфекций вакцин вводятся парентерально путём внутримышечной инъекции. При таком способе применения происходит выработка системных иммуноглобулинов (Ig) класса G (IgG), предотвращающих генерализацию инфекционного процесса. Однако в плане защиты от вирусных инфекций, для возбудителей которых входными воротами являются слизистые оболочки

(СО), наибольшее значение имеют иммуноглобулины класса А (IgA). Это связано с тем, что продуцируемое в СО количество их намного превышает совокупное содержание всех других изотипов (классов) иммуноглобулинов, а также с высокой вируснейтрализующей активностью IgA [1, 2].

Эффективная индукция антител (АТ) данного класса возможна только при прямой иммунизации СО, поэтому создание мукозальных вакцинных препаратов может преодолеть ограничения существующих инъекционных вакцин в обеспечении первой линии

защиты от вирусной инвазии и распространения инфекции. В большинстве случаев вакцинация СО оказывается также действенной в отношении стимуляции системных иммунных ответов и выработки сывороточных АТ с нейтрализующими свойствами, что отражает перекрёстное взаимодействие между СО и иммунной системой в целом [3]. Важное преимущество мукозальных вакцин – неинъекционный путь введения, что существенно упрощает использование и распространение вакцины среди населения. Кроме того, при этом снижаются риск травмы от укола иглой и вероятность перекрёстного заражения [4].

Структура мукозальной иммунной системы

Слизистая оболочка (*tunica mucosa*) – один из самых крупных органов тела (рис. 1, а). В совокупности она покрывает площадь более 400 м² и включает в себя СО желудочно-кишечного тракта, мочеполовой системы и дыхательных путей. Иммунитет СО реализуется через систему, называемую мукозо-ассоциированной лимфоидной тканью (МАЛТ; *mucosa-associated lymphoid tissue*, MALT) [5]. Она подразделяется на иерархически связанные составные части – отделы (кластеры) в соответствии с анатомическим расположением (рис. 1, б):

- ТАЛТ (лимфоидная ткань, ассоциированная с евстахиевой трубой) (TALT, Eustachian tube-associated lymphoid tissue) – носоглотка, евстахиева (слуховая) труба, среднее ухо;

- НАЛТ (назоассоциированная лимфоидная ткань) (NALT, nasal-associated lymphoid tissue) – носовая полость, ротовая полость, ротоглотка, конъюнктив;

- БАЛТ (бронхоассоциированная лимфоидная ткань) (BALT, bronchus-associated lymphoid tissue) – гортань, трахея, бронхи, лёгкие, молочные железы (у женщин);

- КАЛТ (кишечноассоциированная лимфоидная ткань) (GALT, gut-associated lymphoid tissue) – пищевод, желудок, кишечник (тонкая и толстая кишки), проксимальные и дистальные отделы урогенитального тракта;

- ДАЛТ (дерматоассоциированная лимфоидная ткань) (SALT, skin-associated lymphoid tissues) – кожа (дерма).

Функцию внешнего физического барьера МАЛТ выполняет слой слизи (в случае кожи – ороговевший слой эпителия) (рис. 2). В реализации этой функции на биохимическом и иммунометаболическом уровнях участвуют находящиеся в слизи иммуноглобулины, противомикробные пептиды, цитокины, белки системы комплемента, микробиота и другие компоненты [6]. Под слоем слизи располагается эпителиальная ткань, чаще всего представленная однослойным неороговевающим эпителием, но поверхность кожи и ротовой полости (частично) покрыта клетками многослойного плоского ороговевающего эпителия.

В ответ на инфицирование вирусом эпителиальные клетки продуцируют целый ряд медиаторов и цитокинов, важнейшее значение среди которых принадлежит дефензинам и интерферону (IFN) лямбда (IFN-λ). Клетки эпителия СО не только являются основными продуцентами этого вещества, но и обладают высокой чувствительностью к нему ввиду наличия большого количества специфических рецепторов

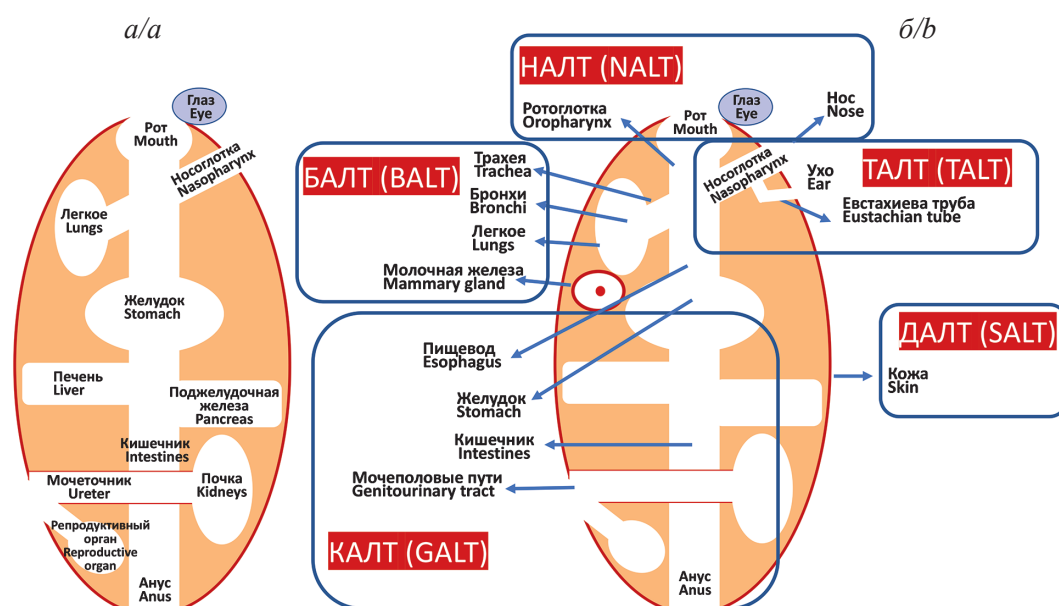


Рис. 1. Схематическое изображение слизистых оболочек и кластеров мукозо-ассоциированной лимфоидной ткани человека:

а) – общее расположение слизистых оболочек и органов, с которыми они контактируют; б) – схема кластеров мукозо-ассоциированной лимфоидной ткани.

Fig. 1. Schematic representation of mucous membranes and clusters of human mucosa-associated lymphoid tissue: а), the general location of the mucous membranes and organs with which they come in contact; б), scheme of clusters of mucosa-associated lymphoid tissue.

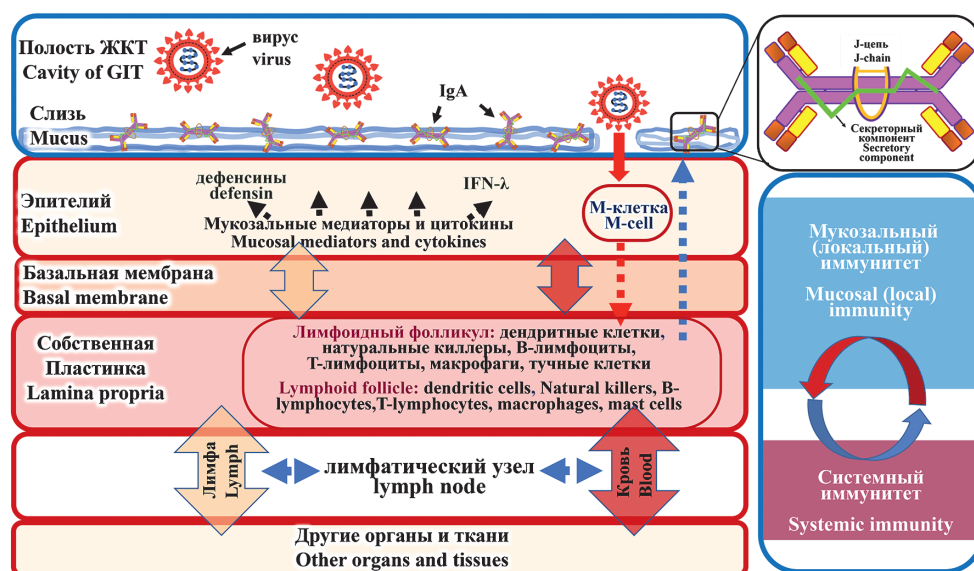


Рис. 2. Структура мукозального иммунитета и его место в общей системе защиты организма от вирусных инфекций слизистых оболочек. На врезке (справа вверху) представлена структура секреторного IgA.

Fig. 2. The structure of mucosal immunity and its place in the general defense system of the body against viral infections of the mucous membranes. Insert (at the top right) shows the structure of secretory IgA.

(interferon lambda receptors, IFNLR) [7]. Помимо запуска противовирусных механизмов IFN-λ индуцирует образование эпителиоцитами других иммуностимулирующих цитокинов, тем самым улучшая характеристики адаптивных иммунных ответов на патологические агенты, атакующие поверхности СО. IFN-λ также снижает выраженность провоспалительной активности интерферонов альфа и бета (IFN-αβ), вырабатываемых мононуклеарными макрофагами, и ингибирует привлечение нейтрофилов, предотвращая тем самым неконтролируемое воспаление, потенциально ведущее к повреждению тканей и усилению прогресса заболевания [8]. Дефензины представляют собой небольшие пептиды длиной 30 а.о. и выполняют роль сигнальных агентов на первой линии защиты макроорганизма от инфекционных патогенов. Они являются связующим звеном между врожденным и адаптивным иммунитетом за счёт хемоаттрактантных и активирующих свойств в отношении моноцитов, Т-лимфоцитов и дендритных клеток. Кроме того, дефензины обладают прямым противовирусным действием, разрушая оболочку вируса; они выступают в качестве агонистов вирусных рецепторов, препятствуя заражению клеток-мишеней, и ингибируют необходимые для репликации вирусов внутриклеточные сигнальные пути [9].

Помимо обычных эпителиоцитов слой клеток эпителия над местами скопления лимфоидных фолликулов содержит также специализированные микро складчатые клетки (М-клетки; microfold cells) [10]. Они лишены слоя слизи, который покрывает другие клетки эпителия СО. М-клетки захватывают и активно транспортируют микроорганизмы либо другой антигенный материал в ниже лежащие лимфоидные

структуры – одиночные (солитарные) фолликулы или пейеровы бляшки (встречающиеся только в подслизистом слое тонкой кишки). Во внеклеточном пространстве лимфоидных фолликулов антиген затем поглощается антигенпрезентирующими клетками (в основном дендритами) с дальнейшей его обработкой и представлением (презентацией) иммунокомпетентным клеткам [11].

Собственная пластинка слизистой оболочки (*lamina propria mucosae*), располагающаяся под эпителием, тоже может включать организованные лимфоидные структуры в виде одиночных фолликулов (рис. 2). Они имеют выраженные Т- и В-клеточные зоны, содержат дендритные клетки и макрофаги. Среди В-клеток преобладают продуцирующие IgA [12].

Молекулы IgA, так же как и IgM, содержат удлинения из 18 аминокислотных остатков на С-концах тяжёлых цепей – хвостовые части (tail-pieces, tp), что обеспечивает их полимер-образующие способности. IgM может независимо олигомеризоваться с образованием пента- и гексамеров, тогда как для полимеризации IgA требуется соединительная цепь (joining chain, JC) из 137 а.о. – белок без известных структурных гомологов. Преобладающей формой для этого класса иммуноглобулинов является секреторный димер (sIgA) (рис. 2, врезка), состоящий из 2 ковалентно связанных J-цепью молекул IgA и секреторного компонента, который приобретает в процессе транзитоза АТ через эпителиальные клетки СО [4].

Все структуры СО «пропитаны», импрегнированы значительным количеством sIgA, которые действуют как первая линия защиты от инвазии патогенов. Они нейтрализуют вирусы и предотвращают инфицирование эпителиальных клеток, выстилающих

СО, а также опосредуют выведение патогенов и предотвращают сборку зрелых вирусных частиц [13]. Дополнительное преимущество IgA основано на их индифферентности по отношению непосредственно к воспалительному процессу – отсутствию как про-, так и противовоспалительной активности, поскольку ни одна из форм IgA, обнаруживаемых как в СО, так и в сыворотке крови, не активирует комплемент [4].

История мукозальной вакцинации против вирусных инфекций

История мукозальной вакцинации берёт начало в Древнем Китае и Индии, где она представляла собой распыление или вдыхание небольших количеств растолчённых корочек из накожных поражений больных оспой (вариоляция). Смертность от оспы вакцинированных подобным образом составляла при этом 0,5–2%, что было существенно меньше уровня естественного заражения (20–30%). Такая вакцинация использовалась в Индии вплоть до 1970-х гг. прошлого столетия [14].

Первая масштабная мукозальная вакцинация, вероятно, была проведена Альбертом Б. Сейбином (Albert B. Sabin) (Соединённые Штаты Америки (США)) и его коллегами из Мексики в 1980-х гг., когда около 4 млн детей были иммунизированы распылённой аттенуированной противокоревой вакциной Эдмонстон Загреб (Edmonston Zagreb) в Мексике и Бразилии. Этот опыт продемонстрировал, что иммунный ответ у детей после аэрозольного способа доставки иммуногена может превосходить таковой при инъекционном введении [15]. Однако ряд последующих испытаний аэрозольной вакцины против кори не смог подтвердить полученные результаты [16].

До настоящего времени одной из актуальных является проблема создания вакцин против синдрома приобретённого иммунодефицита (СПИД) для применения на слизистых оболочках. Исследования среди населения с высокой распространённостью ВИЧ-инфекции неизменно показывают существование небольшой подгруппы лиц, устойчивых к этому заболеванию несмотря на многократные долгосрочные контакты с инфицированными. Приблизительно в 30% случаев это связано с наличием высоких уровней ВИЧ-нейтрализующих sIgA в половых путях и ВИЧ-реактивных Т-клеток в шейке матки. Поскольку 70–80% людей заражаются вирусом иммунодефицита человека (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus*) через СО, наличие мукозального иммунитета играет огромную роль в предотвращении и/или устранении этой инфекции. Для индукции защитного мукозального иммунного ответа на ВИЧ разработан целый ряд вакцинных конструкторов и их комбинаций, включая пептидные, ДНК- и векторные вакцины [17]. Наилучшие результаты показал двухкомпонентный вакцинный препарат SeV-G(NP), в которой в качестве первого компонента, доставляемого интраназально, используется рекомбинантный вирус Сендай (SeV, парамиксовирус мышей – *Paramyxoviridae: Paramyxovirus: Sendai virus*)

со встроенным геном *gag* ВИЧ-1. Второй компонент, рекомбинантный аденовирус 35 с аналогичной встройкой, вводится внутримышечно. Клинические испытания этой вакцины показали, что она вызывает мощную индукцию Т-клеточного ответа и продукцию специфических нейтрализующих АТ к белку *gag* в режиме прайм-буст [18].

Несмотря на то что более 90% вирусов проникают в организм человека через участки СО, к настоящему времени лицензированы лишь несколько мукозальных противовирусных вакцин, перечень которых представлен в табл. 1. Наиболее успешный на сегодняшний день препарат подобного рода – оральная полиомиелитная вакцина (ОПВ) [3]. Как и подавляющее большинство других мукозальных вакцин, она содержит аттенуированные штаммы полиовируса (*Picornaviridae: Enterovirus: Human enterovirus C*). Однако следует отметить, что существенными недостатками использования аттенуированных патогенов в качестве основного компонента вакцины являются риск реактогенности и возможность реверсии к вирулентному штамму, что происходит, как правило, у пациентов с ослабленным иммунитетом, младенцев, пожилых людей и лиц с иммунодефицитными состояниями. Хотя использование ОПВ снизило количество случаев полиомиелита более чем на 99% с 1988 г., все ещё регистрируются вспышки вакциноассоциированного паралитического полиомиелита (ВАПП), которые возникают из-за незначительных генетических изменений, происходящих во время репликации ОПВ у человека [19].

На следующем месте по эффективности и распространённости после полиомиелитных стоят мукозальные вакцины против вирусов гриппа А и В (*Orthomyxoviridae: Influenza {A, B} virus*). Показано, что они вызывают длительный гуморальный и клеточный иммунный ответ, который весьма напоминает сформировавшийся в результате проявления естественного иммунитета [20]. Кроме того, назальная вакцинация обеспечивает повышенную защиту от новых вариантов вируса, а дети и подростки оказываются защищены лучше, чем в случае применения инактивированной инъекционной вакцины против гриппа [21].

Эффективными являются также пероральные капельные вакцинные препараты против ротавируса (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus*) человека. Первой среди них была лицензирована тетравалентная рекомбинантная вакцина Rotashield (1998 г., США). Однако она была довольно быстро изъята из обращения на американском рынке из-за ассоциации с появлением среди вакцинированных данным препаратом инвагинации кишечника (приблизительно у 1 на 10 000 привитых) [22]. В 2004 и 2005 гг. зарегистрированы 2 пероральные ротавирусные вакцины: моновалентная (RV1) Rotarix и пентавалентная (RV5) – RotaTeq. В состав RV1 входит аттенуированный вариант штамма G1P ротавируса человека. RV5 содержит 5 рекомбинантных вариантов, полученных из человеческого и бычьего штаммов ротавирусов [23].

Кроме описанных выше аттенуированных штаммов при разработке мукозальных вакцин в настоящее время применяются и другие подходы, в частности использование безопасных вирусов в качестве векторов для доставки протективно значимых иммуногенов – патогенных вирусов человека (табл. 2).

На основе SeV создана вакцина HPIV-1 против вируса парагриппа человека 1 типа (*Paramyxoviridae: Paramyxovirinae: Respirovirus: Human parainfluenzavirus 1* (hPIV-1)). Испытания показали, что вирус Сендай при введении взрослым и детям в виде назальных капель не вызывал существенных побочных эффектов и индуцировал перекрёстный иммунный ответ против возбудителя парагриппа человека [24]. Кроме того, I фазу клинических испытаний на взрослом контингенте успешно прошла дивакцина RSV/HPIV-1, которая защищает против hPIV-1 за счёт векторной составляющей (SeV) и против респираторно-синциального вируса – за счёт встройки гена протективно значимого белка слияния этого агента (*Paramyxoviri-*

dae: Paramyxovirinae: Pneumovirus: Human respiratory syncytiae virus (HRSV)). Такие результаты стимулируют дальнейшие исследования RSV/HPIV-1 в группах детей, которые наиболее часто подвержены инфекциям – мишеням данной вакцины [25].

Ещё один перспективный вектор для создания мукозальных вакцин – аденовирус (*Adenoviridae: Mastadenoviridae: Human adenovirus* (HAdV)). Разработанная на основе аденовируса 5 типа Ad5 противогриппозная вакцина NasoVAX успешно прошла 2 фазы клинических испытаний. Она индуцировала устойчивый (не менее 6 мес) многокомпонентный иммунный ответ, что позволяет говорить о формировании противовирусной защиты от сезонного гриппа [26].

К настоящему времени имеется целый ряд конструкторов против нового пандемического коронавируса SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) на основе аденовируса [27], в доклинических исследованиях показавших высокий вакцинный потенциал при интраназальном

Таблица 1. Лицензированные мукозальные вакцины против вирусных инфекций человека

Table 1. Licensed mucosal vaccines against human viral infections

Вирус-мишень Target virus	Торговое название Trade name	Тип введения Type of administration	Состав Composition	Производитель Manufacturer
Вирус полиомиелита Polio virus (<i>Picornaviridae: Enterovirus: Human enterovirus C</i>)	Biopolio B1/3	Оральный (капли) Oral (drops)	Аттенуированные штаммы Сейбины, 1 и 3 тип вируса Attenuated Sabin strains, 1 and 3 virus types	Bharat Biotech International Limited, Индия Bharat Biotech International Limited, India
	Вакцина полиомиелитная пероральная 1, 2 и 3 типов Polio vaccine oral 1, 2 and 3 types	Оральный (капли) Oral (drops)	Аттенуированные штаммы Сейбины, 1, 2 и 3 тип вируса Attenuated Sabin strains, 1 and 3 virus types	ФГАНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита), Россия FSASI Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of RAS, Russia
	Orimune	Оральный (капли) Oral (drops)	Аттенуированные штаммы Сейбины, 1, 2 и 3 тип вируса Attenuated Sabin strains, 1 and 3 virus types	Wyeth-Lederle (США), Novartis (Италия), BIBCOL (Индия), BioFarma (Индонезия) и др. Wyeth-Lederle (USA), Novartis (Italy), BIBCOL (India), BioFarma (Indonesia), et al.
Вирусы гриппа А и В Influenza A and B viruses (<i>Orthomyxoviridae: Influenza {A, B} virus</i>)	Flumist/Fluenz	Назальный (спрей) Nasal (spray)	Аттенуированные штаммы вируса гриппа Attenuated influenza virus strains	AstraZeneca (Британия)/ MedImmune (США) AstraZeneca (Great Britain)/ MedImmune (USA)
	Nasovac	Назальный (спрей) Nasal (spray)	Аттенуированные штаммы вируса гриппа Attenuated influenza virus strains	Serum Institute of India Ltd., Индия Serum Institute of India Ltd., India
Ротавирус Rotavirus (<i>Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus A</i>)	Rotarix	Оральный (капли) Oral (drops)	Аттенуированные штаммы ротавируса Attenuated strains of rotavirus	GlaxoSmithKline, Бельгия GlaxoSmithKline, Belgium
	RotaTeq	Оральный (капли) Oral (drops)	Аттенуированные штаммы ротавируса Attenuated strains of rotavirus	Merck Sharp & Dohme Corp., США Merck Sharp & Dohme Corp., USA

введении. Так, вакцины BBV154 и AdCOVID на мышиных (*Muridae*) моделях при однократном введении индуцировали системную продукцию нейтрализующих АТ, высокие уровни sIgA и Т-клеточный ответ СО респираторного тракта, обеспечивая при этом полную защиту от инфицирования SARS-CoV-2 как верхних, так и нижних отделов дыхательных путей [28–30]. Аналогичные результаты получены относительно вакцинных препаратов BBV154 и ChAdOx1-S/nCoV19 в исследованиях на приматах (*Primates*) [31, 32]. Все эти вакцины в настоящее время находятся на I фазе клинических испытаний (табл. 2). Поми-

мо этого, клинические испытания проходят векторные вакцинные препараты на основе вируса гриппа человека (*Orthomyxoviridae: Influenza {A...C} virus*) (DeINS1-nCoVVRBD LAIV) и респираторно-синцитиального вируса (MV-014-212), а также вакцина на основе аттенуированного штамма SARS-CoV-2 (COVI-VAC) [27].

В целом накопленная к настоящему времени информация по патогенезу инфекции COVID-19 свидетельствует о центральной роли СО (в особенности НАЛТ) в инициации, клиническом развитии и распространении этого заболевания [33]. Как свидетельствуют

Таблица 2. Противовирусные интраназальные вакцины человека, находящиеся на разных стадиях клинических испытаний

Table 2. Antiviral human nasal vaccines in different stages of clinical trials

Вакцина Vaccine	Вирус-мишень Target virus	Состав Composition	Разработчик Manufacturer	Номер регистрации Registration No.
HPIV-1	Вирус парагриппа человека 1 типа (hPIV-1) Human parainfluenza virus type 1 (hPIV-1) (<i>Paramyxoviridae: Paramyxovirinae: Respirovirus: Human parainfluenzavirus 1</i> (hPIV-1))	Немодифицированный вирус Сендай (SeV) Unmodified Sendai virus (SeV)	Школа общественного здравоохранения Блумберга Джона Хопкинса Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health	NCT00641017
RSV/HPIV-1	Респираторно-синцитиальный вирус (RSV) и вирус парагриппа человека 1 типа (hPIV-1) Respiratory syncytial virus (RSV) and hPIV-1 (<i>Paramyxoviridae: Paramyxovirinae: Pneumovirus: Human respiratory syncytiae virus (HRSV)</i>) (<i>Paramyxoviridae: Paramyxovirinae: Respirovirus: Human parainfluenzavirus 1</i> (hPIV-1))	Рекомбинантный SeV, экспрессирующий белок слияния RSV Recombinant SeV expressing RSV fusion protein	Национальный институт аллергии и инфекционных заболеваний National Institute of Allergy and Infectious Diseases	NCT03473002
NasoVAX	Вирус гриппа Influenza virus (<i>Orthomyxoviridae: Influenza {A...C} virus</i>)	Рекомбинантный аденовирус Ad5., экспрессирующий гемагглютинин вируса гриппа А (H1N1) Recombinant Ad5 adenovirus expressing influenza A virus hemagglutinin (H1N1)	Altimmune, Inc.	NCT03760549
ChAdOx1-S/nCoV-19		Рекомбинантный аденовирус шимпанзе (ChAd), экспрессирующий S-белок SARS-CoV-2 Recombinant chimpanzee adenovirus (ChAd) expressing the SARS-CoV-2 S-protein	Оксфордский университет University of Oxford	NCT04816019
BBV154 AdCOVID		Рекомбинантный ChAd, экспрессирующий S-белок SARS-CoV-2 Recombinant ChAd expressing the SARS-CoV-2 S-protein	Bharat Biotech International Limited	NCT04751682
DeINS1-nCoVVRBD LAIV	Коронавирус SARS-CoV-2 nCoV-19 (<i>Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus</i>)	Рекомбинантный Ad5, экспрессирующий RBD-домен S-белка SARS-CoV-2 Recombinant Ad5 expressing the RBD domain of the SARS-CoV-2 S protein	Altimmune, Inc.	NCT04679909
		Рекомбинантный вирус гриппа, экспрессирующий RBD-домен S-белка SARS-CoV-2 Recombinant influenza virus expressing the RBD domain of the SARS-CoV-2 S protein	Университет Гонконга The University of Hong Kong	NCT04809389
MV-014-212		Рекомбинантный RSV, экспрессирующий S-белок SARS-CoV-2 Recombinant RSV expressing SARS-CoV-2 S-Protein	Meissa Vaccines, Inc.	NCT04798001
COVI-VAC		Аттенуированный штамм SARS-CoV-2 Attenuated strain SARS-CoV-2	Codagenix, Inc.	NCT04619628

исследования таксономически и структурно сходных коронавирусов (SARS-CoV и MERS-CoV), мукозальная вакцинация может обеспечить безопасный и эффективный способ индукции не только длительного иммунитета СО, но и системной иммунной защиты от SARS-CoV-2 [34, 35].

Заключение

Несмотря на то что более 90% вирусных патогенов проникают в организм человека через СО, к настоящему времени лицензировано лишь ограниченное количество мукозальных противовирусных вакцин – против полиомиелита, гриппа и ротавируса [3]. СО также являются входными воротами для источника современной пандемии SARS-CoV-2, поэтому для быстрой остановки инфекции огромное значение имеет иммунизация МАЛТ на всех её структурно-иерархических уровнях (главным образом НАЛТ). По сравнению с инъекционными вакцинами, на производстве которых сосредоточены огромные усилия фармацевтических компаний, интраназальные вакцинные препараты обеспечивают дополнительные уровни защиты, такие как sIgA и резидентные В- и Т-клетки памяти в СО дыхательных путей [27]. Мукозальные sIgA более эффективно по сравнению с циркулирующими IgG нейтрализуют вирусные агенты при респираторных инфекциях. В свою очередь, резидентные В- и Т-клетки памяти, которые одними из первых взаимодействуют с антигеном и реагируют быстрее, чем клетки системной памяти, препятствуют репликации вируса, уменьшают его распространение и передачу. Важно отметить, что при парентеральной иммунизации образуются циркулирующие IgA, которые при этом не являются полноценным аналогом мукозальных sIgA [2].

При создании мукозальных вакцин принципиальным является наличие в них живых вирусов, способных преодолевать многочисленные барьеры СО и достигать лимфатических фолликулов, где происходит формирование полноценного иммунного ответа. Живые вирусные частицы плотно упакованы и содержат на своей поверхности гликопротеины, полисахаридные цепочки которых защищают белки от ферментативной деградации. Эти же гликопротеины обеспечивают связывание вируса с клеточными рецепторами, запуская процесс распознавания вирусных антигенов системой иммунитета. Для создания векторных мукозальных вакцинных препаратов целесообразно использовать непатогенные или репликативно-дефектные варианты вирусов, входными воротами для которых служит СО. Такие формы доставки иммуногена в организм способны эффективно индуцировать мукозальный иммунный ответ, обеспечивая долгосрочную защиту от вирусной инфекции. Все лицензированные на сегодняшний день мукозальные противовирусные вакцины созданы на основе аттенуированных штаммов вирусов человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. Terauchi Y., Sano K., Aina A., Saito S., Taga Y., Ogawa-Goto K., et al. IgA polymerization contributes to efficient virus neutralization on human upper respiratory mucosa after intranasal inactivated

- influenza vaccine administration. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2018; 14(6): 1351–61. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1438791>
2. Russell M.W., Moldoveanu Z., Ogra P.L., Mestecky J. Mucosal Immunity in COVID-19: A Neglected but Critical Aspect of SARS-CoV-2 Infection. *Front. Immunol.* 2020; 11: 611337. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.611337>
3. Miquel-Clopes E.G., Bentley J.P., Stewart S.R., Carding S.R. Mucosal vaccines and technology. *Clin. Exp. Immunol.* 2019; 196(2): 205–14. <https://doi.org/10.1111/cei.13285>
4. Travis C.R. As plain as the nose on your face: The case for a nasal (mucosal) route of vaccine administration for Covid-19 disease prevention. *Front. Immunol.* 2020; 11: 591897. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.591897>
5. Лусс Л.В., Шартанова Н.В., Назарова Е.В. Аллергический и неаллергический ринит: эффективность барьерных методов. *Эффективная фармакотерапия*. 2018; (17): 10–6.
6. Козлов И.Г. Микробиота, мукозальный иммунитет и антибиотик: тонкости взаимодействия. *Русский медицинский журнал*. 2018; 26(8-1): 19–27.
7. Ye L., Schnepf D., Staeheli P. Interferon- λ orchestrates innate and adaptive mucosal immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2019; 19(10): 614–25. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0182-z>
8. Broggi A., Tan Y., Granucci F., Zanoni I. IFN- λ suppresses intestinal inflammation by non-translational regulation of neutrophil function. *Nat. Immunol.* 2017; 18(10): 1084–93. <https://doi.org/10.1038/ni.3821>
9. Fruitwala S., El-Naccache D.W., Chang T.L. Multifaceted immune functions of human defensins and underlying mechanisms. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2019; 88: 163–72. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.023>
10. Шубелко Р.В., Зуйкова И.Н., Шульженко А.Е. Мукозальный иммунитет верхних дыхательных путей. *Иммунология*. 2018; 39(1): 81–8. <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-81-88>
11. Хаитов М.Р., Ильина Н.И., Лусс Л.В., Бабахин А.А. Мукозальный иммунитет респираторного тракта и его роль при профессиональных патологиях. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2017; 61(3): 8–24.
12. Coffey J.W., Gaiha G.D., Traverso G. Oral biologic delivery: advances towards oral subunit, DNA and mRNA vaccines and the potential for mass vaccination during pandemics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2021; 61: 517–40. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-030320-092348>
13. Kumar N., Arthur C.P., Ciferri C., Matsumoto M.L. Structure of the secretory immunoglobulin A core. *Science*. 2020; 367(6481): 1008–14. <https://doi.org/10.1126/science.aaz5807>
14. Hickey A.J., Garmise R.J. Dry powder nasal vaccines as an alternative to needle-based delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 2009; 26(1): 1–27. <https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v26.i1.10>
15. Bennett J.V., De Castro J.F., Valdespino-Gomez J.L., Garcia-Garcia M. de L., Islas-Romero R., Echaniz-Aviles G., et al. Aerosolized measles and measles-rubella vaccines induce better measles antibody booster responses than injected vaccines: Randomized trials in Mexican schoolchildren. *Bull. World Health Organ.* 2002; 80(10): 806–12. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/268635> (accessed November 14, 2021).
16. Hellfritzsch M., Scherlie R. Mucosal vaccination via the respiratory tract. *Pharmaceutics*. 2019; 11(8): 375. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080375>
17. Kozlowski P.A., Aldovini A. Mucosal vaccine approaches for prevention of HIV and SIV transmission. *Curr. Immunol. Rev.* 2019; 15(1): 102–22. <https://doi.org/10.2174/1573395514666180605092054>
18. Nyombayire J., Anzala O., Gazzard B., Karita E., Bergin F., Hayes P., et al. First-in-human evaluation of the safety and immunogenicity of an intranasally administered replication-competent Sendai virus-vectored HIV type 1 gag vaccine: Induction of potent T-cell or antibody responses in prime-boost regimens. *J. Infect. Dis.* 2017; 215(1): 95–104. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw500>
19. Jorba J., Diop O.M., Iber J., Henderson E., Zhao K., Sutter R.W., et al. Update on vaccine-derived polioviruses – worldwide, January 2017 – June 2018. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2018; 67(42): 1189–94. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6742a5>
20. Dhere R., Yeolekar L., Kulkarni P., Menon R., Vaidya V., Ganguly M., et al. A pandemic influenza vaccine in India: From strain to sale

- within 12 months. *Vaccine*. 2011; 29(Suppl. 1): A16–21. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.119>
21. Belshe R.B., Edwards K.M., Vesikari T., Black S.V., Walker R.E., Hultquist M., et al. Attenuated versus inactivated influenza vaccine in infants and young children. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356(7): 685–96. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa065368>
22. Murphy T.V., Gargiullo P.M., Massoudi M.S., Nelson D.B., Jumaan A.O., Okoro C.A., et al. Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344(8): 564–72. <https://doi.org/10.1056/NEJM200102223440804>
23. Rotavirus vaccines WHO position paper: January 2013 – Recommendations. *Vaccine*. 2013; 31(52): 6170–1. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.037>
24. Adderson E., Branum K., Sealy R.E., Jones B.G., Surman S.L., Penkert R. Safety and immunogenicity of an intranasal Sendai virus-based human parainfluenza virus type 1 vaccine in 3- to 6-year-old children. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015; 22(3): 298–303. <https://doi.org/10.1128/CI.00618-14>
25. Huang F.S., Bernstein D.I., Slobod K.S., Portner A., Takimoto T., Russell S.J., et al. Safety and immunogenicity of an intranasal Sendai virus-based vaccine for human parainfluenza virus type I and respiratory syncytial virus (SeVRSV) in adults. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2021; 17(2): 554–9. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1779517>
26. Tasker S., O'Rourke A.N., Suyundikov A., Booth P.-G.J., Bart S., Krishnan V., et al. Safety and immunogenicity of a novel intranasal influenza vaccine (NasoVAX): A phase 2 randomized, controlled trial. *Vaccines*. 2021; 9(3): 224. <https://doi.org/10.3390/vaccines9030224>
27. Lund F.E., Randall T.D. Scent of a vaccine. *Science*. 2021; 373(6553): 397–9. <https://doi.org/10.1126/science.abg9857>
28. King R.G., Silva-Sanchez A., Peel J.N., Botta D., Dickson A.M., Pinto A.K., et al. Single-dose intranasal administration of AdCOVID elicits systemic and mucosal immunity against SARS-CoV-2 and fully protects mice from lethal challenge. *Vaccines (Basel)*. 2021; 9(8): 881. <https://doi.org/10.3390/vaccines9080881>
29. Hassan A.O., Kafai N.M., Dmitriev I.P., Fox J.M., Smith B.K., Harvey I.B., et al. A single-dose intranasal ChAd vaccine protects upper and lower respiratory tracts against SARS-CoV-2. *Cell*. 2020; 183(1): 169–84.E13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.026>
30. Hassan A.O., Shrihari S., Gorman M.J., Ying B., Yuan D., Raju S., et al. An intranasal vaccine durably protects against SARS-CoV-2 variants in mice. *Cell Rep.* 2021; 36(4): 109452. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109452>
31. Hassan A.O., Feldmann F., Zhao H., Curiel D.T., Okumura A., Tang-Huau T.L., et al. A single intranasal dose of chimpanzee adenovirus-vectored vaccine protects against SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques. *Cell Rep. Med.* 2021; 2(4): 100230. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100230>
32. Doremalen N., Purushotham J.N., Schulz J.E., Holbrook M.G., Bushmaker T., Carmody F., et al. Intranasal ChAdOx1 nCoV-19/AZD1222 vaccination reduces viral shedding after SARS-CoV-2 D614G challenge in preclinical models. *Sci. Transl. Med.* 2021; 13(607): eabh0755. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abh0755>
33. Gallo O., Locatello L.G., Mazzoni A., Novelli L., Annunziato F. The central role of the nasal microenvironment in the transmission, modulation, and clinical progression of SARS-CoV-2 infection. *Mucosal Immunol.* 2020; 14(2): 305–16. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-00359-2>
34. Moreno-Fierros L., García-Silva I., Rosales-Mendoza S. Development of SARS-CoV-2 vaccines: should we focus on mucosal immunity? *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2020; 20(8): 831–6. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1767062>
35. Mudgal R., Nehul S., Tomar S. Prospects for mucosal vaccine: shutting the door on SARS-CoV-2. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2020; 16(12): 2921–31. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1805992>
2. Russell M.W., Moldoveanu Z., Ogra P.L., Mestecky J. Mucosal Immunity in COVID-19: A Neglected but Critical Aspect of SARS-CoV-2 Infection. *Front. Immunol.* 2020; 11: 611337. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.611337>
3. Miquel-Clopes E.G., Bentley J.P., Stewart S.R., Carding S.R. Mucosal vaccines and technology. *Clin. Exp. Immunol.* 2019; 196(2): 205–14. <https://doi.org/10.1111/cei.13285>
4. Kozlov I.G. As plain as the nose on your face: The case for a nasal (mucosal) route of vaccine administration for Covid-19 disease prevention. *Front. Immunol.* 2020; 11: 591897. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.591897>
5. Luss L.V., Shartanova N.V., Nazarova E.V. Allergic and non-allergic rhinitis: effectiveness of barrier methods [*Allergicheskii i neallergicheskii rinit: effektivnost' bar'ernykh metodov*]. *Effektivnaya farmakoterapiya*. 2018; (17): 10–6. (in Russian)
6. Kozlov I.G. Microbiota, mucosal immunity and antibiotics: the fineness of the interaction [*Mikrobiota, mukozal'nyy immunitet i antibiotiki: tonkosti vzaimodeystviya*]. *Russkiiy meditsinskiy zhurnal*. 2018; 26(8-1): 19–27. (in Russian)
7. Ye L., Schnepf D., Staeheli P. Interferon- λ orchestrates innate and adaptive mucosal immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2019; 19(10): 614–25. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0182-z>
8. Broggi A., Tan Y., Granucci F., Zanoni I. IFN- λ suppresses intestinal inflammation by non-translational regulation of neutrophil function. *Nat. Immunol.* 2017; 18(10): 1084–93. <https://doi.org/10.1038/ni.3821>
9. Fruitwala S., El-Naccache D.W., Chang T.L. Multifaceted immune functions of human defensins and underlying mechanisms. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2019; 88: 163–72. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.02.023>
10. Shchubelko R.V., Zuykova I.N., Shul'zhenko A.E. Mucosal immunity of the upper respiratory tract [*Mukozal'nyy immunitet verkhnikh dykhatel'nykh putey*]. *Immunologiya*. 2018; 39(1): 81–8. <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2018-39-1-81-88>
11. Khaitov M.R., Il'ina N.I., Luss L.V., Babakhin A.A. Mucosal immunity of the respiratory tract and its role in occupational pathologies [*Mukozal'nyy immunitet respiratornogo trakta i ego rol' pri professional'nykh patologiyakh*]. *Meditsina ekstremal'nykh situatsiy*. 2017; 61(3): 8–24. (in Russian)
12. Coffey J.W., Gaiha G.D., Traverso G. Oral biologic delivery: advances towards oral subunit, DNA and mRNA vaccines and the potential for mass vaccination during pandemics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2021; 61: 517–40. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-030320-092348>
13. Kumar N., Arthur C.P., Ciferri C., Matsumoto M.L. Structure of the secretory immunoglobulin A core. *Science*. 2020; 367(6481): 1008–14. <https://doi.org/10.1126/science.aaz5807>
14. Hickey A.J., Garmise R.J. Dry powder nasal vaccines as an alternative to needle-based delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 2009; 26(1): 1–27. <https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v26.i1.10>
15. Bennett J.V., De Castro J.F., Valdespino-Gomez J.L., Garcia-Garcia M. de L., Islas-Romero R., Echaniz-Aviles G., et al. Aerosolized measles and measles-rubella vaccines induce better measles antibody booster responses than injected vaccines: Randomized trials in Mexican schoolchildren. *Bull. World Health Organ.* 2002; 80(10): 806–12. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/268635> (accessed November 14, 2021).
16. Hellfritzsche M., Scherlie R. Mucosal vaccination via the respiratory tract. *Pharmaceutics*. 2019; 11(8): 375. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080375>
17. Kozłowski P.A., Aldovini A. Mucosal vaccine approaches for prevention of HIV and SIV transmission. *Curr. Immunol. Rev.* 2019; 15(1): 102–22. <https://doi.org/10.2174/1573395514666180605092054>
18. Nyombayire J., Anzala O., Gazzard B., Karita E., Bergin F., Hayes P., et al. First-in-human evaluation of the safety and immunogenicity of an intranasally administered replication-competent Sendai virus-vectored HIV type 1 gag vaccine: Induction of potent T-cell or antibody responses in prime-boost regimens. *J. Infect. Dis.* 2017; 215(1): 95–104. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw500>
19. Jorba J., Diop O.M., Iber J., Henderson E., Zhao K., Sutter R.W., et al. Update on vaccine-derived polioviruses – worldwide, January 2017 – June 2018. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2018; 67(42): 1189–94. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6742a5>

References

1. Terauchi Y., Sano K., Aina A., Saito S., Taga Y., Ogawa-Goto K., et al. IgA polymerization contributes to efficient virus neutralization on human upper respiratory mucosa after intranasal inactivated influenza vaccine administration. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2018; 14(6): 1351–61. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1438791>

20. Dhere R., Yeolekar L., Kulkarni P., Menon R., Vaidya V., Ganguly M., et al. A pandemic influenza vaccine in India: From strain to sale within 12 months. *Vaccine*. 2011; 29(Suppl. 1): A16–21. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.119>
21. Belshe R.B., Edwards K.M., Vesikari T., Black S.V., Walker R.E., Hultquist M., et al. Attenuated versus inactivated influenza vaccine in infants and young children. *N. Engl. J. Med.* 2007; 356(7): 685–96. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa065368>
22. Murphy T.V., Gargiullo P.M., Massoudi M.S., Nelson D.B., Jumaan A.O., Okoro C.A., et al. Intussusception among infants given an oral rotavirus vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344(8): 564–72. <https://doi.org/10.1056/NEJM200102223440804>
23. Rotavirus vaccines WHO position paper: January 2013 – Recommendations. *Vaccine*. 2013; 31(52): 6170–1. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.037>
24. Adderson E., Branum K., Sealy R.E., Jones B.G., Surman S.L., Penkert R. Safety and immunogenicity of an intranasal Sendai virus-based human parainfluenza virus type 1 vaccine in 3- to 6-year-old children. *Clin. Vaccine Immunol.* 2015; 22(3): 298–303. <https://doi.org/10.1128/CVI.00618-14>
25. Huang F.S., Bernstein D.I., Slobod K.S., Portner A., Takimoto T., Russell S.J., et al. Safety and immunogenicity of an intranasal Sendai virus-based vaccine for human parainfluenza virus type I and respiratory syncytial virus (SeVRSV) in adults. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2021; 17(2): 554–9. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1779517>
26. Tasker S., O'Rourke A.N., Suyundikov A., Booth P.-G.J., Bart S., Krishnan V., et al. Safety and immunogenicity of a novel intranasal influenza vaccine (NasoVAX): A phase 2 randomized, controlled trial. *Vaccines*. 2021; 9(3): 224. <https://doi.org/10.3390/vaccines9030224>
27. Lund F.E., Randall T.D. Scent of a vaccine. *Science*. 2021; 373(6553): 397–9. <https://doi.org/10.1126/science.abg9857>
28. King R.G., Silva-Sanchez A., Peel J.N., Botta D., Dickson A.M., Pinto A.K., et al. Single-dose intranasal administration of AdCOVID elicits systemic and mucosal immunity against SARS-CoV-2 and fully protects mice from lethal challenge. *Vaccines (Basel)*. 2021; 9(8): 881. <https://doi.org/10.3390/vaccines9080881>
29. Hassan A.O., Kafai N.M., Dmitriev I.P., Fox J.M., Smith B.K., Harvey I.B., et al. A single-dose intranasal ChAd vaccine protects upper and lower respiratory tracts against SARS-CoV-2. *Cell*. 2020; 183(1): 169–84.E13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.026>
30. Hassan A.O., Shrihari S., Gorman M.J., Ying B., Yuan D., Raju S., et al. An intranasal vaccine durably protects against SARS-CoV-2 variants in mice. *Cell Rep.* 2021; 36(4): 109452. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109452>
31. Hassan A.O., Feldmann F., Zhao H., Curiel D.T., Okumura A., Tang-Huau T.L., et al. A single intranasal dose of chimpanzee adenovirus-vectored vaccine protects against SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques. *Cell Rep. Med.* 2021; 2(4): 100230. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100230>
32. Doremalen N., Purushotham J.N., Schulz J.E., Holbrook M.G., Bushmaker T., Carmody F., et al. Intranasal ChAdOx1 nCoV-19/AZD1222 vaccination reduces viral shedding after SARS-CoV-2 D614G challenge in preclinical models. *Sci. Transl. Med.* 2021; 13(607): eabh0755. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abh0755>
33. Gallo O., Locatello L.G., Mazzoni A., Novelli L., Annunziato F. The central role of the nasal microenvironment in the transmission, modulation, and clinical progression of SARS-CoV-2 infection. *Mucosal Immunol.* 2020; 14(2): 305–16. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-00359-2>
34. Moreno-Fierros L., García-Silva I., Rosales-Mendoza S. Development of SARS-CoV-2 vaccines: should we focus on mucosal immunity? *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2020; 20(8): 831–6. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1767062>
35. Mudgal R., Nehul S., Tomar S. Prospects for mucosal vaccine: shutting the door on SARS-CoV-2. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2020; 16(12): 2921–31. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1805992>

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-68>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



Молекулярная эволюция вируса Даби (*Phenuiviridae: Bandavirus: Dabie bandavirus*) – возбудителя острой лихорадки с тромбоцитопеническим синдромом

Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Борисевич С.В.

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

Со времени идентификации вируса Даби (ВД; прежнее название – вирус SFTS, SFTSV) (*Phenuiviridae: Bandavirus: Dabie bandavirus*) вызванные им эпидемии острой лихорадки с тромбоцитопеническим синдромом (severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS) произошли в нескольких странах Восточной Азии. Быстрый рост заболеваемости указывает на то, что этот инфекционный агент имеет пандемический потенциал и представляет собой надвигающуюся глобальную угрозу для общественного здравоохранения.

В настоящем обзоре проведён анализ молекулярной эволюции возбудителя острой лихорадки с тромбоцитопеническим синдромом на материале его вариантов, выделенных в Китайской Народной Республике (КНР), Японии и Южной Корее (Республика Корея). Установлены скорость процесса эволюции и возможное время появления общего предка ВД, а также продемонстрирована возможность его реассортации.

Скорость эволюции генома ВД оценена как $2,28 \times 10^{-4}$ нуклеотидных замен/сайт/год для S-сегмента, $2,42 \times 10^{-4}$ для М-сегмента и $1,19 \times 10^{-4}$ замен/сайт/год – для L-сегмента. В геноме вируса определены позиции положительной селекции.

Филогенетический анализ установил, что ВД разделён на 2 клады, содержащие 6 различных генотипов. Структура филогенетических деревьев для L-, S- и М-сегментов указывает на происхождение всех генотипов от одного общего предка.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что ВД использует множественные механизмы для повышения уровня изменчивости. Понимание филогенетических факторов, определяющих трансмиссию данного патогена, имеет важное значение для оценки эпидемиологических характеристик вызываемого им заболевания и прогноза возможных его вспышек.

Ключевые слова: острая лихорадка с тромбоцитопеническим синдромом; вирус Даби (ВД); род *Bandavirus*; семейство *Phenuiviridae*; молекулярная эволюция; сегменты генома; филогенетический анализ; скорость эволюции; генотипы, обзор

Для цитирования: Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. Молекулярная эволюция вируса Даби (*Phenuiviridae: Bandavirus: Dabie bandavirus*) – возбудителя острой лихорадки с тромбоцитопеническим синдромом. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(6): 409-416. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-68>

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@mil.ru

Участие авторов: Сизикова Т.Е. – сбор и обобщение информации, написание текста; Лебедев В.Н. – обобщение результатов филогенетического анализа вируса Даби; Борисевич С.В. – оценка скорости эволюции сегментов геномной РНК вируса Даби и родственных представителей рода *Bandavirus*, редактирование текста статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 31.09.2021

Принята в печать 14.11.2021

Опубликована 30.12.2021

REVIEW ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-68>

The molecular evolution of Dabie bandavirus (*Phenuiviridae: Bandavirus: Dabie bandavirus*), the agent of severe fever with thrombocytopenia syndrome

Tatiana E. Sizikova, Vitaliy N. Lebedev, Sergey V. Borisevich

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

Since the Dabie bandavirus (DBV; former SFTS virus, SFTSV) was identified, the epidemics of severe fever with thrombocytopenic syndrome (SFTS) caused by this virus have occurred in several countries in East Asia. The rapid increase in incidence indicates that this infectious agent has a pandemic potential and poses an imminent global public health threat.

The analysis of molecular evolution of SFTS agent that includes its variants isolated in China, Japan and South Korea was performed in this review. The evolution rate of DBV and the estimated dates of existence of the common ancestor were ascertained, and the possibility of reassortation was demonstrated.

The evolutionary rates of DBV genome segments were estimated to be 2.28×10^{-4} nucleotides/site/year for S-segment, 2.42×10^{-4} for M-segment, and 1.19×10^{-4} for L-segment. The positions of positive selection were detected in the viral genome.

Phylogenetic analyses showed that virus may be divided into two clades, containing six different genotypes. The structures of phylogenetic trees for S-, M- and L-segments showed that all genotypes originate from the common ancestor.

Data of sequence analysis suggest that DBV use several mechanisms to maintain the high level of its genetic diversity. Understanding the phylogenetic factors that determine the virus transmission is important for assessing the epidemiological characteristics of the disease and predicting its possible outbreaks.

Key words: severe fever with thrombocytopenia syndrome virus; Dabie bandavirus; genus *Bandavirus*; family *Phenuiviridae*; molecular evolution; segments of genome; phylogenetic analyses; evolutionary rate; genotypes; review

For citation: Sizikova T.E., Lebedev V.N., Borisevich S.V. The molecular evolution of Dabie bandavirus (*Phenuiviridae: Bandavirus: Dabie bandavirus*), the agent of severe fever with thrombocytopenia syndrome. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(6): 409-416 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-68>

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

Information about the authors:

Sizikova T.E., <http://orcid.org/0000-0002-1817-0126>

Lebedev V.N., <http://orcid.org/0000-0002-6552-4599>

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

Contribution: Sizikova T.E. – collecting and summarizing information, writing of the text; Lebedev V.N. – summary of the results of the phylogenetic analysis of the Dabie bandavirus; Borisevich S.V. – estimating the rate of evolution of genomic RNA segments of the Dabie bandavirus and related member of *Bandavirus* genus, editing of the article.

Funding. The research was funded by the State budget.

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

Received 31 September 2021

Accepted 14 November 2021

Published 30 December 2021

Введение

Острая лихорадка с тромбоцитопеническим синдромом (severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS) представляет собой вирусное заболевание, характеризующееся гипертермией, тромбоцито- и лейкопенией, симптомами поражения желудочно-кишечного тракта и нервной системы, а также проявлениями геморрагического синдрома. Летальность при ней составляет от 6 до 30% [1–3]. Возбудитель заболевания во время

первичного выделения (в 2009 г.) был отнесён к роду *Phlebovirus* семейства *Bunyaviridae* и предварительно назван вирусом SFTS [4, 5]. В настоящее время согласно классификации Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) этот агент носит название «вирус Даби» (ВД) (*Dabie bandavirus*, DBV) и относится к роду *Bandavirus* семейства *Phenuiviridae* порядка *Bunyavirales* [6]. Анализ информации о SFTS свидетельствует, что данная нозологическая форма представляет потенциальную опасность для обществен-

ного здравоохранения Российской Федерации [3, 7–11]. Это обусловливается наличием эпидемических очагов в сопредельных с дальневосточным регионом РФ территориях, широким ареалом распространения клещей (*Acari*) видов *Haemaphysalis longicornis* и *Rhipicephalus microplus* – основных векторов передачи инфекции [4], повсеместно встречающихся в Китайской Народной Республике (КНР) и смежных регионах [10]. В пользу указанного положения свидетельствуют также высокая летальность при заболевании, сложность его идентификации по клинической картине, а также отсутствие в РФ средств не только профилактики и лечения, но и диагностики. Дополнительные потенциальные проблемы может создать установленная возможность инфицирования человека при передаче возбудителя SFTS от заражённых животных [12]. В трансмиссии ВД важную роль может играть антропогенная деятельность (выпас животных и туризм) [13].

Целью представленного обзора является анализ молекулярной эволюции ВД – возбудителя острой лихорадки с тромбоцитопеническим синдромом.

Структурные особенности вируса Даби

Строение генома ВД соответствует таковому для других представителей рода *Bandavirus*. Геном состоит из 3 сегментов (L, M и S) «минус»-РНК. L-сегмент включает 6368 п.н. и содержит 1 открытую рамку считывания, кодирующую 2084 аминокислоты (РНК-зависимая РНК-полимераза). M-сегмент состоит из 3366 п.н. и содержит также 1 открытую рамку считывания, кодирующую 1073 аминокислоты (предшественник гликопротеинов Gn и Gc). Наконец, S-сегмент, содержащий 1744 п.н., имеет амбисенсную организацию, кодирует белок нуклеокапсиды NP в антисмысловой ориентации и вирусный неструктурный белок (NSs) – в смысловой ориентации [4, 14].

Все выделенные на протяжении 2009–2010 гг. изоляты ВД по нуклеотидной последовательности генома являются близкородственными; уровень гомологии по всем геномным сегментам составляет 96%. Концевые участки всех 3 сегментов у ВД, как и у других представителей семейства *Phenuiviridae*, содержат короткие консервативные 5'- и 3'-нетранслируемые области. Будучи высококомплементарными, они формируют петлевидную структуру сегментов РНК [15].

Указанные 5'- и 3'- концевые области всех 3 сегментов генома сходны с таковыми для других вирусов рода *Bandavirus* семейства *Phenuiviridae* порядка *Bunyavirales* [15]. Данные полногеномного секвенирования показали, что ВД вместе с вирусами Гуэрту (GTV), Хартленд (HRTV), Малсур (MV), вирусами группы острова Хантер (HIGV) и Бханджа (BHAV) образуют монофилетическую группу в пределах рода *Bandavirus* [16].

Изучение последовательностей генома вируса Даби

Филогенетический анализ, проведённый с помощью определения полноразмерных последовательностей L-, M- и S-сегментов ВД, установил, что данный возбу-

дитель занимает промежуточное положение между 2 другими группами рода *Bandavirus* семейства *Phenuiviridae* (группа сицилийской москитной лихорадки, в которую помимо одноименного вируса (SFSV) входят также вирусы лихорадки долины Рифт (ВЛДР, RVFV), Пунта-Торо (PTV), Тоскана и Массила, и группа вируса Укуни-еми (UUKV). Следовательно, рассматриваемый вирус является прототипным агентом третьей группы рода *Bandavirus*. Близкородственными ВД являются вирусы HRTV, MV и вирусы группы острова Хантер. Они выделены от больных людей в США, летучих мышей (*Chiroptera*) в Индии и клещей в Австралии [17–20].

По структуре генома ВД наиболее близок к вирусу Укуни-еми, уровень гомологии с которым по L-, M- и S-сегментам РНК составляет 34, 24 и 29% соответственно [8]. Эти данные нашли подтверждение в ходе сравнительного анализа аминокислотных последовательностей структурных белков ВД и других представителей рода *Bandavirus* семейства *Phenuiviridae*. Выявлено, что РНК-зависимая РНК-полимераза и гликопротеины ВД в наибольшей степени близкородственны соответствующим вирусам Укуни-еми, однако белок нуклеокапсиды ВД наиболее близок к аналогичному структурному протеину ВЛДР (уровень гомологии 41,4%). Наиболее уникальным аминокислотным составом характеризуется неструктурный белок NSs, для которого уровень гомологии с другими представителями *Bandavirus* находится на низком уровне (от 11,2 до 16,0%) [21].

Полные последовательности L-, M- и S-сегментов генома ВД депонированы в GenBank (№ KF358691, KF358692 и KF358693 соответственно). Они являются достаточно близкими, что свидетельствует о наличии общего предка [1].

При анализе геномных последовательностей изолятов ВД, выделенных в КНР в 2009–2011 гг., первоначально была установлена циркуляция 2 линий возбудителя. С учётом характера различий между ними наиболее вероятно, что данные линии являются продуктом гомологичной рекомбинации в процессе молекулярной эволюции вируса [6]. Последующие исследования сообщили о наличии 5 генотипов ВД, циркулирующих на территории КНР [7, 11, 17, 18]. Исследование геномной структуры варианта, изолированного в Японии, указывает на его близкое родство со штаммами ВД из КНР. При этом влияние пространственных и/или временных факторов выделения возбудителя на изменение его генетического материала не установлено [5].

Проведена также идентификация изолята вируса, детектированного в провинции Канвондо (Южная Корея). Секвенирование геномной РНК выявило его близкое родство по отношению к штаммам, выделённым на территории КНР и Японии. Уровень гомологии по сегментам L, M и S составил 95,8–99,8, 94,1–99,9 и 94,8–99,7% соответственно [1].

Установление закономерностей молекулярной эволюции вируса Даби

С целью характеристики молекулярной эволюции ВД и эпидемиологии вызываемого им забо-

левания выполнен детальный филогенетический анализ изолятов из КНР, Южной Кореи и Японии [13]. Проанализировано 125 последовательностей S-сегмента, 100 последовательностей М-сегмента и 99 – L-сегмента. Филогенетические деревья для всех сегментов геномной РНК построены с применением метода максимального правдоподобия (maximum likelihood) в программном обеспечении MEGA v.5. Филогенетический анализ осуществлён с использованием модели BSP (Bayesian skyline pilot) при помощи программы BEAST (версия 1.8.2). При расчёте времени расхождения различных линий ВД от общего предка сравнивали общее соотношение числа несинонимических и синонимических нуклеотидных замен для генов белков L, M, NP и NSs. Наличие селективного отбора для L- и М-сегментов РНК, а также генов белков NSs и NP подтверждали с помощью метода прямой эволюции белковой последовательности [22].

Филогенетические деревья для сегментов L, М и S, построенные согласно методу байесовского анализа, имели сходную топологическую структуру. Построенное при анализе геномных последовательностей сегмента S филогенетическое дерево представлено на рисунке.

В ходе филогенетического анализа, проведённого по каждому сегменту генома для 122 штаммов ВД, выделенных между 2010 и 2014 гг., в т.ч. 108 штаммов из КНР (61 из провинции Хэнань, 21 из провинции Цзянсу, 8 – из провинции Шаньдун, 7 из провинции Ляонин, 4 из провинции Хубэй, 4 из провинции Аньхой и 3 – из провинции Чжэцзян), 8 штаммов из Японии и 6 – из Южной Кореи, установлено наличие 5 генотипов (линии А, В, С, D, Е). Линия А содержит наибольшее число штаммов вируса (55). Все они, за исключением 1 выделенного в Южной Корее штамма Gangwon, изолированы на территории КНР. Там же детектированы все штаммы, входящие в линию В (провинции Хэнань, Цзянсу, Шаньдун, Аньхой, Ляонин). Линия С включает также 2 штамма из КНР, выделенные в провинциях Шаньдун и Цзянсу (КНР); большинство штаммов линии D изолированы в КНР и 1 (KASJH) – в Южной Корее. Наконец, к линии Е отнесены все 8 штаммов, выделенные в Японии, 3 штамма из архипелага Чжоушань в Восточно-Китайском море и 4 – с о. Чеджудо (Южная Корея). Следовательно, штаммы ВД из КНР представлены во всех генотипах, штаммы из Южной Кореи входят в линии А, D и Е, в то время как штамм из Японии относится к линии Е [24].

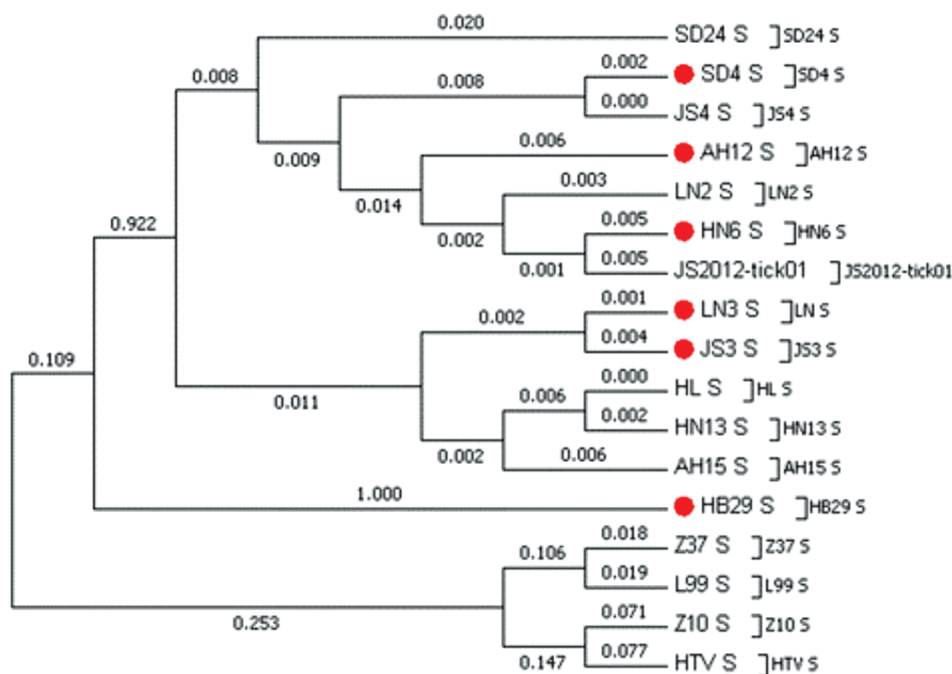


Рис. Филогенетическое дерево вируса Даби, построенное при анализе S-сегмента геномной РНК [23].

При построении дерева использованы последовательности S-сегмента геномной РНК штаммов SD24 (номер последовательности в GenBank HM802205.1), SD4 (HM802204.1), JS4 (HQ141606.1), AH12 (HQ141591.1), LN2 (HQ141609.1), HN6 (HQ141597.1), JS2012-tick01 (KC473542.1), LN3 (HQ141612.1), JS3 (HQ141603.1), HL (KF791952.1), HN13 (HQ141600.1), AH15 (HQ141594.1), HB29 (HM745932), Z37 (AF187082.1), L99 (AF288299.1), Z10 (EF533944.1) и HTV (U37768.1).

Примечание. Красными точками обозначены штаммы, выбранные для сравнения.

Fig. The phylogenetic tree based on S-segment of Dabie bandavirus genomic RNA [22].

The sequences of S-segment of genomic RNA of strains SD24 (sequence number in GenBank HM802205.1), SD4 (HM802204.1), JS4 (HQ141606.1), AH12 (HQ141591.1), LN2 (HQ141609.1), HN6 (HQ141597.1), JS2012-tick01 (KC473542.1), LN3 (HQ141612.1), JS3 (HQ141603.1), HL (KF791952.1), HN13 (HQ141600.1), AH15 (HQ141594.1), HB29 (HM745932), Z37 (AF187082.1), L99 (AF288299.1), Z10 (EF533944.1), and HTV (U37768.1) are used.

Note. The red dots indicate the strains selected for comparison.

В дальнейшем выявлено, что филогенетические деревья для сегментов L и M содержат 6 различных генотипов, обозначенных как A, B, C, D, E и F, а S-сегмент включает 5 генотипов (за исключением генотипа линии D). Результаты, полученные позже, указывают на присутствие 2 субгенотипов в генотипе F, который образуют главным образом штаммы из Японии и КНР [19]. При этом 2 штамма, выделенные в провинции Чжэцзян (КНР) [23], формируют субгенотип I генотипа F.

Таким образом, в результате филогенетического анализа установлено, что ВД может быть разделён на 2 клады, содержащие 6 генотипов [9, 15, 16, 25]. Структура филогенетических деревьев для L-, S- и M-сегментов этих генотипов указывает на то, что все они происходят от одного общего предка. Это, в свою очередь, служит свидетельством наличия коциркуляции различных вариантов вируса, в особенности относящихся к одному генотипу. Штаммы из разных мест выделения, относящиеся к одному генотипу, имеют выраженное родство, за исключением генотипа D, содержащего только 1 штамм. С другой стороны, в пределах одного и того же генотипа пространственные факторы эволюции могут не иметь определяющего значения [13]. Штаммы, изолированные в Японии и Южной Корее, являются близкородственными по отношению к таковым из КНР [5, 9, 25]. В частности, выделенные на территории Южной Кореи, как и циркулирующие в провинции Аньхой (КНР), штаммы отнесены к генотипу A. Штаммы ВД, выделенные от клещей и других животных (а также от больных людей), распределены по эволюционным ветвям филогенетического дерева. В то же время изолированные на одной и той же территории штаммы также могут относиться к различным ветвям, т.е. влияние географического фактора не всегда является преобладающим [9, 15, 16, 25].

A. Li и соавт. [16] провели исследование 72 полногеномных последовательностей РНК ВД. Результаты позволили дополнить уже имеющиеся данные; были получены в том числе отсутствовавшие сведения о последовательностях геномной РНК штаммов, выделенных в ключевых эпидемических регионах, включая провинции Шаньдун, Ляонин и Хубэй (КНР) [13, 21].

Установление явления реассортации для вируса Даб

У ВД, как и у других вирусов, геном которых представлен сегментированной «минус»-РНК, выявлено наличие феномена реассортации [17, 26, 27]. Роль данного процесса в эволюции РНК-содержащих вирусов хорошо известна [28–33]. Он является важной детерминантой вирусного выживания и диверсификации. Например, реассортация вируса гриппа может привести к появлению новых пандемических штаммов [34].

Для реассортации необходимо, чтобы геном вируса состоял как минимум из 2 сегментов. Когда 2 или более вируса одновременно инфицируют одну клетку, распределение геномных сегментов в потомстве

происходит случайным образом. Следовательно, потомство может иметь данные сегменты более чем от одного родителя, и в результате их смешения повышается генетическая вариабельность. Значение этого процесса для выживания и диверсификации вируса демонстрирует антигенный дрейф, обычно наблюдаемый у вируса гриппа. Реассортация может приводить к возрастанию патогенности и способности к трансмиссии различными векторами [35]. У представителей семейства *Bunyaviridae* в ходе реассортации обычно происходит обмен сегментами М геномной РНК. Для ВД первоначально была установлена реассортация при участии S-сегмента [15, 29] и лишь затем – М- и L-сегментов [13]. Продукты генов L- и S-сегментов играют большую роль в процессах вирусной транскрипции и репликации. Несмотря на то что уровень идентичности этих сегментов у различных генотипов высокий, установлено возможное влияние их реассортации на степень репликации и патогенность вируса [13]. Следовательно, обнаружение рассматриваемого явления имеет большое значение для мониторинга SFTS.

Доказательством наличия феномена реассортации ВД служит установленный факт потенциальной принадлежности отдельных сегментов одного и того же штамма к различным генотипам. Так, штамм AHL по результатам анализа L-сегмента отнесён к генотипу E, по данным изучения M-сегмента – к генотипу B и S-сегмента – к генотипу D [22]. Результаты L. Liu и соавт. указывают на 2 случая реассортации для изученных нуклеотидных последовательностей штаммов. L- и S-сегменты штаммов LN2012_41, LN2012_42, LN2012_12 и LN2012_34 принадлежат к генотипу B, в то время как их же M-сегменты – к генотипу A. У штамма LN2012_58 M- и S-сегменты относятся к генотипу A, а L-сегмент – к генотипу B [13].

В процессе анализа полногеномных последовательностей 122 штаммов ВД, выделенных в КНР, Японии и Южной Корее, установлено, что 14 из них являются реассортантами. Реассортация M- и S-сегментов выявлена у 9 штаммов: HL/Injected, HL/Egg/G2, HL/Larvae/G2, HL/Nymph/G2, HL/Adult/G2, HN13, 2012YXX1, HN_278 и LN2012-58. У 5 штаммов – LN2012-14, LN2012-34, LN2012-41, LN2012-42 и AHL – обнаружена реассортация в S-сегменте. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что для ВД наличие реассортантных вариантов является частым событием [24].

A. Li с соавт., проанализировав 72 полногеномных последовательности РНК, 292 последовательности L-сегмента, 302 последовательности M-сегмента и 502 – S-сегмента, выявили 37 предполагаемых последствий генетической рекомбинации. Наибольшая частота рекомбинации (5,1%) установлена для L-сегмента; для M- и S-сегментов этот показатель составил 3,6 и 0,8% соответственно. Выявлено также 12 реассортантов ВД, 6 из которых представляют вновь идентифицированные формы. Кроме того, мутационный анализ установил наличие 7 сайтов мутаций, которые потенциально могут быть использованы

для классификации генотипов. Явления рекомбинации и реассортации геномной РНК ВД продемонстрированы в пробах из клещей [16].

Изучение особенностей эволюции вируса Даби

Относительно времени появления ВД в литературе приводятся различные временные интервалы. Согласно результатам байесовского анализа, базирующегося на данных по отдельным сегментам генома, этот возбудитель возник 50–225 лет назад, впервые появившись, вероятно, в провинции Хуаянган (КНР) [13]. По мнению же других исследователей, ВД появился 50–150 лет назад [2]. В соответствии с данными А. Li и соавт., полученными с помощью коалесцентного анализа, вирус возник в начале XVIII в. на территории китайской провинции Чжэцзян, при этом генотип F был наиболее ранним [16].

Скорость эволюции генома ВД оценена как $2,28 \times 10^{-4}$, $2,42 \times 10^{-4}$ и $1,19 \times 10^{-4}$ нуклеотидных замен/сайт/год для S-, M- и L-сегментов генома соответственно. Следовательно, скорость эволюции сегментов генома РНК ВД различна, будучи максимальной для сегмента M и минимальной – для L [24].

L. Liu и соавт. при анализе этого параметра ВД установили, что общий предок для его различных генотипов возник ~182–194 года назад. Данный инфекционный агент появился 42 (95% доверительный интервал, I_{95} 20–87) года назад в горной местности Даби (Центральный Китай), где располагаются провинции Хэнань, Хубэй, Аньхой, Цзянсу. Около 37 (I_{95} 8–77) лет назад вирус проник в провинцию Шаньдун из Хэнань и 33 (I_{95} 16–67) года назад – из Цзянсу в провинцию Ляонин на Северо-Востоке Китая. Затем ВД распространился на архипелаг Чжоушань в Восточно-Китайском море, о. Чеджудо (Южная Корея) и Японию приблизительно 31 (I_{95} 13–61) год назад, став эндемичным для данных областей [13].

Начало расхождения от общего предка для всех 5 линий относится к 1972 г. (I_{95} 1927–1992 гг.): для линии A – 1987 г. (I_{95} 1962–2003 гг.), для линии B – 1977 г. (I_{95} 1937–1996 гг.), для D – 1981 г. (I_{95} 1947–1998 гг.) и для линии E – 1983 г. (I_{95} 1953–2001 гг.).

Линии A и C дивергировали друг от друга в 1978 г. (I_{95} 1940–1996 гг.). В 1976 г. (I_{95} 1930–1995 гг.) линия D, в свою очередь, дивергировала от линий A и C. Разделение линий B и E произошло в 1974 г.

Эволюционные характеристики генотипов вируса Даби, основанные на результатах анализа L-, M- и S-сегментов генома (данные L. Liu и соавт. [13])

The evolutionary characteristics of Dabie bandavirus genotypes based on the results of the analysis of L-, M- and S- genome segments (according to Liu L. et al. [13])

Сегмент генома Genome segment	Генотип Genotype	Время расхождения генотипов вируса Даби от общего предка, лет The time of Dabie bandavirus genotype divergence from a common ancestor, years	
		Среднее значение Average value	I_{95}
L	A	92,7	27,3–211,4
	B	170,0	50,3–391,8
	C	10,0	4,5–26,8
	D	214,9	76,2–606,1
	E	90,5	29,5–228,0
	F	230,6	68,8–548,3
M	A	50,8	20,4–102,7
	B	78,6	31,6–160,3
	C	10,8	4,8–20,3
	D	118,1	45,0–227,8
	E	45,9	18,9–92,4
	F	111,9	43,9–228,2
S	A	67,4	17,2–117,9
	B	111,9	27,6–200,7
	C	12,2	3,6–21,6
	D	н.д. n.d.	н.д. n.d.
	E	56,2	14,5–100,9
	F	157,3	37,5–281,4

Примечание. i_{95} – 95% доверительный интервал; н.д. – отсутствие данных.

Note. i_{95} , 95% confidence interval; n.d., no data.

(I_{95} 1932–1994 гг.). Время расхождения генотипов ВД от общего предка составляет по результатам анализа S-сегмента 191 (I_{95} 51–381) год назад; по данным изучения М-сегмента 182 (I_{95} 73–353) года назад; по результатам анализа L-сегмента – значительно ранее, 294 (I_{95} 82–681) года назад [20]. Данные по дивергенции для каждого генотипа представлены в **таблице**.

Аналогичные показатели для этих 6 генотипов получены с помощью байесовского коалесцентного анализа. Установлено, что L- и S-сегменты генотипов В и F старше, чем соответствующие сегменты других генотипов, однако результаты анализа М-сегмента показывают, что генотипы D и F ранее произошли от общего предка [13]. Относительно генотипа С данные, основанные на анализе L-, М- и S-сегментов ВД, свидетельствуют о его недавнем возникновении, возможно, во втором десятилетии XXI в. [13].

Установление положительной селекции вируса Даб

Данные относительно скорости эволюции и время расхождения генотипов ВД от общего предка указывают на то, что основным фактором природного селективного давления является естественный отбор [7, 17]. Показатель селективного давления на этот вирус определяли по соотношению dN/dS (отношение количества несинонимических замен к синонимическим) с помощью программного пакета HyPhy на базе сервера Datamonkey (<http://www.datamonkey.org/>). В случае М-сегмента эта величина (0,14) была относительно выше, чем для L-сегмента и генов *NP* и *NSs*, кодируемых S-сегментом. У гена белка *NP* значение показателя dN/dS (0,089) оказалось большим, чем у гена белка *NSs* (0,0371). Величина dN/dS для гена белка L была равной 0,048 [13].

Выявление положительной и отрицательной селекции проведено методами FEL (fixed effects likelihood), IFEL (internal branch fixed-effects likelihood), FUBAR (fast unconstrained Bayesian approximation) и MEME (mixed-effects model of evolution; multiple EM for motif elicitation) из пакета программ HyPhy [13]. При помощи метода IFEL определено, что позиции 243 и 1353 L-сегмента, а также участки 36 и 500 М-сегмента являются результатом положительной селекции. С помощью метода FEL показана положительная селекция позиции 322 сегмента М. Наряду с этим с применением обоих методов не установлена положительная селекция в генах белков NC или NSs [13].

При использовании метода FUBAR продемонстрировано, что в генах белков *L*, *M*, *NSs*, *NP* содержится от 26 до 56% позиций, представляющих результат отрицательной селекции. Этот показатель был выше для L-сегмента (56%) и ниже – для М-сегмента и гена *N* (47 и 39% соответственно). Для гена белка *NSs* установлено наименьшее значение среди сравниваемых генов – 26%. Положительная позиция в селекции идентифицирована лишь у М-сегмента (позиции 322 и 641).

В целях выявления фиксированных и более случайных положительных позиций селекции использован

метод MEME. С его помощью обнаружены 5 позиций в L-сегменте (20, 243, 1653, 1656 и 1749) и 9 – в М-сегменте (позиции 323, 384, 553, 638, 641, 650, 925 и 1032). Только 1 аналогичная позиция положительной селекции (228) зарегистрирована в гене белка *NSs*. Анализ селективного давления на ВД демонстрирует, что позитивная селекция по геномным сегментам L, М и гену белка *NSs* выявлена у 4 генотипов (А, С, D, Е) из 6 изученных [13].

При определении скорости эволюции ВД и времени происхождения генотипов данного возбудителя от общего предка установлено, что эволюция рассматриваемого вируса происходит в 2–4 раза медленнее по сравнению с ВЛДР. Этот факт подтверждает точку зрения, согласно которой РНК-содержащие вирусы, векторами передачи которых являются комары (*Culicidae*), эволюционируют более быстро в сравнении с вирусами того же семейства, для которых векторами передачи служат клещи [13].

Заключение

Таким образом, для определения эпидемиологических характеристик SFTS и прогноза возможных эпидемических вспышек ключевое значение имеет понимание филогенетических факторов, определяющих трансмиссию возбудителя инфекции. С момента идентификации ВД вызванные им эпидемии произошли в нескольких странах Восточной Азии. Быстрый рост заболеваемости SFTS указывает на то, что рассматриваемый патоген имеет эпидемический потенциал и представляет собой реальную опасность для общественного здравоохранения [36–38].

Анализ эволюции генома ВД позволил установить вероятное время происхождения от общего предка, выявить феномены реассортации и положительной селекции. Имеющиеся данные позволяют предположить, что этот инфекционный агент потенциально способен использовать множественные механизмы для повышения уровня изменчивости.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Kim K.H., Yi J., Kim G., Choi S.J., Jun K.I., Kim M.H., et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome, South Korea, 2012. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(11): 1892–4. <https://doi.org/10.3201/eid1911.130792>
- Yu X.J., Liang M.F., Zhang S.Y., Liu Y., Li J.D., Sun Y.L., et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364(16): 1523–32. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1010095>
- Zhao L., Zhai S., Wen H., Cui F., Chi Y., Wang L., et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, Shandong Province, China. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(6): 963–5. <https://doi.org/10.3201/eid1806.111345>
- Niu G., Li J., Liang M., Jiang X., Jiang M., Yin H., et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus among domesticated animals, China. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(5): 756–63. <https://doi.org/10.3201/eid1905.120245>
- Takahashi T., Maeda K., Suzuki T., Ishido A., Shigeoka T., Tomimaga T., et al. The first identification and retrospective study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan. *J. Infect. Dis.* 2014; 209(6): 816–27. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit603>
- ICTV Taxonomy history: Dabie bandavirus. https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=201900166 (accessed October 14, 2021).
- Lam T., Liu W., Bowden T.A., Gui N., Zhuang L., Liu K., et al. Evolutionary and molecular analysis of the emergent severe fever with

- thrombocytopenia syndrome virus. *Epidemics*. 2013; 5(1): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2012.09.002>
8. Xu B., Liu L., Huang X., Ma H., Zhang Y., Du Y., et al. Metagenomic Analysis of Fever, Thrombocytopenia and Leukopenia Syndrome (FTLS) in Henan Province, China: Discovery of a New Bunyavirus. *PLoS Pathog.* 2011; 7(11): e1002369. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002369>
 9. Yoshikawa T., Shimojima M., Fukushi S., Tani H., Fukuma A., Taniguchi S. Phylogenetic and geographic relationships of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in China, South Korea, and Japan. *J. Infect. Dis.* 2015; 212(6): 889–98. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv144>
 10. Zhang Y.Z., Zhou D.J., Qin X.C., Tian J.H., Xiong Y., Wang J.B., et al. The Ecology, Genetic Diversity, and Phylogeny of Huaiyangshan Virus in China. *J. Virol.* 2012; 86(5): 2864–8. <https://doi.org/10.1128/JVI.06192-11>
 11. Zhang Y.Z., Zhou D.J., Xiong Y. Hemorrhagic fever caused by a novel tick-borne Bunyavirus in Huaiyanshan, China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi (Chinese Journal of Epidemiology)*. 2011; 32(3): 209–20. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2011.03.001>
 12. Yamanaka A., Kirino Y., Fujimoto S., Ueda N., Himeji D., Miura M., et al. Direct transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus from domestic cat to veterinary personnel. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(12): 2994–8. <https://doi.org/10.3201/eid2612.191513>
 13. Liu L., Chen W., Yang Y., Jiang Y. Molecular evolution of fever, thrombocytopenia and leukocytopenia virus (FTLSV) based on whole-genome sequences. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 39: 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.12.022>
 14. Qu B., Qi X., Wu X., Liang M., Li C., Cardona C.J. Suppression of the interferon and NF- κ B responses by severe fever with thrombocytopenia syndrome virus. *J. Virol.* 2012; 86(16): 8388–401. <https://doi.org/10.1128/JVI.00612-12>
 15. Matsuno K., Weisend C., Travassos da Rosa A.P., Anzick S.L., Dahlstrom E., Porcella S.F., et al. Characterization of the Bhanja serogroup viruses (*Bunyaviridae*): a novel species of the genus *Phlebovirus* and its relationship with other emerging tick-borne phleboviruses. *J. Virol.* 2013; 87(7): 3719–28. <https://doi.org/10.1128/JVI.02845-12>
 16. Li A., Liu L., Wu W., Liu Y., Huang X., Li C., et al. Molecular evolution and genetic diversity analysis of SFTS virus based on next-generation sequencing. *Biosaf. Health.* 2021; 3(2): 105–15. <https://doi.org/10.1016/j.bsheat.2021.02.002>
 17. Huang X., Liu L., Du Y., Wu W., Wang H., Su J. The evolutionary history and spatiotemporal dynamics of the fever, thrombocytopenia and leukocytopenia syndrome virus (FTLSV) in China. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014; 8(10): 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003237>
 18. McMullan L.K., Folk S.M., Kelly A.J., MacNeil A., Goldsmith C.S., Metcalfe M.G., et al. A new phlebovirus associated with severe febrile illness in Missouri. *N. Engl. J. Med.* 2012; 367(9): 834–41. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1203378>
 19. Mourya D.T., Yadav P.D., Basu A., Shete A., Patil D.Y., Zawar D., et al. Malsoor Virus, a Novel Bat Phlebovirus, is Closely Related to Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus and Heartland Virus. *J. Virol.* 2014; 88(6): 3605–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.02617-13>
 20. Wang J., Selleck P., Yu M., Ha W., Rootes C., Gales R., et al. Novel phlebovirus with zoonotic potential isolated from ticks, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(6): 1040–3. <https://doi.org/10.3201/eid2006.140003>
 21. Chen X., Ye H., Li S., Jiao B., Wu J., Zeng P., et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus inhibits exogenous Type I IFN signaling pathway through its NSs *in vitro*. *PLoS One.* 2017; 12(2): e0172744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172744>
 22. Liu L., Chen W., Yang Y., Jiang Y. Molecular evolution of fever, thrombocytopenia and leukocytopenia virus (FTLSV) based on whole-genome sequences. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 39: 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.12.022>
 23. Kosakovsky P.S.L., Poon A.F., Leigh B.A.J., Frost S.D. A maximum likelihood method for detecting directional evolution in protein sequences and its application to influenza A virus. *Mol. Biol. Evol.* 2008; 25(9): 1809–24. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn123>
 24. Lu S., Wang L., Bai D., Li U. Establishment of national reference for bunyavirus nucleic acid detection kits for diagnosis of SFTS virus. *Virol. J.* 2017; 14(1): 32. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0682-z>
 25. Liu J.W., Zhao L., Luo L.M., Liu M.M., Sun Y., Su X., et al. Molecular evolution and spatial transmission of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus based on complete genome sequences. *PLoS One.* 2016; 11(3): e0151677. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151677>
 26. Feng C., Zhang L., Sun Y., Shao B., Mao H., Jiang J., et al. Genome sequencing and the molecular evolutionary analysis of a SFTSV isolated from Zhejiang province. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi (Chinese journal of preventive medicine)*. 2014; 48(7): 612–6. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2014.07.016> (in Chinese)
 27. Ding N.Z., Luo Z.F., Niu D.D., Ji W., Kang X.H., Cai S.S., et al. Identification of two severe fever with thrombocytopenia syndrome virus strains originating from reassortment. *Virus Res.* 2013; 178(2): 543–6. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.09.017>
 28. Fu Y., Li S., Zhang Z., Man S., Li X., Zhang W. Phylogeographic analysis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus from Zhoushan Islands, China: implication for transmission across the ocean. *Sci. Rep.* 2016; 6: 19563. <https://doi.org/10.1038/srep19563>
 29. Bowen M.D., Trappier S.G., Sanchez A.J., Meyer R.F., Goldsmith C.S., Zaki S.R., et al. A reassortant bunyavirus isolated from acute hemorrhagic fever cases in Kenya and Somalia. *Virology.* 2001; 291(2): 185–90. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1201>
 30. Briese T., Bird B., Kapoor V., Jacoby D.R., Lipkin W.I. Batai and Ngari viruses: M segment reassortment and association with severe febrile disease outbreaks in East Africa. *J. Virol.* 2006; 80(11): 5627–30. <https://doi.org/10.1128/jvi.02448-05>
 31. Chandler L.J., Hogge G., Endres M., Jacoby D.R., Nathanson N., Beaty B.J. Reassortment of La Crosse and Tahyna bunyaviruses in *Aedes triseriatus* mosquitoes. *Virus Res.* 1991; 20(2): 181–91. [https://doi.org/10.1016/0168-1702\(91\)90108-8](https://doi.org/10.1016/0168-1702(91)90108-8)
 32. Gerrard S.R., Li L., Barrett A.D., Nichol S.T. Ngari virus is a Bunyamwera virus reassortant that can be associated with large outbreaks of hemorrhagic fever in Africa. *J. Virol.* 2004; 78(16): 8922–6. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.16.8922-8926.2004>
 33. Saeed M.F., Wang H., Suderman M., Beasley D.W., Travassos da Rosa A., Li L., et al. Jatobal virus is a reassortant containing the small RNA of Oropouche virus. *Virus Res.* 2001; 77(1): 25–30. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(01\)00262-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(01)00262-3)
 34. Deadly new flu virus in US and Mexico may go pandemic. <https://www.newscientist.com/article/dn17025-deadly-new-flu-virus-in-us-and-mexico-may-go-pandemic/?ignored=irrelevant> (accessed October 14, 2021).
 35. Ding F., Zhang W., Wang L., Hu W., Soares Magalhães R.J., Sun H., et al. Epidemiologic features of severe fever with thrombocytopenia syndrome in China, 2011–2012. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 56(11): 1682–3. <https://doi.org/10.1093/cid/cit100>
 36. Alberts B., Bray D., Roberts K., Lewis J., Raff M. *Essential Cell Biology: An Introduction to the Molecular Biology of the Cell*. London: Taylor & Francis; 1997.
 37. Casel M.A., Park S.J., Choi Y.K. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus: emerging novel phlebovirus and their control strategy. *Exp. Mol. Med.* 2021; 53: 713–22. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00610-1>
 38. Sato Y., Mekata H., Sudaryatma P.E., Kirino Y., Yamamoto S., Ando S., et al. Isolation of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus from various tick species in area with human severe fever with thrombocytopenia syndrome cases. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2021; 21(5): 378–84. <https://doi.org/10.1089/vbz.2020.2720>

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-86>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Молекулярные методы диагностики новой коронавирусной инфекции: сравнение петлевой изотермической амплификации и полимеразной цепной реакции

Акимкин В.Г., Петров В.В., Красовитов К.В., Борисова Н.И., Котов И.А., Родионова Е.Н., Черкашина А.С., Кондрашева Л.Ю., Тиванова Е.В., Хафизов К.Ф.

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

Введение. В настоящее время основой молекулярной диагностики большинства инфекционных заболеваний является использование полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР; reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR). Альтернативой этому методу при решении диагностических задач могут выступать технологии, основанные на петлевой изотермической амплификации с обратной транскрипцией (ОТ-ИТ; reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP). В данном исследовании нами выполнено сравнение ОТ-ИТ и ОТ-ПЦР с целью анализа как преимуществ, так и недостатков обоих подходов.

Материал и методы. При проведении экспериментов использованы наборы реагентов, предназначенные для анализа на основе ОТ-ПЦР и ОТ-ИТ. В работе использовался биологический материал, полученный из мазков со слизистой оболочки рото- и носоглотки у лиц с симптомами новой коронавирусной инфекции.

Результаты. В ходе исследования протестирован 381 образец РНК вируса SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) от различных пациентов. Полученные значения порогового числа циклов (cycle threshold, Ct) для ОТ-ПЦР составили в среднем $20,0 \pm 3,7$ (диапазон $15,30 \pm 300$ с), для ОТ-ИТ – $12,8 \pm 3,7$ (диапазон 550 ± 160 с). Исходя из теоретических предпосылок, в качестве гипотетической была предложена линейная зависимость представленных величин; коэффициент корреляции составил $\approx 0,827$. При этом для проб с низкой вирусной нагрузкой (ВН) более высокие значения Ct при ОТ-ИТ не всегда соответствовали таковым в случае ОТ-ПЦР.

Обсуждение. Мы отметили существенное преимущество во времени при выполнении анализа с помощью ОТ-ИТ по сравнению с ОТ-ПЦР, что может быть важно в условиях тестирования большого количества образцов. Разработанные на основе методики ОТ-ИТ тест-системы в силу простоты в использовании и относительной быстроты получения результата могут быть применены в процессе массового скрининга с целью выявления лиц со средней и высокой ВН, представляющих наибольшую угрозу распространения SARS-CoV-2. В свою очередь, диагностические методы на базе ОТ-ПЦР подходят в том числе для оценки ВН и её динамики у пациентов с COVID-19.

Ключевые слова: коронавирусная инфекция; коронавирус SARS-CoV-2; полимеразная цепная реакция (ПЦР); петлевая изотермическая амплификация с обратной транскрипцией (ОТ-ИТ)

Для цитирования: Акимкин В.Г., Петров В.В., Красовитов К.В., Борисова Н.И., Котов И.А., Родионова Е.Н., Черкашина А.С., Кондрашева Л.Ю., Тиванова Е.В., Хафизов К.Ф. Молекулярные методы диагностики новой коронавирусной инфекции: сравнение петлевой изотермической амплификации и полимеразной цепной реакции. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(6): 417–424. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-86>

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

Участие авторов: Акимкин В.Г. – написание резюме, научное редактирование и общая редакция статьи; Петров В.В. – руководство разработкой набора реагентов на основе петлевой изотермической амплификации; Красовитов К.В. – написание текста, разработка набора реагентов на основе петлевой изотермической амплификации; Борисова Н.И. – написание текста, выполнение экспериментов; Котов И.А. – написание текста, подготовка иллюстраций, анализ данных; Родионова Е.Н. – руководство разработкой и производством наборов реагентов; Черкашина А.С. – разработка наборов реагентов, приготовление контрольных образцов; Кондрашева Л.Ю. – организация сбора биологического материала и первичного тестирования с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией; Тиванова Е.В. – организация сбора биологического материала; Хафизов К.Ф. – написание текста, сбор и обработка материалов, подготовка иллюстраций, общая редакция статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора) (Протокол № 111 от 22 декабря 2020 г.)

Поступила 18.10.2021

Принята в печать 24.11.2021

Опубликована 30.12.2021

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-86>

Molecular methods for diagnosing novel coronavirus infection: comparison of loop-mediated isothermal amplification and polymerase chain reaction

Vasiliy G. Akimkin, Vadim V. Petrov, Kirill V. Krasovitsov, Nadezhda I. Borisova, Ivan A. Kotov, Elena N. Rodionova, Anna S. Cherkashina, Larisa Yu. Kondrasheva, Elena V. Tivanova, Kamil F. Khafizov

FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor), Moscow, 111123, Russia

Introduction. Currently, the basis for molecular diagnostics of most infections is the use of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Technologies based on reverse transcription isothermal loop amplification (RT-LAMP) can be used as an alternative to RT-PCR for diagnostic purposes. In this study, we compared the RT-LAMP and RT-PCR methods in order to analyze both the advantages and disadvantages of the two approaches.

Material and methods. For the study, we used reagent kits based on RT-PCR and RT-LAMP. The biological material obtained by taking swabs from the mucous membrane of the oropharynx and nasopharynx in patients with symptoms of a new coronavirus infection was used.

Results. We tested 381 RNA samples of the SARS-CoV-2 virus (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) from various patients. The obtained values of the threshold cycle (Ct) for RT-PCR averaged 20.0 ± 3.7 s (1530 ± 300 s), and for RT-LAMP 12.8 ± 3.7 s (550 ± 160 s). Proceeding from the theoretical assumptions, a linear relationship between values obtained in two kits was proposed as a hypothesis; the correlation coefficient was approximately 0.827. At the same time, for samples with a low viral load (VL), the higher Ct values in RT-LAMP did not always correlated with those obtained in RT-PCR.

Discussion. We noted a significant gain in time for analysis using RT-LAMP compared to RT-PCR, which can be important in the context of testing a large number of samples. Being easy to use and boasting short turnaround time, RT-LAMP-based test systems can be used for mass screening in order to identify persons with medium and high VLs who pose the greatest threat of the spread of SARS-CoV-2, while RT-PCR-based diagnostic methods are also suitable for estimation of VL and its dynamics in patients with COVID-19.

Key words: coronavirus infection; coronavirus SARS-CoV-2; polymerase chain reaction (PCR); reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)

For citation: Akimkin V.G., Petrov V.V., Krasovitsov K.V., Borisova N.I., Kotov I.A., Rodionova E.N., Cherkashina A.S., Kondrasheva L.Yu., Tivanova E.V., Khafizov K.F. Molecular methods for diagnosing novel coronavirus infection: comparison of loop-mediated isothermal amplification and polymerase chain reaction. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(6): 417-424. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-86>

For correspondence: Kamil' F. Khafizov, Ph.D. (Biol.), Head, Scientific Group for the Development of New Diagnostic Methods, Molecular Diagnostics and Epidemiology Department, FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor), Moscow, 111123, Russia. E-mail: kkhafizov@gmail.com

Information about the authors:

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

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

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

Borisova N.I., <http://orcid.org/0000-0002-9672-0648>

Kotov I.A., <http://orcid.org/0000-0003-2416-5689>

Rodionova E.N., <https://orcid.org/0000-0003-0192-1832>

Cherkashina A.S., <https://orcid.org/0000-0002-1888-4903>

Kondrasheva L.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-0147-4262>

Tivanova E.V., <http://orcid.org/0000-0003-1286-2612>
Khafizov K.F., <http://orcid.org/0000-0001-5524-0296>

Contribution: Akimkin V.G. – writing of the resume, scientific editing and general editing of the article; Petrov V.V. – leadership in the development of a kit based on loop-mediated isothermal amplification; Krasovtsov K.V. – writing of the text, developing a set of reagents based on loop-mediated isothermal amplification; Borisova N.I. – writing of the text, performing of experiments; Kotov I.A. – writing of the text, preparing of the illustrations, data analysis; Rodionova E.N. – management of the development and production of reagent kits; Cherkashina A.S. – development of reagent kits; Kondrasheva L.Yu. – organization of biological material collection and primary testing using reverse transcription polymerase chain reaction; Tivanova E.V. – organization of biological material collection; Khafizov K.F. – writing of the text, collecting and processing of materials, preparing of the illustrations, general editing of the article.

Funding. The research was funded by the State budget.

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

Ethics approval. The study was conducted with informed consent of the patients. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the FBSI «Central Research Institute of Epidemiology» of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor) (FBSI CRIE of Rospotrebnadzor) (Protocol No. 111 dated December 22, 2020).

Received 18 October 2021
Accepted 24 November 2021
Published 30 December 2021

Введение

Новая коронавирусная инфекция (COVID-19), вызываемая вирусом, получившим название «коронавирус тяжёлого острого респираторного синдрома 2» (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2, SARS-CoV-2), впервые была зарегистрирована в конце 2019 г. в Ухане, провинция Хубэй, Китайская Народная Республика (КНР), и затем быстро распространилась по всему миру [1, 2]. Уже через 2,5 месяца, 11 марта 2020 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) официально объявила о начале пандемии COVID-19. Несмотря на многочисленные противоэпидемические мероприятия с длительными карантинными периодами по всему миру, по состоянию на ноябрь 2021 г. было зарегистрировано >260 млн подтверждённых случаев этого заболевания, в т.ч. >5 млн смертей (<https://www.worldometers.info/coronavirus/>). Другой серьёзной проблемой в сложившейся обстановке стала перегрузка диагностической инфраструктуры. Вследствие этого существующие лабораторные мощности не всегда справлялись с большим количеством аналитических лабораторных исследований, которые требовалось провести в сжатые сроки, особенно в периоды резких подъёмов заболеваемости. В связи с этим возникла острая необходимость в разработке новых, дающих быстрый и при этом точный результат тест-систем для выявления возбудителя COVID-19, что могло бы иметь решающее значение в контроле распространения инфекции среди населения.

Молекулярно-генетические методы занимают особое место в системе инфекционной диагностики и эпидемиологического надзора, так как отличаются в большинстве своём высокими показателями специфичности/чувствительности, воспроизводимости и скорости выполнения анализа. Важнейшее достоинство такого диагностического подхода – минимальная степень медицинского вмешательства, поскольку исследование проводится *in vitro*. Решения, основанные на методах амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), к которым принадлежит, в частности, ши-

роко распространённая методика полимеразной цепной реакции (ПЦР), предпочтительны и оправданны в случаях, когда определяемый патоген относится к группе трудно- или некультивируемых, а также присутствует в малом количестве.

Основой молекулярной диагностики многих инфекционных заболеваний, в т.ч. новой коронавирусной инфекции, на сегодняшний день служит использование полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР; reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) [3, 4]. Наборы реагентов на основе ПЦР позволяют обнаруживать присутствие нуклеиновой кислоты вируса в образцах, выделенных из мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, с очень высокими чувствительностью/специфичностью. В подтверждение этого положения следует заметить, что ВОЗ и Центры по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for disease control and prevention, CDC) одобрили применение тестов на базе ОТ-ПЦР в качестве «золотого стандарта» диагностики COVID-19 [2, 5]. Однако, несмотря на достоинства данной методики, объясняющие её значительную популярность и занимаемые ею позиции в лабораторной диагностической аналитике, ПЦР-анализ имеет ряд недостатков и ограничений. К ним можно отнести прежде всего необходимость наличия дорогостоящего оборудования и относительно длительный период амплификации (часто в пределах 1–2 ч) [6, 7], что вместе с необходимой пробоподготовкой занимает достаточно большое количество времени. Это, в свою очередь, является существенной проблемой на фоне высокой загруженности лабораторий.

Полноценной альтернативой ОТ-ПЦР при решении диагностических задач могут выступать технологии, основанные на петлевой изотермической амплификации, совмещённой с обратной транскрипцией (ОТ-ИТ – ИзоТермическая амплификация с Обратной Транскрипцией; RT-LAMP, Reverse Transcription Loop-mediated AMplification) [8–10]. В общем виде изотермическая амплификация в отличие от ПЦР не требует термоденатурации, а следовательно, дорогостоящего специального оборудования, относительно проста

в исполнении, позволяя достаточно быстро получить результат исследования. Для ОТ-ИТ необходимы обратная транскриптаза, термостабильная ДНК-полимераза с вытесняющей активностью (большой фрагмент *Bst*-полимеразы бактерии *Geobacillus stearothermophilus* или *Bsm*-полимеразы *Bacillus smithii*) и не менее 4 праймеров, что обеспечивает значительное повышение специфичности методики. Реакция петлевой изотермической амплификации протекает при постоянной температуре – около 65 °C [11] и, как правило, занимает не более 30 мин, включая этап обратной транскрипции. Кроме того, ранее неоднократно отмечалось, что этап экстракции РНК, общий для ОТ-ПЦР и ОТ-ИТ, в последнем случае можно пропустить, хотя и с некоторой потерей чувствительности, но со значительным преимуществом с точки зрения экономии времени [12–14]. В связи с этим ОТ-ИТ можно рассматривать как инструмент оперативного тестирования в диагностических ситуациях с пределом обнаружения от 2 до 100 копий вирусной РНК в реакции. Данная методика характеризуется вариативностью в зависимости от технологии пробоподготовки, используемых ферментов и мастер-миксов, а также способов детекции результата [15]. Кроме того, использование наборов реагентов на основе ОТ-ИТ послужит оптимальным решением при необходимости увеличить пропускную способность лаборатории без дооснащения дополнительными приборами мощностями.

С учётом большого количества работ, содержащих обсуждение преимуществ и недостатков обоих рассматриваемых МАНК без приведения ссылок на публикации с результатами прямого сравнения, нами сопоставлены методы ОТ-ИТ и ОТ-ПЦР с использованием 2 наборов реагентов, разработанных в ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора на протяжении 2020–2021 гг. Данное экспериментальное исследование имело целью проведение анализа как преимуществ, так и недостатков обоих подходов. При этом основное внимание уделено оценке скорости выполнения, удобства, простоты использования и взаимосогласованности результатов для каждого метода. В то же время определение точных значений чувствительности/специфичности отдельных наборов не входило в основную задачу работы, поскольку эти параметры указаны в соответствующей документации.

Материал и методы

В исследовании использован биологический материал, полученный при взятии мазков со слизистой оболочки рото- и носоглотки у пациентов с симптомами новой коронавирусной инфекции. Наличие РНК SARS-CoV-2 в образцах подтверждено методом ОТ-ПЦР с применением комплекта реагентов «АмплиСенс COVID-19-FL» (АмплиСенс, ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) для выявления и количественного определения генетического материала возбудителя COVID-19 (РУ № РЗН 2021/14026). Исследование проводилось при информированном согласии пациентов; протокол

исследования одобрен Этическим комитетом ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (протокол № 111 от 22 декабря 2020 г.) Образцы помещали в транспортную среду (РУ № ФСР 2009/05011). Выделение РНК из клинического материала осуществляли с использованием набора реагентов «РИБО-преп» (ЗАО «ИнтерЛабСервис», Россия) (РУ № ФСР 2008/03147). Суммарно в работу вошла 381 проба, однако преимущественно отбирались те клинические образцы, для которых значение порогового цикла (threshold cycle, Ct) при ОТ-ПЦР-анализе не превышало 20 (245 образцов, 64% от общего количества). Указанное требование обусловлено тем, что эти пробы отбирали в том числе для исследования методом высокопроизводительного секвенирования, или секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS), с последующим биоинформатическим анализом и загрузкой полученных геномных последовательностей в базу данных VGARus (<https://genome.crie.ru>). Учитывалось также, что в получении качественных прочтений геномов существенную роль играют высокая вирусная нагрузка (ВН) и низкая степень деградации РНК. Получаемые в ходе NGS данные служили для проверки участков отжига праймеров с целью определения влияния имеющихся в них мутаций на результат амплификации. Кроме того, для оценки возможности использования ОТ-ИТ при анализе не только образцов с высокими значениями Ct в ОТ-ПЦР, но и проб со средней и низкой ВН в работу были взяты образцы с показателями Ct ОТ-ПЦР в диапазоне 25–35.

В экспериментах использовали 2 комплекта реагентов: «АмплиСенс COVID-19-FL», предназначенный для работы методом ОТ-ПЦР, и «АмплиСенс SARS-CoV-2-ИТ» (АмплиСенс, ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) (РУ № РЗН 2021/14599), основанный на технологии ОТ-ИТ. Имеющиеся образцы РНК SARS-CoV-2 протестировали при помощи указанных наборов согласно инструкциям производителя на амплификаторе CFX96 Real-Time System (BioRad, США). Анализ полученных данных проводили в программе Bio-Rad CFX Manager v3.1 также в соответствии с инструкциями производителя. На **рис. 1** схематически показаны этапы исследования.

Результаты

Нами протестирован 381 образец РНК вируса SARS-CoV-2 от различных (по полу, возрасту, форме и тяжести течения) пациентов с симптомами COVID-19. Подготовка к эксперименту включала размораживание реагентов, приготовление и разнесение реакционной смеси по пробиркам, внесение в неё образцов РНК и при постановке в полном 96-луночном ПЦР-планшете занимала ≈40 мин как для ОТ-ПЦР, так и для ОТ-ИТ. Непосредственно заданная длительность программ амплификации на приборе CFX96 Real-Time System составляла 93 мин при ОТ-ПЦР и 40 мин – в случае ОТ-ИТ. Наряду с этим период до начала детектирования интенсивности флуоресцентного сигнала, включавший в себя время обратной транскрипции и в случае ОТ-ПЦР – также активации

полимеразы при 95 °С, был равен 40 и 5 мин для ОТ-ПЦР и ОТ-ИТ соответственно. Полученные в результате амплификации значения C_t для ОТ-ПЦР составили в среднем $20,0 \pm 3,7$ с (диапазон 1530 ± 300 с), для ОТ-ИТ – $12,8 \pm 3,7$ с (диапазон 550 ± 160 с); при этом приведённые величины C_t для набора реагентов «АмплиСенс COVID-19-FL» не включают 5 «слепых» циклов. Таким образом, показатели длительности реакций амплификации различаются примерно в 2,7 раза, однако необходимо учитывать, что в экспериментах существенную долю составляли пробы с достаточно низкими значениями C_t , что могло сказаться на результатах.

На рис. 2 показаны значения показателя C_t для разных методик. Следует отметить, что длительности циклов не равны по времени между собой: для ОТ-ПЦР и ОТ-ИТ 1 цикл равен 78 и 43 с соответственно, несмотря на то что согласно инструкциям к наборам реагентов «АмплиСенс COVID-19-FL» и «АмплиСенс SARS-CoV-2-ИТ» продолжительность 1 цикла без учёта времени детекции флуоресцентного сигнала и изменения температуры термоблока составляет 30 с. Исходя из теоретических предпосылок, в качестве альтернативной гипотезы была предложена линейная зависимость между C_t для ОТ-ПЦР и ОТ-ИТ. Коэффициент корреляции составил $\approx 0,827$, что соответствует коэффициенту детерминации R^2 , равному 0,684. Таким образом, предлагаемая линей-

ная регрессия удовлетворительно объясняет экспериментальные данные и позволяет обобщить зависимость показателей C_t ОТ-ПЦР от таковых при ОТ-ИТ для сравниваемых наборов.

Как указано выше, в силу того что отобранные пробы проанализированы также методом высокопроизводительного секвенирования, большая часть исследуемых биологических образцов характеризуется сравнительно высокой ВН. С целью оценки области применимости изотермической амплификации для исследования образцов с низкой ВН были использованы в том числе и те пробы, в которых полученные с помощью ОТ-ПЦР значения C_t достигали 35. При уменьшении же ВН результаты ОТ-ИТ менее точно отражают содержание генетического материала патогена в образце ввиду количества и специфичности используемых праймеров, а также стохастичности процесса их отжига и формирования конкатемеров амплифицируемой области. Таким образом, для образцов с низкой ВН более высокие значения C_t при ОТ-ИТ не всегда соответствуют таковым в случае ОТ-ПЦР. В дополнение к этому представляется важным, что 2 пробы со значениями C_t ОТ-ПЦР 31 и 35 были отрицательными при постановке ОТ-ИТ. При этом случаев, когда образец при анализе ОТ-ИТ был положительным, а в ОТ-ПЦР – отрицательным, не зарегистрировано.

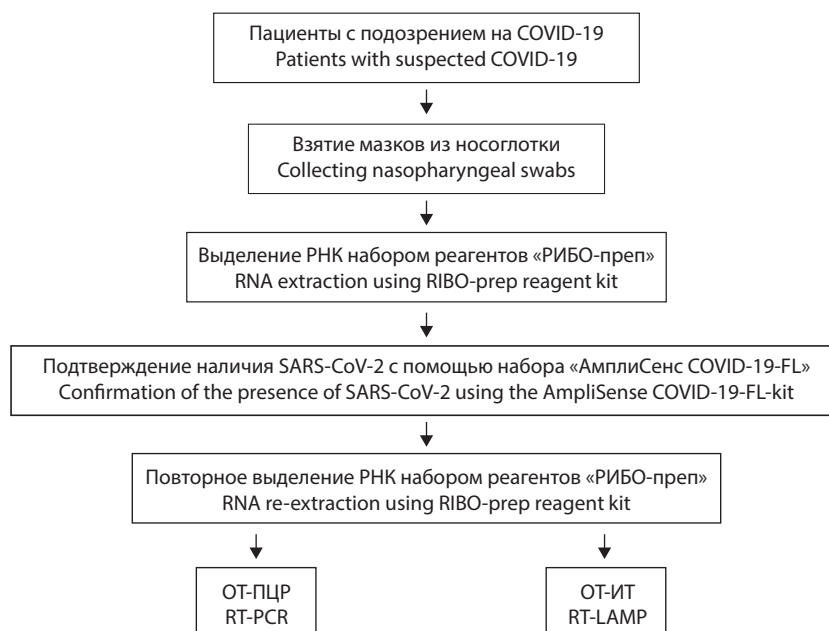


Рис. 1. Общая схема проведения исследования.

Первоначально у пациентов с симптомами новой коронавирусной инфекции забирали мазки из рото- и носоглотки. Наличие или отсутствие в биоматериале SARS-CoV-2 подтверждали методом ОТ-ПЦР с применением набора реагентов «АмплиСенс COVID-19-FL». Положительные нативные образцы со значениями C_t , удовлетворяющими условиям эксперимента, повторно использовали для выделения РНК вируса, проведения обратной транскрипции и амплификации.

Fig. 1. General scheme of the study.

Initially, oropharyngeal and nasopharyngeal swabs were taken from patients with symptoms of the new coronavirus infection. The presence or absence of SARS-CoV-2 in the biological material was confirmed by RT-PCR using the AmpliSens COVID-19-FL reagent kit. Then, positive native samples with C_t values suitable for the experimental conditions were reused to isolate the virus RNA, and reverse transcription and amplification had been performed.

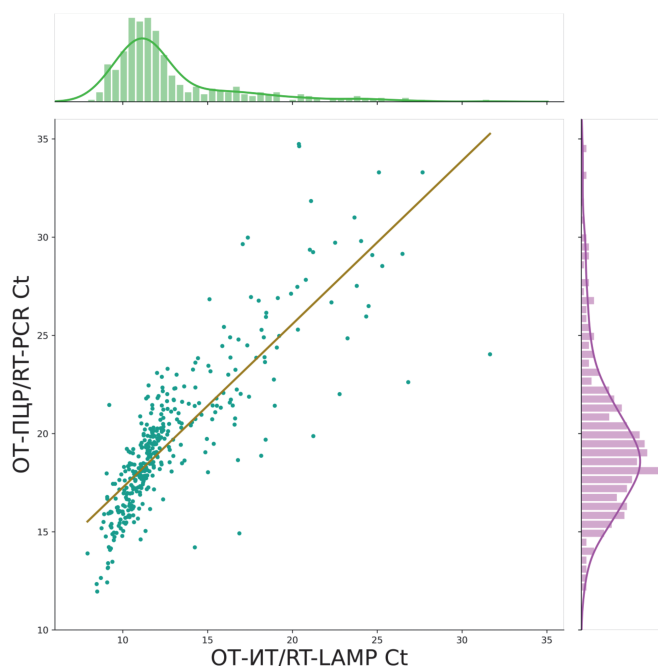


Рис. 2. Диаграмма рассеяния, демонстрирующая значения пороговых циклов Ct для образцов, исследованных методами ОТ-ИТ и ОТ-ПЦР.

Примечание. Каждый образец проанализирован двумя методами. По оси абсцисс – значения пороговых циклов Ct для ОТ-ИТ; по оси ординат – аналогичные показатели для ОТ-ПЦР. Приведены гистограммы распределения величин Ct для LAMP и ПЦР (выделены зелёным и лиловым цветом соответственно).

Fig. 2. Scatter plot showing Ct values for samples analyzed by RT-LAMP and RT-PCR.

Note. Each sample was analyzed by two methods. The abscissa axis shows the Ct values for RT-LAMP, the ordinate axis shows the same values for RT-PCR. Histograms of Ct values distribution for LAMP and PCR (highlighted in green and purple, respectively) are also shown.

Обсуждение

В данном исследовании мы сравнили 2 ведущих МАНК – ОТ-ПЦР и ОТ-ИТ, используемые для выявления РНК нового коронавируса SARS-CoV-2, на примере 2 наборов реагентов: «АмплиСенс COVID-19-FL» и «АмплиСенс SARS-CoV-2-ИТ». В то время как ПЦР на протяжении многих лет остаётся наиболее популярным методом молекулярной диагностики, доказавшим свою эффективность и надёжность, изотермическая амплификация лишь недавно стала получать распространение в диагностических лабораториях; ранее упоминания технологий на её основе встречались главным образом в научных публикациях. Однако пандемия COVID-19 показала острую необходимость в более быстрых и эффективных способах детекции нуклеиновых кислот возбудителей инфекционных заболеваний, что послужило стимулом к внедрению недостаточно распространённых, но перспективных методов амплификации в диагностическую практику.

Мы протестировали 381 образец от пациентов с новой коронавирусной инфекцией. Отмечено значительное преимущество во времени для анализа

с помощью ОТ-ИТ по сравнению с ОТ-ПЦР, что может иметь существенное значение в условиях тестирования большого объёма биологического материала в сжатые сроки.

Главным ограничением настоящего исследования является то, что большая часть образцов получена от пациентов с высокой ВН (низкие значения пороговых циклов Ct). Это связано среди прочего с тем, что данные пробы были дополнительно проанализированы методом NGS-секвенирования [16]. Тем не менее мы ввели в исследование также образцы с более высокими (до 35) значениями Ct ОТ-ПЦР. В целом полученные с помощью ОТ-ИТ и ОТ-ПЦР результаты согласуются друг с другом, но для 2 образцов с Ct 31 и 35 при ОТ-ПЦР вирусная РНК не обнаружена в реакции ОТ-ИТ, что для пациента формально могло бы означать ложноотрицательный результат теста. Данные нашего исследования показывают, что ОТ-ИТ является подходящим инструментом выявления SARS-CoV-2 у пациентов со средней и высокой ВН ($>5 \times 10^4$ копий/мл), однако чувствительность метода может быть недостаточна для пациентов с уровнем ВН $<2 \times 10^3$ копий/мл (низкая и очень низкая ВН).

Одновременно с этим до настоящего времени остаётся дискуссионным вопрос о том, какое значение порогового цикла Ct следует учитывать при положительном результате ОТ-ПЦР как значимое в плане возможности передачи вируса от человека человеку. Хотя в случае длительного течения заболевания показатель ВН может быть выше или ниже в зависимости от момента забора биологического материала, общая тенденция такова, что наибольшую опасность для окружающих представляют лица с высокой ВН. При этом, согласно имеющемуся опыту разных исследователей, шансы на культивирование SARS-CoV-2 уменьшаются в образцах биоматериала, для которых значения Ct при ОТ-ПЦР превышают 25 [17]. Показано, что вероятность успешного культивирования этого вируса снижается до 8% при величине Ct ОТ-ПЦР >35 [18]. Опубликованы данные, подтверждающие, что новый коронавирус потенциально может быть культивирован из 70% образцов с Ct ≤ 25 (ОТ-ПЦР), в то же время для случаев Ct >35 (ОТ-ПЦР) для этого могут быть использованы лишь $<3\%$ образцов [19]. Другие исследовательские группы сообщали, что культивирование данного патогена невозможно в пробах Ct >24 (ОТ-ПЦР) [20]. Указывается также на возможность обнаружения SARS-CoV-2 у пациентов в течение нескольких недель после исчезновения симптомов с помощью ОТ-ПЦР при отсутствии рисков передачи вируса другому человеку [20].

Обобщая сказанное, можно заключить, что тест-системы на базе ОТ-ИТ позволяют детектировать РНК нового коронавируса в биологических образцах от пациентов, способных активно передавать инфекционный агент другим лицам, в редких случаях давая ложноотрицательный результат у выздоровевших (реконвалесцентов), имеющих «остаточную» ВН. Другое ограничение технологий на основе LAMP состоит в том, что они требуют тщательной оптими-

зации ряда параметров реакционной среды и не являются количественными, поскольку амплификация конкатемеров не тождественна удвоению продуктов на каждом цикле амплификации в ПЦР [21]. Однако эти недостатки следует сопоставлять со многими преимуществами и прежде всего – с высокой скоростью аналитического процесса и широким набором способов детекции продуктов амплификации. Молекулярная LAMP-диагностика всё чаще используется в качестве экономичного инструмента выявления новой коронавирусной инфекции и эпидемиологического надзора за этим заболеванием [22, 23]. Помимо этого, тестирование на наличие SARS-CoV-2 непосредственно на месте оказания медицинской помощи (point-of-care testing) на основе ОТ-ИТ в настоящее время разрабатывается для развёртывания в отдалённых районах [23, 24]. Исходя из изложенного, следует констатировать необходимость дальнейшего исследования диагностических систем, в основе которых лежит технология изотермической амплификации, с большими размерами выборки и представленностью образцов с низкой ВН.

Заключение

Полученные нами результаты позволяют сделать вывод о том, что настоящее исследование подтверждает применимость технологий на основе изотермической амплификации в лабораторной диагностике для обнаружения РНК SARS-CoV-2 в клинических образцах. Тест-системы на основе ОТ-ИТ в силу своей простоты и достаточной скорости получения результата могут быть использованы для массового скрининга с целью выявления лиц с относительно высокой ВН, представляющих наибольшую угрозу распространения нового коронавируса, тогда как базирующиеся на ОТ-ПЦР диагностические методы в большей степени пригодны для оценки ВН и её динамики у пациентов с COVID-19, особенно в случаях течения заболевания на фоне сравнительно низкой ВН. В связи с сохраняющейся потребностью в тест-системах для своевременного установления присутствия SARS-CoV-2 LAMP-технологии позволяют расширить возможности молекулярной диагностики, а в совокупности с ПЦР-анализом и тестами на выявление соответствующего антигена делают эпидемиологический надзор за распространением нового коронавируса более гибким и эффективным.

ЛИТЕРАТУРА

- Wu Z., McGoogan J.M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020; 323(13): 1239–42. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>
- Sharfstein J.M., Becker S.J., Mello M.M. Diagnostic Testing for the Novel Coronavirus. *JAMA*. 2020; 323(15): 1437–8. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3864>
- Drosten C., Götting S., Schilling S., Asper M., Panning M., Schmitz H., et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(4): 2323–30. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.7.2323-2330.2002>
- Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(6): 1292–305. <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.1292>
- Tahamtan A., Ardebili A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2020; 20(5): 453–4. <https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1757437>
- Lu R., Wu X., Wan Z., Li Y., Zuo L., Qin J., et al. Development of a novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of SARS-CoV-2. *Virol. Sin.* 2020; 35(3): 344–7. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00218-1>
- Jiang M., Pan W., Arasther A., Fang W., Ling L., Fang H., et al. Development and validation of a rapid, single-step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system potentially to be used for reliable and high-throughput screening of COVID-19. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2020; 10: 331. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00331>
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(12): E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- Хафизов К.Ф., Петров В.В., Красовитов К.В., Золкина М.В., Акимкин В.Г. Экспресс-диагностика новой коронавирусной инфекции с помощью реакции петлевой изотермической амплификации. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(1): 17–28. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-42>
- Parida M., Posadas G., Inoue S., Hasebe F., Morita K. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(1): 257–63. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.1.257-263.2004>
- Zhao Y., Chen F., Li Q., Wang L., Fan C. Isothermal amplification of nucleic acids. *Chem. Rev.* 2015; 115(22): 12491–545. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00428>
- Bruno A., de Mora D., Freire-Paspuel B., Rodriguez A.S., Paredes-Espinosa M.B., Olmedo M., et al. Analytical and clinical evaluation of a heat shock SARS-CoV-2 detection method without RNA extraction for N and E genes RT-qPCR. *Int. J. Infect. Dis.* 2021; 109: 315–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.06.038>
- Lalli M.A., Langmade J.S., Chen X., Fronick C.C., Sawyer C.S., Burcea L.C., et al. Rapid and Extraction-Free Detection of SARS-CoV-2 from Saliva by Colorimetric Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Clin. Chem.* 2021; 67(2): 415–24. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa267>
- Anastasiou O.E., Holtkamp C., Schäfer M., Schön F., Eis-Hübing A.M., Krumbholz A. Fast Detection of SARS-CoV-2 RNA Directly from Respiratory Samples Using a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Test. *Viruses*. 2021; 13. <https://doi.org/10.3390/v13050801>
- Thompson D., Lei Y. Mini review: Recent progress in RT-LAMP enabled COVID-19 detection. *Sensors and Actuators Reports*. 2020; 2: 100017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snr.2020.100017>
- Borisova N.I., Kotov I.A., Kolesnikov A.A., Kapteleva V.V., Speranskaya A.S., Kondrasheva L.Yu., et al. Monitoring the spread of the SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) variants in the Moscow region using targeted high-throughput sequencing. *Voprosy Virusologii*. 2021; 66(4): 269–78. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-72>
- Cevik M., Tate M., Lloyd O., Maraolo A.E., Schafers J., Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe*. 2021; 2(1): e13–22. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(20\)30172-5](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(20)30172-5)
- 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)
- La Scola B., Le Bideau M., Andreani J., Hoang V.T., Grimaldier C., Colson P., et al. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 39(6): 1059–61. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03913-9>
- Bullard J., Dust K., Funk D., Strong J.E., Alexander D., Garnett L., et al. Predicting infectious severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from diagnostic samples. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(10): 2663–6. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa638>

21. Mora-Cárdenas E., Marcello A. Switch-on the LAMP to spot Zika. *Ann. Transl. Med.* 2017; 5(24): 500. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.10.19>
22. Augustine R., Hasan A., Das S., Ahmed R., Mori Y., Notomi T., et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, sensitive, specific, and cost-effective point-of-care test for coronaviruses in the context of COVID-19 pandemic. *Biology (Basel)*. 2020; 9(8): 182. <https://doi.org/10.3390/biology9080182>
23. Rabe B.A., Cepko C. SARS-CoV-2 detection using isothermal amplification and a rapid, inexpensive protocol for sample inactivation and purification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020; 117(39): 24450–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011221117>
24. Yu L., Wu S., Hao X., Dong X., Mao L., Pelechano V., et al. Rapid detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform. *Clin. Chem.* 2020; 66(7): 975–7. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa102>
11. Zhao Y., Chen F., Li Q., Wang L., Fan C. Isothermal amplification of nucleic acids. *Chem. Rev.* 2015; 115(22): 12491–545. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00428>
12. Bruno A., de Mora D., Freire-Paspuel B., Rodriguez A.S., Paredes-Espinosa M.B., Olmedo M., et al. Analytical and clinical evaluation of a heat shock SARS-CoV-2 detection method without RNA extraction for N and E genes RT-qPCR. *Int. J. Infect. Dis.* 2021; 109: 315–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.06.038>
13. Lalli M.A., Langmade J.S., Chen X., Fronick C.C., Sawyer C.S., Burcea L.C., et al. Rapid and Extraction-Free Detection of SARS-CoV-2 from Saliva by Colorimetric Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Clin. Chem.* 2021; 67(2): 415–24. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa267>
14. Anastasiou O.E., Holtkamp C., Schäfer M., Schön F., Eis-Hübing A.M., Krumbholz A. Fast Detection of SARS-CoV-2 RNA Directly from Respiratory Samples Using a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Test. *Viruses*. 2021; 13. <https://doi.org/10.3390/v13050801>
15. Thompson D., Lei Y. Mini review: Recent progress in RT-LAMP enabled COVID-19 detection. *Sensors and Actuators Reports*. 2020; 2: 100017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snr.2020.100017>
16. Borisova N.I., Kotov I.A., Kolesnikov A.A., Kapteleva V.V., Speranskaya A.S., Kondrasheva L.Yu., et al. Monitoring the spread of the SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) variants in the Moscow region using targeted high-throughput sequencing. *Voprosy virusologii*. 2021; 66(4): 269–78. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-72>
17. Cevik M., Tate M., Lloyd O., Maraolo A.E., Schafers J., Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe*. 2021; 2(1): e13–22. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(20\)30172-5](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(20)30172-5)
18. 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)
19. La Scola B., Le Bideau M., Andreani J., Hoang V.T., Grimaldier C., Colson P., et al. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 39(6): 1059–61. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03913-9>
20. Bullard J., Dust K., Funk D., Strong J.E., Alexander D., Garnett L., et al. Predicting infectious severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from diagnostic samples. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(10): 2663–6. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa638>
21. Mora-Cárdenas E., Marcello A. Switch-on the LAMP to spot Zika. *Ann. Transl. Med.* 2017; 5(24): 500. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.10.19>
22. Augustine R., Hasan A., Das S., Ahmed R., Mori Y., Notomi T., et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, sensitive, specific, and cost-effective point-of-care test for coronaviruses in the context of COVID-19 pandemic. *Biology (Basel)*. 2020; 9(8): 182. <https://doi.org/10.3390/biology9080182>
23. Rabe B.A., Cepko C. SARS-CoV-2 detection using isothermal amplification and a rapid, inexpensive protocol for sample inactivation and purification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020; 117(39): 24450–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011221117>
24. Yu L., Wu S., Hao X., Dong X., Mao L., Pelechano V., et al. Rapid detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform. *Clin. Chem.* 2020; 66(7): 975–7. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa102>

REFERENCES

1. Wu Z., McGoogan J.M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020; 323(13): 1239–42. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>
2. Sharfstein J.M., Becker S.J., Mello M.M. Diagnostic Testing for the Novel Coronavirus. *JAMA*. 2020; 323(15): 1437–8. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3864>
3. Drosten C., Götting S., Schilling S., Asper M., Panning M., Schmitz H., et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(4): 2323–30. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.7.2323-2330.2002>
4. Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(6): 1292–305. <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.1292>
5. Tahamtan A., Ardebili A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2020; 20(5): 453–4. <https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1757437>
6. Lu R., Wu X., Wan Z., Li Y., Zuo L., Qin J., et al. Development of a novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of SARS-CoV-2. *Virol. Sin.* 2020; 35(3): 344–7. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00218-1>
7. Jiang M., Pan W., Arasther A., Fang W., Ling L., Fang H., et al. Development and validation of a rapid, single-step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system potentially to be used for reliable and high-throughput screening of COVID-19. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2020; 10: 331. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00331>
8. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(12): E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
9. Khafizov K.F., Petrov V.V., Krasovtsov K.V., Zolkina M.V., Akimkin V.G. Rapid diagnostics of novel coronavirus infection by loop-mediated isothermal amplification [*Ekspress-diagnostika novoy koronavirusnoy infektsii s pomoshch'yu reaktsii petlevoy izotermicheskoy amplifikatsii*]. *Voprosy virusologii*. 2021; 66(1): 17–28. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-42>
10. Parida M., Posadas G., Inoue S., Hasebe F., Morita K. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(1): 257–63. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.1.257-263.2004>

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-77>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



Распространение маркёров респираторных вирусов человека среди обезьян Адлерского приматологического центра

Корзая Л.И.¹, Догадов Д.И.¹, Гончаренко А.М.¹, Карлсен А.А.^{2,3}, Кюрегян К.К.^{2,3}, Михайлов М.И.^{2,3}

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

²ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993, Москва, Россия

³ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия

Введение. Актуальность изучения циркуляции респираторных вирусов (РВ) человека среди лабораторных приматов связана с необходимостью испытания на этих моделях вакцин и противовирусных препаратов против вызываемых этими возбудителями инфекций, смертность от которых наиболее высока у детей и пожилых.

Целью данной работы являлось изучение распространённости серологических и молекулярно-генетических маркёров респираторных вирусных инфекций человека у лабораторных приматов, рождённых в Адлерском приматологическом центре (г. Сочи, Россия), а также у импортированных обезьян.

Материал и методы. От различных видов обезьян получены образцы сыворотки крови ($n = 1971$) и аутопсийного материала лёгких ($n = 26$). Образцы сывороток крови исследованы на наличие серологических маркёров возбудителей кори, парагриппа (ПГ) 1, 2, 3 типов, гриппа А и В, респираторно-синцитиальной (РС) и аденовирусной инфекций с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). В аутопсийном материале осуществляли детекцию РНК РС-вируса, метапневмовируса, вируса ПГ типов 1–4, риновируса, коронавируса, а также ДНК аденовирусов групп В, С, Е и бикавируса для исследования методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Результаты и обсуждение. Частота выявления среди обезьян антител (АТ) к РВ в среднем была невысокой и составила: 11,3% (95% ДИ: 9,2–13,7%; $n = 811$) для вируса кори; 8,9% (95% ДИ: 6,2–12,2%; $n = 381$) для вируса ПГ 3 типа; 2,5% (95% ДИ: 0,8–5,6%; $n = 204$) для вируса ПГ 1 типа и 7,7% (95% ДИ: 3,8–13,7%, $n = 130$) – для аденовирусов. При тестировании всех 26 аутопсийных образцов лёгочной ткани от обезьян разных видов, погибших от пневмонии, в 2 образцах от павианов анубисов (*Papio anubis*) была выявлена РНК вируса ПГ типа 3.

Заключение. Полученные данные подтверждают необходимость строгого соблюдения сроков карантина и обязательного тестирования обезьян на наличие АТ к вирусу кори класса IgM, свидетельствующих о недавнем инфицировании. Установлена роль вируса ПГ 3 типа в патологии респираторного тракта у павианов анубисов.

Ключевые слова: респираторные вирусы (РВ) человека – грипп А, В, парагрипп (ПГ) типов 1, 2, 3, 4, респираторно-синцитиальный (РС) вирус, аденовирус; вирус кори; антитела (АТ) (IgG, IgM); иммуноферментный анализ (ИФА); обезьяны

Для цитирования: Корзая Л.И., Догадов Д.И., Гончаренко А.М., Карлсен А.А., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Распространение маркёров респираторных вирусов человека среди обезьян Адлерского приматологического центра. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(6): 425–433. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-77>

Для корреспонденции: Догадов Дмитрий Игоревич, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории инфекционных вирусов, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» Министерства науки и высшего образования (Минобрнауки) России, 354376, Сочи, Россия. E-mail: dima_loko86@mail.ru

Участие авторов: Корзая Л.И. – написание текста, подготовка иллюстративного материала, обзор публикаций на тему статьи, статистическая обработка результатов; Догадов Д.И. – разработка дизайна исследования, написание и редактирование текста, обзор публикаций на тему статьи; Кюрегян К.К. – разработка дизайна исследования, обзор публикаций на тему статьи, редактирование текста; Карлсен А.А. – выполнение филогенетического анализа; Михайлов М.И. – разработка дизайна исследования, обзор публикаций на тему статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом организации (Протокол № 92 от 20.12.2012 г.).

Поступила 21.09.2021

Принята в печать 14.11.2021

Опубликована 30.12.2021

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-77>

Prevalence of laboratory markers of human respiratory viruses in monkeys of Adler primate center

Lidiya I. Korzaya¹, Dmitriy I. Dogadov¹, Aleksandra M. Goncharenko¹, Anastasia A. Karlsen^{2,3}, Karen K. Kyuregyan^{2,3}, Mikhail I. Mikhailov^{2,3}

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

²FSBEI FPE «Russian Medical Academy of Continuous Professional Education» of the Ministry of Health of Russia, 125993, Moscow, Russia

³FSBRI «I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 105064, Moscow, Russia

Introduction. The relevance of studying the circulation of human respiratory viruses among laboratory primates is associated with the need to test vaccines and antiviral drugs against these infections on monkeys.

The **aim** of this work was to study the prevalence of serological and molecular markers of human respiratory viral infections in laboratory primates born at the Adler Primate Center and in imported monkeys.

Material and methods. Blood serum samples ($n = 1971$) and lung autopsy material ($n = 26$) were obtained from different monkey species. These samples were tested for the presence of serological markers of measles, parainfluenza (PI) types 1, 2, 3, influenza A and B, respiratory syncytial (RS) and adenovirus infections using enzyme immunoassay (ELISA). Detection of RS virus, metapneumovirus, PI virus types 1–4, rhinovirus, coronavirus, and adenoviruses B, C, E and bocavirus nucleic acids in this material was performed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results and discussion. The overall prevalence of antibodies (Abs) among all monkeys was low and amounted 11.3% (95% CI: 9.2–13.7%, $n = 811$) for measles virus, 8.9% (95% CI: 6.2–12.2%, $n = 381$) for PI type 3 virus, 2.5% (95% CI: 0.8–5.6%, $n = 204$) for PI type 1 virus, and 7.7% (95% CI: 3.8–13.7%, $n = 130$) for adenoviruses. When testing 26 autopsy lung samples from monkeys of different species that died from pneumonia, 2 samples from Anubis baboons (*Papio anubis*) were positive for of parainfluenza virus type 3 RNA.

Conclusion. Our data suggest the importance of the strict adherence to the terms of quarantine and mandatory testing of monkey sera for the presence of IgM antibodies to the measles virus that indicate the recent infection. The role of PI virus type 3 in the pathology of the respiratory tract in Anubis baboons has been established.

Key words: human respiratory viruses – influenza A, influenza B, parainfluenza types 1, 2, 3, 4, respiratory syncytial (RS) virus, adenovirus, measles virus; antibodies (IgG, IgM); enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); monkeys

For citation: Korzaya L.I., Dogadov D.I., Goncharenko A.M., Karlsen A.A., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I. Prevalence of laboratory markers of human respiratory viruses in monkeys of Adler primate center. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(6): 425-433 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-77>

For correspondence: Dmitriy I. Dogadov, Ph.D. (Biol.), Researcher of the Infection Virology Laboratory, FSBRI «Research Institute of Medical Primatology» of the Ministry of Higher Education and Science of Russia, 354376, Sochi, Russia. E-mail: dima_loko86@mail.ru

Information about the authors:

Korzaya L.I., <https://orcid.org/0000-0003-2259-5773>

Dogadov D.I., <https://orcid.org/0000-0003-1596-0509>

Goncharenko A.M. <https://orcid.org/0000-0002-6979-9784>

Kyuregyan K.K., <https://orcid.org/0000-0002-3599-117X>

Karlsen A.A., <https://orcid.org/0000-0002-6013-7768>

Mikhailov M.I., <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>

Contribution: Dogadov D.I. – writing of the text, creation of illustrations, reviewing of publications, statistical analysis of the results; Korzaya L.I. – developing the research design, writing and editing of the text, reviewing of publications; Kyuregyan K.K. – developing the research design, reviewing publications, editing of the text; Karlsen A.A. – phylogenetic analysis; Mikhailov M.I. – developing the research design, reviewing publications.

Funding. The research was funded by the State budget.

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

Ethics approval. The authors confirm compliance with the institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The study protocol was approved by the Ethics Committee of the organization (Protocol No. 92 dated 20.12.2012).

Received 21 September 2021

Accepted 14 November 2021

Published 30 December 2021

Введение

Актуальность изучения циркуляции респираторных вирусов (РВ) человека среди лабораторных приматов связана с необходимостью исследования на обезьянах вакцинных и противовирусных препаратов против вызываемых этими возбудителями инфекций, смертность от которых наиболее высока у детей и пожилых лиц [1–4]. Определение и характеристика специфических антител (АТ) в сыворотках экспериментальных животных представляют собой обязательный этап в подготовке их к исследованию и служат гарантией получения корректных результатов. Кроме того, до настоящего времени в большинстве случаев остаются неустановленными этиологические агенты, вызывающие у обезьян респираторные заболевания (пневмонии и бронхиты) со значительными показателями смертности [5]. Остаётся также не изученным вопрос, касающийся эпидемической опасности РВ человека для этих животных (за исключением вируса кори (ВК) (*Paramyxoviridae: Morbillivirus*), в отношении которого такая опасность хорошо документирована) [6].

Следует отметить, что возбудитель кори имеет особое значение для обезьян, которые являются единственными представителями животного мира, у которых регистрируются спорадические случаи этой инфекции. Многие виды африканских и азиатских обезьян, включая человекообразных, восприимчивы к данному инфекционному агенту [6, 7]. Случаев заболевания обезьян корью в естественных условиях не наблюдалось. Вместе с тем вспышки спонтанной кори с характерными клиническими признаками описывались с начала XX в. во многих приматологических центрах мира [8–11]. Имеются данные о том, что дети, как и взрослые, не имеющие кори в анамнезе и не привитые от неё, в случае контакта с больными обезьянами легко заражаются этой инфекцией от больных животных [7].

Целью настоящей работы являлось изучение распространённости серологических и молекулярно-генетических маркёров респираторных вирусных инфекций человека у лабораторных приматов, рождённых в Адлерском приматологическом центре (г. Сочи, Россия), и у импортированных обезьян.

Материал и методы

Всего была исследована 1971 сыворотка крови от обезьян различных видов. При определении АТ к РВ исследованы образцы от животных, рождённых в Адлерском приматологическом центре на протяжении 1979–2018 гг. ($n = 477$): макак резусов (*Macaca mulatta*), макак яванских (*M. fascicularis*), макак лапундеров (*M. nemestrina*), зелёных мартышек (*Chlorocebus aethiops*) и павианов гамадрилов (*Papio hamadryas*). Среди 334 обезьян, импортированных в 2014–2018 гг., были зелёные мартышки вервет (*Chlorocebus pygerythrus*), завезённые из мест естественного обитания (Танзания) в 2014 г. ($n = 36$), а также несколько групп макак яванских, поступивших из Социалистической Республики Вьетнам (СРВ) и Республики Маврикий за период 2015–2018 гг. ($n = 298$).

Для определения в сыворотках обезьян АТ к ВК (анти-ВК IgG и IgM) использовали коммерческие тест-системы иммуноферментного анализа (ИФА) «ВектоКорь IgG» и ИФА «ВектоКорь IgM» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). С целью детекции АТ класса IgG к вирусам парагриппа (ПГ) типов 1 и 3 (*Paramyxoviridae: Paramyxovirinae: Respirovirus*) и аденовирусам (*Adenoviridae: Mastadenovirus*) групп В, С и Е применяли соответствующие иммуноферментные тест-системы (ЗАО «ЭКОлаб», Россия). АТ класса IgG к вирусам гриппа А и В (*Orthomyxoviridae: Influenza {A, B} virus*), респираторно-синцитиальному (РС) вирусу (*Paramyxoviridae: Paramyxovirinae: Pneumovirus*), а также вирусам ПГ типов 1, 3 (*Paramyxoviridae: Paramyxovirinae: Respirovirus*) и 2 (*Paramyxoviridae: Paramyxovirinae: Rubulavirus*) определяли в соответствующих тест-системах (DRG Diagnostic, Германия).

Результаты ИФА учитывали на лабораторном спектрофотометре «Immunochem-2100» (High Technology Inc., США) с использованием фильтра с длиной волны 450 нм. Реактивность сывороток в отношении РВ оценивали по значениям $ОП_{450}$ (оптическая плотность исследуемых образцов сывороток при длине волны 450 нм в ИФА), для ВК – дополнительно в МЕ/мл. Результаты интерпретировали в соответствии с инструкциями производителя, согласно которым серопозитивными по кори считались образцы, в которых концентрация АТ класса IgG превышала 0,18 МЕ/мл.

Помимо этого, на наличие ДНК/РНК РВ человека выборочно исследованы 26 образцов тканей лёгких от погибших животных. Забор материала выполняли при вскрытии с использованием одноразовых скальпеля и пинцета в стерильные пробирки. Суспензию готовили при помощи гомогенизатора «Minily» (Bertin Technologies, Франция) из расчёта 5–6 г материала в 1 мл 0,1 М Na-фосфатного буфера pH 7,4, затем центрифугировали 30 мин при 3000 об/мин на холодной центрифуге «Allegra» (Beckman Coulter, США) для удаления осадка. Приготовленный таким образом 10% супернатант использовали в дальнейшем исследовании.

Выделение нуклеиновых кислот производили из полученного 10% лёгочного супернатанта с применением набора «РИБО-преп» (ЗАО «ИнтерЛабСервис», Россия) согласно инструкции производителя. С целью синтеза комплементарных ДНК (кДНК) на матрице суммарной РНК использовали комплект реагентов «Реверта» (ЗАО «ИнтерЛабСервис») также в соответствии с инструкцией производителя.

Полученные кДНК амплифицировали с использованием набора для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени «Амплиценс ОРВИ-скринFL» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия) в целях выявления возбудителей острых респираторных вирусных инфекций (РС-вирус; метапневмовирус; вирусы ПГ 1, 2, 3 и 4 типов; коронавирус (*Coronaviridae: Human coronavirus {α, β}*); риновирус (*Picornaviridae: Enterovirus: Human rhinovirus {A...C}*); аденовирусы групп В, С и Е; бока-

вирус (*Parvoviridae: Parvovirinae: Bocavirus*)) согласно инструкции производителя. Амплификацию и анализ результатов осуществляли при помощи прибора Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия).

кДНК вируса ПГ человека 3 типа амплифицировали с праймерами к участку генома вируса, кодирующему белок L [8]. Результаты учитывали методом электрофореза продуктов ПЦР (10 мкл) с помощью набора реагентов для электрофоретической детекции (ЗАО «ИнтерЛабСервис»). Величина ампликона, получаемого в результате ПЦР, составляла 367 п.н. Ампликоны очищали из агарозного геля посредством набора QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) и проводили секвенирование по Сэнгеру на автоматизированном генетическом анализаторе ABI3500 (ABI, США) с набором реагентов Big Dye Terminator v.3 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя.

Полученные нуклеотидные последовательности выравнивали относительно друг друга и соответствующих участков полных или частичных геномных последовательностей вируса ПГ 3 человека, доступных в базе данных GenBank на момент проведения исследования. Филогенетическое дерево строили по методу максимального правдоподобия (maximum likelihood) в программном обеспечении MEGA X.

Результаты подвергали статистической обработке по общепринятым методикам с использованием программы GraphPad. Статистическая обработка данных включала: определение показателей средних величин (M), расчёт 95% доверительного интервала (ДИ), выявление достоверности различий средних значений показателей в сравниваемых группах с применением критерия Фишера (различия оценивались как достоверные при вероятности 95% – $p \leq 0,05$).

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены средние показатели частоты выявления АТ класса IgG к ВК, вирусам гриппа А, В, ПГ типов 1, 2, 3, РС-вирусу и аденовирусу у обезьян 2 групп: рождённых в питомнике и импортёванных. В сыворотках лабораторных приматов выявлены АТ только к 4 из 7 исследованных вирусов: к ВК – 11,3% (95% ДИ: 9,2–13,7%; $n = 811$); ПГ 3 типа – 8,9% (95% ДИ: 6,2–12,2%; $n = 381$); ПГ 1 типа – 2,5% (95% ДИ: 0,8–5,6%; $n = 204$) и аденовирусам – 7,7% (95% ДИ: 3,8–13,7%, $n = 130$). АТ к вирусам гриппа А, гриппа В и РС-вирусу не обнаружены в обеих группах животных, что свидетельствует об отсутствии циркуляции этих агентов среди обезьян Адлерского приматологического центра.

В табл. 2 представлены результаты выявления АТ к ВК у обезьян, рождённых в Адлерском питомнике в разные годы ($n = 477$). В целом доля серопозитивных к этому вирусу особей, рождённых в условиях питомника, была невысокой – 10,5% (95% ДИ: 7,8–13,6%). Количество серопозитивных животных оказалось сходным среди макак резусов, макак лапундеров, зелёных мартышек и павианов гамадрилов

(10,5–13,3%); лишь для макак яванских этот показатель составил 4,9%, однако различия были недостоверны ($p > 0,05$). Не выявлено значимых различий и в значениях концентрации АТ среди различных видов серопозитивных обезьян, рождённых в приматологическом центре. Средняя концентрация АТ составила $1,78 \pm 0,23$ МЕ/мл.

Проведённый анализ показал (табл. 2), что серопозитивные по кори особи (40,7%; 95% ДИ: 9,2–13,7%) обнаруживались лишь среди животных, рождённых с 1979 по 1992 гг. ($n = 123$) и не выявлялись в группе рождённых в период 1993–2017 гг. ($n = 354$). Это свидетельствует о прекращении циркуляции ВК среди обезьян Адлерского питомника после 1993 г.

Важным является факт отсутствия АТ класса IgM к указанному вирусу у представителей различных видов ($n = 127$), родившихся в 1993–2016 гг., что также подтверждает отсутствие новых случаев данной инфекции на территории питомника. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что IgM-АТ к ВК у обезьян появляются на 7 сут после заражения и циркулируют в течение 30 сут [12].

Кроме того, мы проанализировали частоту выявления АТ к ВК среди обезьян, импортёванных за период 2014–2018 гг. (табл. 3). Необходимо отметить, что до 2014 г. животные в питомник не импортёвывались. АТ не обнаруживались у зелёных мартышек вервет ($n = 36$), прибывших в 2014 г. из мест естественного обитания (Танзания). У макак яванских, поступивших из Вьетнама (5 групп), выявлены АТ класса IgG к ВК, в среднем в 17% наблюдений (95% ДИ: 11,2–20,4%; $n = 334$). Количество серопозитивных результатов в различных партиях варьировало от 2,3 до 57,5% (группы 1–4); обезьяны же 5 группы ($n = 100$) были серонегативными. Эти животные были значительно моложе (на 1,9–2,6 года) обезьян из других групп, где присутствовали серопозитивные особи (старше 4 лет). Наличие АТ IgG (6,8% наблюдений) установлено также среди прибывших из Республики Маврикий макак яванских ($n = 44$). Значение реактивности сывороток к ВК у представителей этого вида, импортёванных из Вьетнама и Маврикия, находилось в пределах от $0,30 \pm 0,12$ до $1,65 \pm 0,53$ МЕ/мл и в среднем было равным $1,26 \pm 0,17$ МЕ/мл.

Случаи выявления АТ класса IgM к ВК среди импортёванных обезьян отсутствовали, однако значительная частота детекции АТ IgG в некоторых группах (до 57,5%) указывает на высокую интенсивность циркуляции вируса во вьетнамском питомнике и возможность заноса инфекции в Адлерский приматологический центр, где циркуляция возбудителя кори отсутствует на протяжении последних 25 лет. В связи с этим необходим контроль за содержанием обезьян в карантине с соблюдением его сроков в странах экспорта и импорта. Кроме этого, обязательно следует проводить тестирование импортёванных животных на наличие противокоревых АТ класса IgM, свидетельствующих о недавнем инфицировании.

Наибольшее количество сывороток, содержащих

АТ к вирусу ПГ типа 3, обнаружено среди макак яванских – 23,8% (95% ДИ: 12,0%–39,4%, $n = 42$), что достоверно ($p = 0,01$) превышало средний показатель серопозитивности среди особей, рождённых

в питомнике, – 8,1% (95% ДИ: 4,4–13,5%, $n = 160$). Следует отметить, что возраст серопозитивных макак яванских варьировал от 8 до 17 лет. Среди макак резусов и зелёных мартышек доля позитивных сывороток

Таблица 1. Частота выявления антител класса IgG к респираторным вирусам человека среди обезьян Адлерского приматологического центра (рождённых в питомнике и импортных)

Table 1. Detection rates of IgG antibodies to human respiratory viruses among monkeys of the Adler Primate Center (born in the nursery and imported)

Группа обезьян Monkey's group	Вид обезьян Monkey species	Антитела класса IgG к респираторным вирусам* IgG antibodies to respiratory viruses*							
		Корь Measles	Парагрипп 1 тип Parainfluenza 1	Парагрипп 3 тип Parainfluenza 3	Аденовирусы Adenoviruses	Респираторно-синци- тиальный вирус Respiratory syncytial virus	Грипп А Influenza A	Грипп В Influenza B	Пара- грипп 2 тип Parain- fluenza 2
Рождённые в приматологи- ческом центре Born in the Primate Center	Всего Total	50/477 (10,5 ± 2,8)	5/160 (3,1 ± 2,7)	13/160 (8,1 ± 4,2)	3/68 (4,4 ± 4,9)	0/77 (0)	0/122 (0)	0/42 (0)	0/42 (0)
	Макаки резусы Rhesus monkeys (<i>Macaca mulatta</i>)	31/241 (12,9 ± 4,2)	0/46 (0)	2/46 (4,3 ± 5,9)	0/24 (0)	0/36 (0)	0/65 (0)	0/28 (0)	0/28 (0)
	Макаки яванские Cynomolgus monkeys (<i>M. fascicularis</i>)	4/81 (4,9 ± 4,7)	3/42 (7,1 ± 7,8)	10/42 (23,8 ± 12,9)	3/22 (13,6 ± 14,3)	0/31 (0)	0/57 (0)	0/14 (0)	0/14 (0)
	Макаки лапундеры Pig-tailed macaques (<i>M. nemestrina</i>)	5/42 (11,9 ± 9,8)	0/9 (0)	0/9 (0)	0/9 (0)	н.и.** n.i.**	н.и.** n.i.**	н.и.** n.i.**	н.и.** n.i.**
	Зелёные мартышки Givet monkeys (<i>Chlorocebus aethiops</i>)	11/75 (14,7 ± 8,0)	1/37 (2,7 ± 5,2)	2/37 (5,4 ± 7,3)	0/6 (0)	0/10 (0)	н.и.** n.i.**	н.и.** n.i.**	н.и.** n.i.**
	Павианы гамадрилы Hamadryas baboons (<i>Papio hamadryas</i>)	4/38 (10,5 ± 9,7)	1/26 (3,8 ± 7,3)	0/26 (0)	0/7 (0)	н.и.** n.i.**	н.и.** n.i.**	н.и.** n.i.**	н.и.** n.i.**
	Всего Total	42/334 (12,6 ± 3,6)	0/44 (0)	21/221 (9,5 ± 3,9)	7/62 (11,3 ± 7,9)	0/64 (0)	0/16 (0)	0/16 (0)	0/36 (0)
	Макаки яванские (Вьетнам) Cynomolgus monkeys (Vietnam) (<i>M. fascicularis</i>)	42/298 (14,1 ± 3,9)	0/36 (0)	19/213 (8,9 ± 3,8)	3/35 (8,6 ± 9,3)	0/36 (0)	0/16 (0)	0/16 (0)	0/36 (0)
	Зелёные мартышки вервет (Танзания) Vervet monkeys (Tanzania) (<i>Chlorocebus pygerythrus</i>)	0/36 (0)	0/8 (0)	2/8 (25 ± 3 0,0)	4/27 (14,8 ± 13,4)	0/8 (0)	н.и. n.i.	н.и. n.i.	н.и. n.i.
	Итого по двум группам Total for two groups	92/811 (11,3 ± 2,2)	5/204 (2,5 ± 2,1)	34/381 (8,9 ± 2,8)	10/130 (7,7 ± 4,6)	0/171 (0)	0/138 (0)	0/58 (0)	0/78 (0)

Примечание. *данные представлены в виде соотношения – количество серопозитивных особей/количество обследованных особей обезьян (значение в процентах ± ДИ 95%); **н.и. – не исследовано

Note. *the data are presented as a ratio of the number of seropositive individuals/number of examined individuals (percentage ± 95% CI), **n.i., not investigated.

Таблица 2. Частота выявления антител класса IgG к вирусу кори среди обезьян, рождённых в Адлерском приматологическом центре в разные годы**Table 2. Detection rates of IgG antibodies to measles virus among monkeys born in the Adler Primate Center in different years**

Вид обезьян Monkey species	Антитела класса IgG к вирусу кори в сыворотках обезьян, рождённых в разные периоды времени (годы)* IgG antibodies to measles virus in sera of monkeys born at different periods of time (years)*		
	1979–2017	1979–1992	1993–2017
Макаки резусы Rhesus monkeys (<i>Macaca mulatta</i>)	31/241 (12,9 ± 4,2)	31/58 (53,4 ± 12,8)	0/183 (0)
Макаки яванские Synomolgus monkeys (<i>M. fascicularis</i>)	4/81 (4,9 ± 4,7)	4/14 (28,6 ± 23,7)	0/67 (0)
Макаки лапундеры Pig-tailed macaques (<i>M. nemestrina</i>)	5/42 (11,9 ± 9,8)	5/14 (35,7 ± 25,1)	0/28 (0)
Зелёные мартышки Grivet monkeys (<i>Chlorocebus aethiops</i>)	11/75 (14,7 ± 8,0)	10/17 (58,8 ± 23,4)	0/58 (0)
Павианы гамадрилы Hamadryas baboons (<i>Papio hamadryas</i>)	4/38 (10,5 ± 9,7)	4/20 (20,0 ± 17,5)	0/18 (0)
Всего Total	50/477 (10,5 ± 2,8)	50/123 (40,7 ± 8,7)	0/354 (0)

Примечание. *данные представлены в виде соотношения – количество позитивных сывороток/число исследованных сывороток (значение в процентах ± 95% ДИ).

Note. *the data are presented as a ratio of the number of positive sera/number of examined sera (percentage ± 95% CI).

Таблица 3. Частота обнаружения антител классов IgG и IgM к вирусу кори в сыворотках импортированных обезьян**Table 3. Anti-measles IgG and IgM antibodies detection rates in sera of imported monkeys**

Вид обезьян Monkeys' species	№ группы Group No.	Страна импорта (дата поступления) Country of import (receipt date)	Возраст (годы) Age (years)	Антитела к вирусу кори (ИФА) Anti-measles antibodies (ELISA)		
				IgG*	МЕ/мл** IU/ml**	IgM*
Зелёные мартышки вервет Vervet monkeys (<i>Chlorocebus pygerythrus</i>)	1	Танзания Tanzania (01.06.2014)	3,0–6,0	0/36 (0)	0 (0)	0/36 (0)
	1	Вьетнам Vietnam (08.11.2015)	4,0–8,1	23/40 (57,5 ± 15,3)	1,27 ± 0,24	0/40 (0)
Макаки яванские Synomolgus monkeys (<i>Macaca fascicularis</i>)	2	Вьетнам (05.08.2016) Vietnam	3,8–6,7	1/44 (2,3 ± 4,4)	1,2 ± 0,0	0/44 (0)
	3	Вьетнам (22.04.2017) Vietnam	3,7–8,3	8/35 (22,2 ± 13,8)	1,65 ± 0,53	0/35 (0)
	4	Вьетнам (11.05.2017) Vietnam	3,11–8,4	7/35 (20,0 ± 13,2)	1,21 ± 0,24	0/35 (0)
	5	Вьетнам (14.02.2018) Vietnam	1,9–2,6	0/100 (0)	0 (0)	0/100 (0)
		Всего Total		39/254 (15,4 ± 4,4)	1,33 ± 0,34	0/254 (0)
Макаки яванские Synomolgus monkeys (<i>M. fascicularis</i>)	1	Маврикий (17.09.2016) Mauritius	4,9–9,7	3/44 (6,8 ± 7,4)	0,30 ± 0,12	0/44 (0)
Итого по видам Total by species				42/334 (12,6 ± 3,6)	1,26 ± 0,17	0/334 (0)

Примечание. *данные представлены в виде соотношения – количество позитивных сывороток/количество исследованных сывороток (значение в процентах ± 95% ДИ); **реактивность сывороток в МЕ/мл ($M \pm m$); ИФА – иммуноферментный анализ.

Note. *the data are presented as a ratio of the number of positive sera/number of examined individuals (percentage ± 95% CI), **reactivity of sera in IU/ml, $M \pm m$, ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

не превышала 5,4%. У макак лапундеров и павианов гамадрилов АТ к данному вирусу не выявлялись. Среди импортированных макак яванских и зелёных мартышек АТ к вирусу ПГ типа 3 определялись в $8,9 \pm 1,9$ и $25 \pm 15,3\%$ случаев соответственно. Возраст серопозитивных обезьян ($n = 21$) был менее 6 лет. Среднее значение титра положительных сывороток практически не отличалось от такового для родившихся в питомнике особей (1 : 250).

Средняя частота случаев определения АТ к вирусу ПГ 1 типа оказалась невысокой у животных, рождённых в условиях питомника ($3,1 \pm 1,4\%$); у импортированных особей указанные АТ не обнаружены. Средняя величина титра позитивных сывороток была равной 1 : 280.

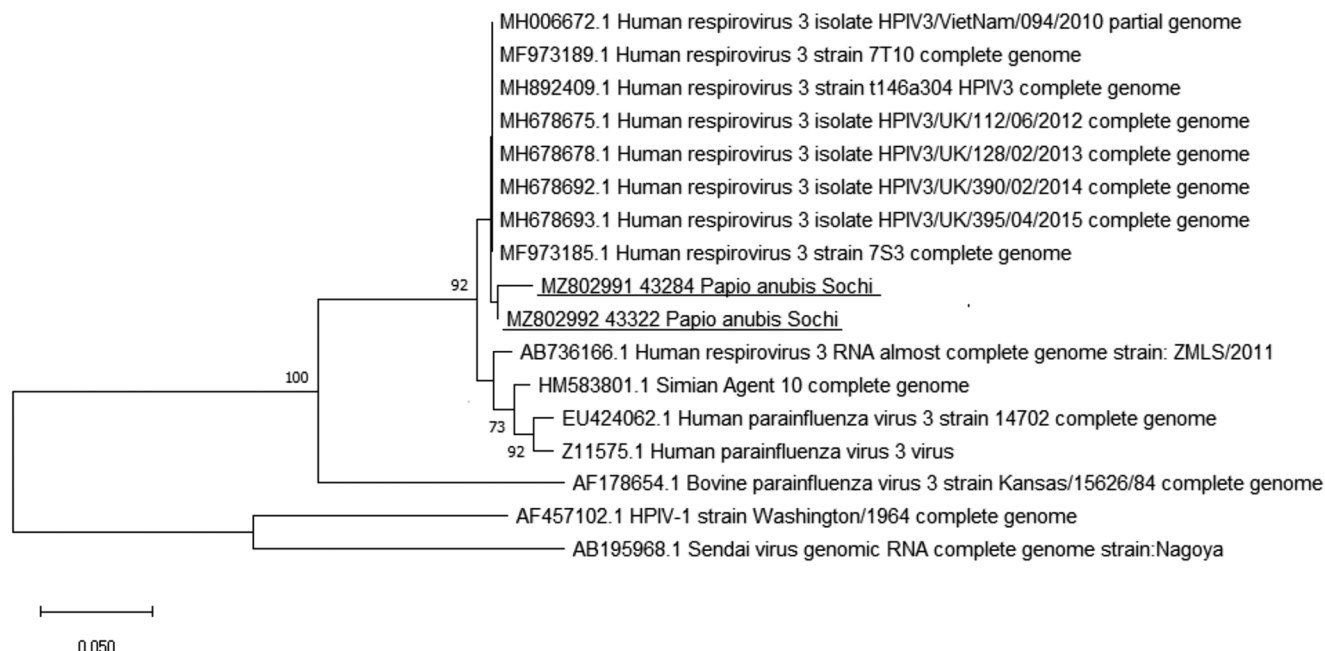
Количество обезьян, имевших АТ к аденовирусам, было в 2,6 раз ниже у рождённых в питомнике ($4,4\%$; 95% ДИ: 0,9–12,4%, $n = 68$) по сравнению с импортированными животными ($11,3\%$; 95% ДИ: 4,6–19%, $n = 62$), однако различия также были недостоверны ($p > 0,05$). Среди 5 видов приматов, родившихся в питомнике и обследованных на АТ к этим вирусам ($n = 68$), данный маркер выявлен только у макак яванских ($13,6\%$; 95% ДИ: 9,2–12,4%; $n = 22$). Средний относительный коэффициент позитивности реактивных образцов был невысоким – 1,1. У поступивших из Вьетнама макак яванских процент положительных особей составил 8,6% (95% ДИ: 1,8–23,1%; $n = 35$), а средний коэффициент позитивности реактивных образцов практически не отличался от такового в аналогичных образцах обезьян, родившихся в условиях питомника (1,3). У зелёных мартышек из Танзании ($n = 27$) выявлены IgG-АТ в 14,8% (95% ДИ: 4,2–33,7%) случаев, а также обнаружены АТ класса IgM в 7,4% (95% ДИ: 0,9–24,3%) наблюдений, что свидетельствует о недавней перенесённой инфекции у этих животных. Средний коэффициент позитивности для положительных по IgG и IgM образцов составил 1,1 и 1,6 соответственно.

На наличие молекулярно-генетических маркеров выборочно проверены 26 образцов лёгочной ткани разных видов обезьян, погибших от пневмонии. Павшие животные представляли 3 возрастные группы: от 1 до 7 дней ($n = 13$), от 1 мес до 1 года ($n = 7$) и от 1 года и старше ($n = 6$). Обнаружены 2 образца (7,7%), содержавших РНК вируса ПГ 3 типа. Генетический материал остальных инфекционных агентов (РС-вируса, метапневмовируса, вирусов ПГ 1, 2 и 4 типов, рино-, корона-, адено- и бокавирусов) в образцах ткани лёгких погибших животных не выявлен. Значения порогового числа циклов (cycle threshold, Ct) в ПЦР для 2 позитивных по РНК вируса ПГ 3 типа образцов были равными 18 и 23 соответственно. Данный биоматериал получен от рождённых в питомнике павианов анубисов в возрасте 3 и 4 мес с диагнозами «двусторонняя крупноочаговая пневмония» и «двусторонняя полисегментарная пневмония». Обезьяны находились в одной вольере и погибли с интервалом в 4 сут. Принадлежность геноизолятов к 3 генотипу вируса ПГ показана также посредством ПЦР с прай-

мерами к участку генома L. Специфичность детекции РНК вируса ПГ типа 3 подтверждена прямым секвенированием амплифицированных фрагментов величиной 367 п.н. Поиск гомологов заданной последовательности нуклеотидов BLAST (basic local alignment search tool) в базе данных NSBI (National Center for Biotechnology Information, Национальный центр биотехнологической информации) и филогенетический анализ (рисунок) позволили подтвердить принадлежность амплифицированных последовательностей к участку L генома вируса ПГ человека типа 3. Его последовательности, выделенные от павианов анубисов, были депонированы в GenBank (№№ MZ802991 и MZ802992).

Полученные в исследовании данные согласуются с литературными, в которых имеются сведения о наличии АТ к РВ человека у макак, павианов и зелёных мартышек [6–10], а также о выявлении РНК вируса ПГ человека типа 3 у павианов [13]. По данным литературы, частота обнаружения указанных АТ у обезьян рода макак, содержащихся в питомниках, составляет 60–100% для ВК [6], 9,1% для вируса ПГ типа 2 и 36,4% – для вируса ПГ типа 3 [14]. В этой связи представляются важными результаты исследования по выявлению АТ к вирусу ПГ 3 типа у 19% обследованных павианов (*Papio cynocephalus* и *P. ursinus*) и у 6,7% зелёных мартышек из различных регионов Замбии. В этом же исследовании у 2,1% павианов установлено наличие РНК вируса ПГ типа 3 человека [13]. Представляют интерес также серологические и вирусологические данные об инфицировании вирусом гриппа А разных видов макак (6,0–29,2%) в естественных условиях обитания при тесном контакте с человеком в странах Юго-Восточной Азии и Индонезии [15]. Кроме того, имеются сообщения о циркуляции среди макак резусов штаммов аденовируса, близкородственных вирусам человека [16], а также о причастности этого патогена к вспышке острой респираторной инфекции у 4 из 9 павианов (*P. hamadryas*, *P. anubis*) в неволе [17].

Большое значение, на наш взгляд, имеют результаты скрининга на АТ к ВК, указывающие на длительное отсутствие циркуляции данного вируса в Адлерском питомнике и высокий риск заноса инфекции с импортированными животными. Эта ситуация кардинально отличается от таковой в Сухумском обезьяньем питомнике (г. Сухум, Абхазия) (1982–1983 гг.), когда противокоревые АТ были выявлены почти у 100% родившихся в условиях питомника макак начиная с годовалого возраста [9]. Кроме того, при обследовании в динамике наблюдалось интенсивное естественное инфицирование ВК обезьян, прибывших в питомник из мест их естественного обитания. Аналогичная картина отмечалась и в других приматологических центрах мира, когда АТ к этому возбудителю определялись, как указывалось выше, у 60–100% обследованных животных [6, 7]. Таким образом, обезьяны могут служить своего рода «индикаторной группой» для оценки эпидемической ситуации по кори в окружающем регионе.



Филогенетическое дерево для нуклеотидных последовательностей участка генома вируса парагриппа 3 человека, кодирующего белок L, величиной 321 п.н. (позиции генома 11 196–11 517, нумерация по прототипному штамму Z11575.1). Дерево построено методом максимального правдоподобия (1000 независимых построений). В узлах дерева указаны значения достоверности поддержки ветвей.

Phylogenetic tree for 321 bp fragment of genome sequences of human parainfluenza virus type 3 encoding L protein (genome positions 11,196–11,517, numbering according to the prototype strain Z11575.1). The tree was built using the maximum likelihood method (1,000 independent constructions). In the tree nodes the bootstrap values for branch support are indicated.

Заключение

Результаты работы свидетельствуют о циркуляции аденовируса и вирусов ПГ человека типов 1 и 3 среди рождённых в питомнике и импортированных обезьян, а также о причастности вируса ПГ человека 3 типа к патологии респираторного тракта у павианов анубисов. Подтверждена необходимость строгого соблюдения сроков карантина и обязательного тестирования обезьян на наличие АТ к ВК класса IgM, свидетельствующих о недавнем инфицировании.

Полученные данные указывают на целесообразность дальнейших исследований, направленных на поиск и идентификацию этих и других вирусных агентов при различных респираторных инфекциях у обезьян.

ЛИТЕРАТУРА

- Boonnak K., Paskel M., Matsuoka Y., Vogel L., Subbarao K. Evaluation of replication, immunogenicity and protective efficacy of a live attenuated cold-adapted pandemic H1N1 influenza virus vaccine in non-human primates. *Vaccine*. 2012; 30(38): 5603–10. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.088>
- Durbin A.P., Elkins W.R., Murphy B.R. African green monkeys provide a useful nonhuman primate model for the study of human parainfluenza virus types-1, -2, and -3 infection. *Vaccine*. 2001; 18(22): 2462–9. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(99\)00575-7](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(99)00575-7)
- Rimmelzwaan G.F., Kuiken T., van Amerongen G., Bestebroer T.M., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. Pathogenesis of influenza A (H5N1) virus infection in a primate model. *J. Virol.* 2001; 75(14): 6687–91. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.14.6687-6691.2001>
- Taylor G. Animal models of respiratory syncytial virus infection. *Vaccine*. 2017; 35(3): 469–80. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.11.054>
- Köndgen S., Kühl H., Goran P.K.N., Walsh P.D., Schenk S., Ernst N., et al. Pandemic human viruses cause decline of endangered great apes. *Curr. Biol.* 2008; 18(4): 260–4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.01.012>
- Kalter S.S., Heberling R.L., Cooke A.W., Barry J.D., Tian P.Y., Northam W.J. Viral infection of nonhuman primates. *Lab. Anim. Sci.* 1997; 47(5): 461–7.
- Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Крылова Р.И., Стасилевич З.К., Яковлева Л.А. Проблемы инфекционной патологии обезьян. М.: Изд-во РАМН; 2004: 29–31.
- Корзая Л.И., Догадов Д.И., Гончаренко А.М., Лапин Б.А. Сравнительное изучение противокорревого иммунитета у взрослого населения города Сочи и обезьян Адлерского приматологического центра. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; 96(2): 61–7. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-2-61-67>
- Корзая Л.И., Кебурия В.В., Гончаренко А.М., Догадов Д.И., Лапин Б.А. Маркёры вирусных инфекций у лабораторных приматов. В кн.: *Материалы второй международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии»*. Сочи; 2011: 79–88.
- Choi Y.K., Simon M.A., Kim D.Y., Yoon B.I., Kwon S.W., Lee K.W., et al. Fatal measles virus infection in Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *Vet. Pathol.* 1999; 36(6): 594–600. <https://doi.org/10.1354/vp.36-6-594>
- Willy M.E., Woodward R.A., Thornton V.B., Wolff A.V., Flynn B.M., Heath J.L., et al. Management of a measles outbreak among old world nonhuman primates. *Lab. Anim. Sci.* 1999; 49(1): 42–8.

12. van Binnendijk R.S., van der Heijden R.W.J., van Amerongen G., UytdeHaag F.G.C.M., Osterhaus A.D.M.E. Viral replication and development of specific immunity in macaques after infection with different measles virus strains. *J. Infect. Dis.* 1994; 170(2): 443–8. <https://doi.org/10.1093/infdis/170.2.443>
13. Sasaki M., Ishii A., Orba Y., Thomas Y., Hang'ombe B.M., Moonga L., et al. Human parainfluenza virus type 3 in wild nonhuman primates, Zambia. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(9): 1500–3. <https://doi.org/10.3201/eid1909.121404>
14. Schillaci M.A., Jones-Engel L., Engel G.A., Kyes R.C. Exposure to human respiratory viruses among urban performing monkeys in Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 75(4): 716–9.
15. Karlsson E.A., Engel G.A., Feeroz M.M., San S., Rompis A., Lee B.P., et al. Influenza virus infection in nonhuman primates. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(10): 1672–5. <https://doi.org/10.3201/eid1810.120214>
16. Roy S., Sandhu A., Medina A., Clawson D.S., Wilson J.M. Adenoviruses in fecal samples from asymptomatic rhesus macaques, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(7): 1081–8. <https://doi.org/10.3201/eid1807.111665>
17. Chiu C.Y., Yagi S., Lu X., Yu G., Chen E.C., Liu M., et al. A novel adenovirus species associated with an acute respiratory outbreak in a baboon colony and evidence of coincident human infection. *mBio.* 2013; 4(2): e00084. <https://doi.org/10.1128/mBio.00084-13>
7. Lapin B.A., Dzhikidze E.K., Krylova R.I., Stasilevich Z.K., Yakovleva L.A. *Problems of Infectious Pathology in Monkeys [Problemy infektsionnoy patologii obez'yan]*. Moscow: RAS Publishing; 2004: 29–31. (in Russian)
8. Korzaya L.I., Dogadov D.I., Goncharenko A.M., Lapin B.A. Comparative study of anti-measles immunity in adult population of Sochi and laboratory primates of Adler primate center [*Sravnitel'noe izucheniye protivokorevogo immuniteta u vzoslogo naseleniya goroda Sochi i obez'yan Adlerskogo primatologicheskogo tsentra*]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2019; 96(2): 61–7. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-2-61-67> (in Russian)
9. Korzaya L.I., Keburiya V.V., Goncharenko A.M., Dogadov D.I., Lapin B.A. Markers of laboratory primates' viral infections. In: *Materials of the 2nd International Scientific Conference «Fundamental and Applied Aspects of Medical Primatology» [Markery virusnykh infektsiy u laboratornykh primatov. V kn.: Materialy vtoroy mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii «Fundamental'nye i prikladnye aspekty meditsinskoy primatologii»]*. Sochi; 2011: 79–88. (in Russian)
10. Choi Y.K., Simon M.A., Kim D.Y., Yoon B.I., Kwon S.W., Lee K.W., et al. Fatal measles virus infection in Japanese macaques (*Macaca fuscata*). *Vet. Pathol.* 1999; 36(6): 594–600. <https://doi.org/10.1354/vp.36-6-594>
11. Willy M.E., Woodward R.A., Thornton V.B., Wolff A.V., Flynn B.M., Heath J.L., et al. Management of a measles outbreak among old world nonhuman primates. *Lab. Anim. Sci.* 1999; 49(1): 42–8.
12. van Binnendijk R.S., van der Heijden R.W.J., van Amerongen G., UytdeHaag F.G.C.M., Osterhaus A.D.M.E. Viral replication and development of specific immunity in macaques after infection with different measles virus strains. *J. Infect. Dis.* 1994; 170(2): 443–8. <https://doi.org/10.1093/infdis/170.2.443>
13. Sasaki M., Ishii A., Orba Y., Thomas Y., Hang'ombe B.M., Moonga L., et al. Human parainfluenza virus type 3 in wild nonhuman primates, Zambia. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(9): 1500–3. <https://doi.org/10.3201/eid1909.121404>
14. Schillaci M.A., Jones-Engel L., Engel G.A., Kyes R.C. Exposure to human respiratory viruses among urban performing monkeys in Indonesia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006; 75(4): 716–9.
15. Karlsson E.A., Engel G.A., Feeroz M.M., San S., Rompis A., Lee B.P., et al. Influenza virus infection in nonhuman primates. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(10): 1672–5. <https://doi.org/10.3201/eid1810.120214>
16. Roy S., Sandhu A., Medina A., Clawson D.S., Wilson J.M. Adenoviruses in fecal samples from asymptomatic rhesus macaques, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(7): 1081–8. <https://doi.org/10.3201/eid1807.111665>
17. Chiu C.Y., Yagi S., Lu X., Yu G., Chen E.C., Liu M., et al. A novel adenovirus species associated with an acute respiratory outbreak in a baboon colony and evidence of coincident human infection. *mBio.* 2013; 4(2): e00084. <https://doi.org/10.1128/mBio.00084-13>

REFERENCES

1. Boonnak K., Paskel M., Matsuoka Y., Vogel L., Subbarao K. Evaluation of replication, immunogenicity and protective efficacy of a live attenuated cold-adapted pandemic H1N1 influenza virus vaccine in non-human primates. *Vaccine.* 2012; 30(38): 5603–10. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.088>
2. Durbin A.P., Elkins W.R., Murphy B.R. African green monkeys provide a useful nonhuman primate model for the study of human parainfluenza virus types-1, -2, and -3 infection. *Vaccine.* 2001; 18(22): 2462–9. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(99\)00575-7](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(99)00575-7)
3. Rimmelzwaan G.F., Kuiken T., van Amerongen G., Bestebroer T.M., Fouchier R.A., Osterhaus A.D. Pathogenesis of influenza A (H5N1) virus infection in a primate model. *J. Virol.* 2001; 75(14): 6687–91. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.14.6687-6691.2001>
4. Taylor G. Animal models of respiratory syncytial virus infection. *Vaccine.* 2017; 35(3): 469–80. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.11.054>
5. Köndgen S., Kühl H., Goran P.K.N., Walsh P.D., Schenk S., Ernst N., et al. Pandemic human viruses cause decline of endangered great apes. *Curr. Biol.* 2008; 18(4): 260–4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.01.012>
6. Kalter S.S., Heberling R.L., Cooke A.W., Barry J.D., Tian P.Y., Northam W.J. Viral infection of nonhuman primates. *Lab. Anim. Sci.* 1997; 47(5): 461–7.

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-80>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



Картирование ДНК в капсиде гигантского бактериофага *phiEL* (*Caudovirales: Myoviridae: Elvirus*) с помощью аналитической электронной микроскопии

Трифонов Т.С.^{1,2*}, Моисеенко А.В.^{2,3*}, Буркальцева М.В.⁴, Шабурова О.В.⁴,
Шайтан А.К.², Крылов В.Н.⁴, Соколова О.С.²

¹ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», факультет физико-математических и естественных наук, 115419, Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», биологический факультет, кафедра биоинженерии, 119234, Москва, Россия;

³ФГБУН «Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова Российской академии наук», 119334, Москва, Россия;

⁴ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия

Введение. Гигантские *phiKZ*-подобные бактериофаги имеют внутри капсида уникальное белковое образование – внутреннее тело (ВТ), на которое намотана суперскрученная ДНК. Стандартные подходы, используемые в криоэлектронной микроскопии (криоЭМ), не позволяют отличить эту структуру от окружающей её молекулы нуклеиновой кислоты фага. Ранее нами разработан аналитический подход для визуализации комплексов ДНК с белком на срезах бактериальных клеток *Escherichia coli* с использованием в качестве маркера химического элемента фосфора. В настоящем исследовании мы адаптировали данную методику к значительно более мелким объектам – капсидам *phiKZ*-подобных бактериофагов.

Материал и методы. В исследовании применялись методы электронной микроскопии: аналитическая (АЭМ) (спектроскопия характеристических потерь энергии электронами, СХПЭЭ) и криоЭМ (сравнение изображений образцов с низкой и высокой дозой электронного облучения).

Результаты. Мы изучили упаковку молекулы ДНК внутри капсидов гигантских бактериофагов *phiEL* из семейства *Myoviridae*, инфицирующих *Pseudomonas aeruginosa*. Построены карты распределения фосфора, показавшие несимметричное расположение ДНК внутри капсида.

Обсуждение. Мы разработали и применили методику визуализации ВТ с использованием высокоуглового темнопольного детектора (HAADF) и аналитического подхода СПЭМ-СХПЭЭ. Картирование распределения фосфора посредством СХПЭЭ и результаты криоЭМ выявили белковую структуру внутри капсида фагов *phiEL* в виде ВТ, размер которого был оценён с помощью теоретических расчётов.

Заключение. Разработанная методика может применяться для исследования распределения фосфора в других ДНК- или РНК-содержащих вирусах при сравнительно низких содержаниях искомого элемента.

Ключевые слова: гигантский бактериофаг; *phiEL*; *Pseudomonas aeruginosa*; внутреннее тело (ВТ); аналитическая электронная микроскопия (АЭМ); спектроскопия характеристических потерь энергии электронами (СХПЭЭ); криоэлектронная микроскопия (криоЭМ); «пузырьковая диаграмма»

Для цитирования: Трифонов Т.С., Моисеенко А.В., Буркальцева М.В., Шабурова О.В., Шайтан А.К., Крылов В.Н., Соколова О.С. Картирование ДНК в капсиде гигантского бактериофага *phiEL* (*Caudovirales: Myoviridae: Elvirus*) с помощью аналитической электронной микроскопии. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(6): 434-441. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-80>

Для корреспонденции: Соколова Ольга Сергеевна, д-р биол. наук, профессор РАН, профессор кафедры биоинженерии биологического факультета, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», 119234, Москва, Россия. E-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

Участие авторов: Трифонов Т.С. – проведение экспериментов по аналитической микроскопии; Моисеенко А.В. – проведение экспериментов по аналитической микроскопии, редактирование текста; Буркальцева М.В. – получение в высоком титре и очистка бактериофагов; Шабурова О.В. – выполнение криоэлектронной микроскопии; Шайтан А.К. – проведение теоретических расчётов; Крылов В.Н. – организация экспериментов; Соколова О.С. – выполнение криоэлектронной микроскопии, написание текста, резюме, общая редакция статьи.

Финансирование. Данное исследование финансировалось за счёт гранта Российского научного фонда (№ 21-44-07002).

Благодарности. Спектры характеристических потерь энергии электронами получены с использованием уникальной научной установки (УНУ) «3D-ЭМС» биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова. Криоэлектронная микроскопия проводилась в Федеральном научно-исследовательском центре «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 30.09.2021

Принята в печать 22.10.2021

Опубликована 30.12.2021

*Первые авторы статьи

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-80>

DNA mapping in the capsid of giant bacteriophage phiEL (*Caudovirales: Myoviridae: Elvirus*) by analytical electron microscopy

Tatiana S. Trifonova^{1,2*}, Andrey V. Moiseenko^{2,3*}, Maria V. Bourkaltseva⁴,
Olga V. Shaburova⁴, Alexey K. Shaytan², Victor N. Krylov⁴, Olga S. Sokolova²

¹FSAEI HE «People's Friendship University of Russia», Physical, Mathematical, and Natural Sciences Department, 115419, Moscow, Russia;

²FSBEI HE «Lomonosov Moscow State University», Bioengineering Department, Biological Faculty, 119234, Moscow, Russia;

³FSBIS «N.N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences», 119234, Moscow, Russia;

⁴FSBRI «I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera», 105064, Moscow, Russia

Introduction. Giant phiKZ-like bacteriophages have a unique protein formation inside the capsid, an inner body (IB) with supercoiled DNA molecule wrapped around it. Standard cryo-electron microscopy (cryo-EM) approaches do not allow to distinguish this structure from the surrounding nucleic acid of the phage. We previously developed an analytical approach to visualize protein-DNA complexes on *Escherichia coli* bacterial cell slices using the chemical element phosphorus as a marker. In the study presented, we adapted this technique for much smaller objects, namely the capsids of phiKZ-like bacteriophages.

Material and methods. Following electron microscopy techniques were used in the study: analytical (AEM) (electron energy loss spectroscopy, EELS), and cryo-EM (images of samples subjected to low and high dose of electron irradiation were compared).

Results. We studied DNA packaging inside the capsids of giant bacteriophages phiEL from the *Myoviridae* family that infect *Pseudomonas aeruginosa*. Phosphorus distribution maps were obtained, showing an asymmetrical arrangement of DNA inside the capsid.

Discussion. We developed and applied an IB imaging technique using a high angle dark-field detector (HAADF) and the STEM-EELS analytical approach. Phosphorus mapping by EELS and cryo-electron microscopy revealed a protein formation as IB within the phage phiEL capsid. The size of IB was estimated using theoretical calculations.

Conclusion. The developed technique can be applied to study the distribution of phosphorus in other DNA- or RNA-containing viruses at relatively low concentrations of the element sought.

Keywords: giant bacteriophage; phiEL; *Pseudomonas aeruginosa*; inner body (IB); analytical electron microscopy (AEM); electron energy loss spectroscopy (EELS); cryo-electron microscopy (cryo-EM); «bubblegram imaging»

For citation: Trifonova T.S., Moiseenko A.V., Bourkaltseva M.V., Shaburova O.V., Shaytan A.K., Krylov V.N., Sokolova O.S. DNA mapping in the capsid of giant bacteriophage phiEL (*Caudovirales: Myoviridae: Elvirus*) by analytical electron microscopy. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(6): 434-441.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-80>

For correspondence: Olga S. Sokolova, D.Sci. (Biol.), RAS Professor, Professor of Bioengineering Department, Biological Faculty, FSBEI HE «Lomonosov Moscow State University, 119234, Moscow, Russia. E-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

Information about the authors:

Trifonova T.S., <http://orcid.org/0000-0003-2042-5244>

Moiseenko A.V., <http://orcid.org/0000-0003-1112-2356>

Bourkaltseva M.V., <http://orcid.org/0000-0003-3793-1354>

Shaburova O.V., <http://orcid.org/0000-0003-0368-3794>

Shaytan A.K., <http://orcid.org/0000-0003-0312-938X>

Krylov V.N., <http://orcid.org/0000-0001-5775-5146>

Sokolova O.S., <http://orcid.org/0000-0003-4678-232X>

Contribution: Trifonova T.S. – analytical microscopy experiments; Moiseenko A.V. – analytical microscopy experiments, text editing; Bourkaltseva M.V. – preparation of high-titer phage stocks and bacteriophage purification; Shaburova O.V. – cryo-electron microscopy performing; Shaytan A.K. – carrying out theoretical calculations; Krylov V.N. – experiment organization; Sokolova O.S. – cryo-electron microscopy performing, writing of the text, summary, general editing of the article.

Funding. This study was funded by a grant from the Russian Science Foundation (No. 21-44-07002).

Acknowledgement. EELS spectra were obtained using a unique scientific setup «3D-EMS» of the Biological Faculty, FSBEI HE «Lomonosov Moscow State University». Cryo-EM was performed at the Federal Science Research Center for Crystallography and Photonics of the Russian Academy of Sciences.

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

Received 30 September 2021

Accepted 22 October 2021

Published 30 December 2021

*Shared first co-authorship

Введение

Бактериофаги (или фаги) – это вирусы, заражающие бактерии и использующие их ресурсы для своего размножения. Данные микроорганизмы чрезвычайно распространены в естественной среде, при этом большинство из них специфичны в отношении определённых видов бактерий. Система фаг–бактерия часто используется в качестве модельной для изучения этапов жизненного цикла вирусов и понимания механизмов, с помощью которых бактериальные гены могут передаваться от одной бактерии к другой [1].

Хвостатые бактериофаги, содержащие двухцепочечную ДНК, представляют собой филогенетически самую древнюю и наиболее распространённую группу бактериальных вирусов. Порядок *Caudovirales* включает 3 семейства: *Podoviridae*, *Siphoviridae* и *Myoviridae*. Фаги семейства *Mioviridae* составляют около 25% всех фагов *Caudovirales* и отличаются наличием особой структуры – длинного сократимого хвоста. Представители этой группы поражают многие патогенные бактерии, такие как *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium*, *Clostridium*, *Salmonella* и др. Гигантские бактериофаги семейства *Myoviridae* инфицируют также *Pseudomonas aeruginosa* (phiKZ, phiEL, phiLin68), *Bacillus subtilis* (AR9), а также *Pseudomonas chlororaphis* (фаг 201phi2-1) и *Erwinia amylovora* (vB_EamM [2]). Поэтому указанные бактериофаги находят широкое применение в фаговой терапии [3], что значительно расширяет практические возможности медицины и ветеринарии, позволяя в ряде случаев избежать излишнего применения антибиотиков.

В настоящее время число найденных новых гигантских фагов ежегодно увеличивается. Структура некоторых из них изучена с помощью криоэлектронной микроскопии (криоЭМ) [4, 5]), и геномы их секвенированы [6, 7]. Гигантские phiKZ-подобные бактериофаги, активные на бактериях *P. aeruginosa*, имеют кольцевую генетическую карту (признак фагов, реплицирующихся через образование конкатемеров и имеющих терминальную избыточность генома), при этом суперскрученная молекула ДНК навита вокруг спирального образования – внутреннего тела (ВТ) белковой природы [5, 8–10]. Считается, что в процессе инфицирования клетки-хозяина белки ВТ совместно с ДНК участвуют в транскрипции ранних генов [11, 12].

Первое упоминание о ВТ гигантских бактериофагов относится ещё к 1984 г., когда фаг phiKZ подвергли процедуре замораживания-оттаивания [9]. В ходе эксперимента из разрушенных капсидов вместе с ДНК произошло высвобождение катушкоподобных структур. Авторы предположили, что эти образования могут выполнять функцию поддержки ДНК в гигантском капсиде. Позже атомно-силовая микроскопия (АСМ) также показала выход ВТ из частично разрушенных капсидов phiKZ [13]. Наконец, через 30 лет после первого обнаружения указанных образований была представлена криотехника, названная «пузырь-

ковой диаграммой» (англ. «bubblegram imaging»), позволившая окончательно доказать наличие ВТ внутри капсидов гигантских фагов [5, 10] и даже построить его трёхмерную реконструкцию [10]. С этого времени начались экспериментальные исследования, в которых другие фаги и вирусы подвергались облучению высокими дозами электронов для выявления белковых структур внутри капсида [14–16].

На сегодняшний день в биологии находят широкое применение различные виды просвечивающей электронной микроскопии, в частности сканирующая (растровая) просвечивающая электронная микроскопия (СПЭМ). С целью установления элементного состава различных образцов возможно использование аналитической электронной микроскопии (АЭМ). Наиболее надёжным и простым способом является энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭДРС), предоставляющая возможность осуществлять пространственно-разрешённый элементный анализ на срезах клеток с большим количеством искомым элементов, а также детектировать клеточные включения [17], эндокринные гранулы [18], наночастицы [19]. Мы применили эту методику для визуализации комплексов ДНК с белком Dps на срезах бактериальных клеток *E. coli* [20], используя как маркер химический элемент фосфор (1 молекула ДНК содержит 2 фосфатные группы на каждую пару нуклеотидов).

Более сложный метод – спектроскопия характеристических потерь энергии электронов (СХПЭЭ), предназначенная для работы с тонкими структурами спектров элементов, определения характера химических связей и полосы проводимости веществ. Среди ранних исследований с использованием СХПЭЭ следует отметить её применение для пространственно-разрешённого анализа фосфора в нуклеиновых кислотах и изучения их пространственной организации на срезах [21]. Картирование фосфора описано также для ультратонких срезов вирусов мышиной лейкемии (MuLV, murine leukemia virus) [22], замороженных личинок дрозофил (*Drosophila*) [23] и плёнок, образованных бактериофагами λ [24]. Все эти эксперименты выполнены при помощи энергетически фильтруемой просвечивающей электронной микроскопии (energy-filtered transmission electron microscopy, EFTEM).

В настоящей работе мы значительно повысили чувствительность метода, применив СПЭМ-СХПЭЭ-анализ и использовав охлаждающий держатель образцов для минимизации радиационного повреждения. Это позволило картировать ДНК в значительно меньшем по размеру объекте – капсиде гигантского бактериофага phiEL (диаметр 145 нм). В результате мы впервые продемонстрировали присутствие ВТ внутри капсида данного фага с использованием аналитических подходов: темнопольного изображения в высокоугловых рассеянных электронах (high-angle annular dark-field, HAADF) и СХПЭЭ. Валидация предложенной методики проведена с помощью криоЭМ и теоретического моделирования.

Материал и методы

Получение в высоком титре и очистка бактериофага phiEL

Фаг из отдельной негативной колонии вносили в верхний слой полужидкого (0,6%) агара, содержащего 1×10^8 КОЕ/мл (КОЕ – колониеобразующая единица) чувствительных бактерий. Смесь помещали на чашки с плотной средой, которые затем инкубировали 16–18 ч при температуре 37 °С. Верхний слой снимали шпателем и ресуспендировали в 0,9% растворе хлорида натрия (NaCl), после чего препарат обрабатывали хлороформом (CHCl_3) и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 30 мин для удаления агара и остатков клеток. Дальнейшую очистку фага проводили в градиенте хлорида цезия (CsCl) (плотность от 1,33 до 1,6) по методу, описанному J. Sambrook и соавт. [25], путём центрифугирования при 22 000 об/мин на протяжении 4 ч. Материал из полосы, соответствовавшей фагу phiEL, отбирали и освобождали от CsCl посредством диализа 16–18 ч на льду против 0,01 М Трис-HCl буфера, содержащего 0,2 М NaCl и 0,002 М хлорида магния (MgCl_2), при pH 7,5.

Криоэлектронная микроскопия

3 мкл очищенных бактериофагов (концентрация 1×10^{12} БОЕ/мл) (БОЕ – бляшкообразующая единица) наносили на сетку Quantifoil R 1.2/1.3 (Quantifoil, Германия), обработанную в атмосфере тлеющего разряда в приборе Emitech K100X (Quorum Technologies, Great Britain, England). Сетки замораживали в жидком этане (C_2H_6) в установке Vitrobot Mark III (FEI, США) при следующих параметрах: время промакивания 2 с, температура климатической камеры +4 °С, влажность – 95%; после этого их хранили в жидком азоте (N_2) до использования. Для изучения сетки переносили при температуре жидкого азота (–195,8 °С) в криоэлектронный просвечивающий микроскоп Tecnai G²12 SPIRIT (FEI), работающий при ускоряющем напряжении 120 кВ. Изображения получали с увеличением $\times 50\,000$ при помощи ПЗС-камеры (ПЗС – прибор с зарядовой связью/переносом заряда) Eagle 4K $\times$ 4K (FEI) с размером матрицы 4000 $\times$ 4000 пикс. Размер 1 пикс на микрофотографиях составил 2,22 Å.

Спектроскопия потери энергии электронов

3 мл очищенных бактериофагов phiEL наносили на медную сетку (Ted Pella Inc., США), покрытую углеродом (C) и обработанную в атмосфере тлеющего разряда в приборе Emitech K100X, на 30 с; избыток жидкости удаляли фильтровальной бумагой и окрашивали сетки 2% водным раствором молибдата аммония ($(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$) в течение 30 с. После этого их высушивали на воздухе и хранили в пластиковом контейнере до использования. Впоследствии сетки загружали в охлаждающий держатель образцов модели 21090 (JEOL, Япония), вставляли в колонну микроскопа и понижали температуру держателя до –182 °С для уменьшения эффекта радиационного поврежде-

ния и повышения стабильности образца под электронным пучком.

Спектры СХПЭЭ и карты элементов фосфора получали на спектрометре Gatan GIF Quantum ER (Gatan, США) в режиме СПЭМ. Размер 1 пикс был установлен на 15–20 нм (значение варьировалось в зависимости от конкретного образца). Коррекция дрейфа СПЭМ применялась после каждых 40–50 пикс. Каждый спектр получен при угле сбора 6,0 мрад, дисперсии 0,25 эВ и энергетическом сдвиге спектра на 132 эВ. Спектры из разных пикселей были выровнены по К-пику углерода. Фон экстраполировался согласно степенному закону по окну 118–128 эВ; окно сигнала для картирования фосфора было установлено на 132–155 эВ, что соответствует положению $L_{2,3}$ -пика данного элемента. Коррекция многократного рассеяния не использовалась. Для каждого из пикселей на изображениях, полученных с помощью высокоуглового темнопольного детектора, построен спектр СХПЭЭ, из совокупности которых составлены карты пространственного распределения фосфора.

Результаты

«Пузырьковые диаграммы» и расположение внутреннего тела в капсиде бактериофага phiEL

Для визуализации «пузырьковых диаграмм» с одной и той же области замороженного в аморфном (витрифицированном) льду образца бактериофагов дважды получали электронно-микроскопические изображения – с низкой (10–20 эВ/Å·с) и с высокой (40 эВ/Å·с) дозой электронов (следует отметить, что последняя вызывает радиационное повреждение белков) (рис. 1 а, б) [26, 27]. На серии выполненных микрофотографий видно, что ряды пузырьков водорода (H_2), выделяющегося при радиолитическом расщеплении воды, располагаются внутри капсида вдоль границы белковой структуры, взаимодействующей с нуклеиновой кислотой (рис. 1, б).

При экспозиции 1 с (рис. 1, а) мы не наблюдали наличия в капсидах ВТ, как и описывалось ранее [10]. Экспозиция длительностью в 2 с привела к тому, что на изображениях появились «пузырьковые диаграммы» как следствие воздействия повышенной дозы электронов (рис. 1, б). При этом локализация данных образований соответствовала расположению ВТ между противоположными вершинами икосаэдрического капсида.

Теоретическая модель упаковки ДНК внутри головки гигантского бактериофага

Для изучения способов упаковки молекулы ДНК внутри гигантского капсида фага мы построили простую теоретическую модель. Во-первых, мы учитывали, что ДНК – это полугибкий полимер, на локальном уровне достаточно жёсткий для того, чтобы его укладка напоминала упаковку жёстких стержней; на более же крупном уровне он достаточно гибок, чтобы заполнить капсид вируса, принимая при необходимости геометрическую форму изогнутой фигуры.

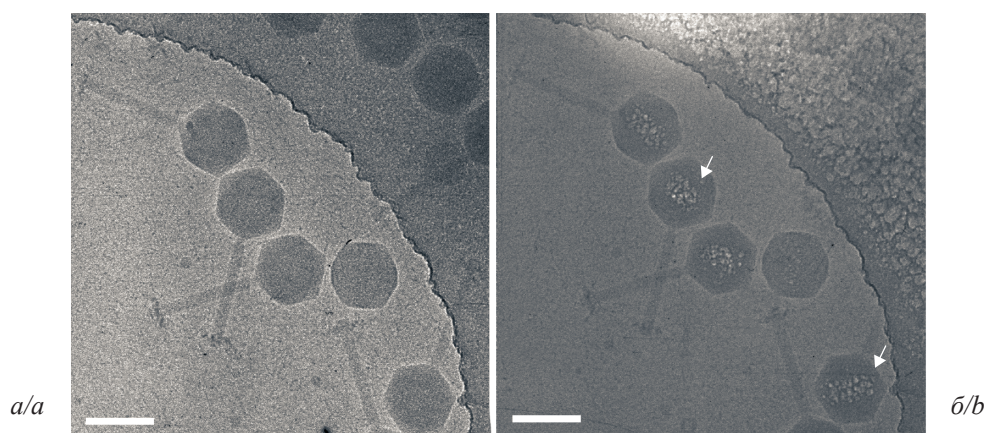


Рис. 1. Полученные при криоэлектронной микроскопии изображения частиц бактериофага phiEL, замороженных в витрифицированном льду, после облучения низкой (а) и высокой (б) дозой электронов. Белые стрелки указывают на «пузырьковые диаграммы» (б), соответствующие радиационному повреждению внутреннего тела в капсиде. Масштабный отрезок – 150 нм.

Fig. 1. Cryogenic electron microscopy images of phiEL bacteriophage particles frozen in vitrified ice after low dose (a) and high dose (b) electron irradiation. White arrows point to «bubblegram images» (b) resulted from a radiation damage to the inner body in the capsid. The scale bar is 150 nm.

Это согласуется с результатами крупнозернистого моделирования (coarse-grained modeling) упаковки ДНК в вирусные капсиды [28]. Далее мы предположили, что ДНК нерастяжима, вследствие чего увеличение расстояния между тяжами молекулы ослабляет упаковку только в 2 измерениях. Последнее допущение, в свою очередь, подразумевает обратную квадратичную зависимость плотности упаковки ДНК от расстояния между тяжами. В результате было выведено уравнение, связывающее размер генома (S), занимаемый молекулой ДНК объем (V) и расстояние между её тяжами (d):

$$\frac{S}{V} = \frac{A}{d^2}, \quad (1),$$

где A – константа, которую можно рассчитать, имея все остальные показатели для конкретного вирусного капсида.

Подставляя в формулу известные значения для фага phiKZ из материалов соответствующих работ [4, 10, 29], мы получили величину A , равную $3,149 \times 10^{-3}$ т.п.н./нм. Таким образом, используя расчётное значение константы и литературные данные, можно рассчитать объём ВТ фага phiEL (таблица).

Аналитическая микроскопия бактериофага phiEL

Далее мы провели эксперименты с применением СХПЭЭ для идентификации фосфора внутри капсидов гигантского фага phiEL. Поскольку его геном составляет 211 т.п.н., на него приходится 422 тыс. атомов этого элемента. Мы использовали охлаждающий держатель с целью минимизации радиационного повреждения, что существенно увеличило стабильность образца под электронным лучом, уменьшило эффект «дрейфа» образца во время накопления спектров, а также минимизировало выраженность контаминации его поверхности в результате сканирования электронным зондом. Помимо этого, было применено не-

гативное окрашивание образцов с помощью 2% раствора $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ вместо рутинного окрашивания с использованием ацетата урана (уранилацетата, $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Это, в свою очередь, позволило избежать перекрытия в спектре $\text{O}_{4,5}$ -пика урана на 96 эВ и $\text{L}_{2,3}$ -пика фосфора на 132 эВ, которое препятствует корректной аппроксимации фоновой составляющей перед пиком фосфора.

Интенсивность сигнала фосфора в каждой точке изображения была использована для СПЭМ-СХПЭЭ-картирования данного элемента после вычитания из спектров фоновой составляющей. Типичное распределение фосфора в пределах одного вириона показано на рис. 2. Соответствующий характеристический сигнал зафиксирован только во внутренней части вириона, но не снаружи него (рис. 2, з). Более того, внутри капсида наблюдалась приблизительно прямоугольной формы область (рис. 2, в), в которой детектировалась очень низкая (сопоставимая с фоном) интенсивность сигнала фосфора либо последняя отсутствовала совсем (рис. 2, з). Описанное явление вполне определённо отражает несимметричное распределение геномной ДНК внутри капсида.

Обсуждение

В данной работе мы использовали картирование элемента фосфора на основе результатов СПЭМ-СХПЭЭ-анализа. Ранее этот метод позволил нам впервые визуализировать ДНК гигантского бактериофага phiKZ внутри псевдоядра, образованного при инфицировании *P. aeruginosa* [12]. В настоящем случае эта техника была адаптирована для изучения вирусных капсидов phiEL (диаметр 145 нм).

При картировании фосфора (рис. 2) обнаружен сильный сигнал внутри капсида, в то время как снаружи него интенсивность сигнала практически не определялась. Как свидетельствуют наши предыдущие исследования, регистрируемый сигнал исходил от молекулы ви-

Таблица. Сравнение геометрии капсида и рассчитанных объёмов геномов бактериофагов phiKZ и phiEL

Table. Comparison of capsid geometry and calculated genome volumes of bacteriophages phiKZ and phiEL

Размеры капсида бактериофага и параметры для упаковки генома Bacteriophage capsid size and parameters for genome packaging	Бактериофаги Bacteriophages	
	phiKZ	phiEL
Высота, нм Height, nm	145,5*	145,0**
Толщина стенки, нм Wall thickness, nm	5*	5**
Внутренний объем, нм ³ Inner volume, nm ³	744 676	736 303
Объем пустого капсида, нм ³ Empty capsid volume, nm ³	697 156	642 427
Объем генома, нм ³ Genome volume, nm ³	515 672***	388 595***
Расстояние между тяжами ДНК, нм Distance between DNA rods, nm	2,8*	3,1**
Объем внутреннего тела, нм ³ Inner body volume, nm ³	47 520****	93 876†

Примечание. *данные A. Fokine и соавт. [4]; **данные O.S. Sokolova и соавт. [5]; ***данные М.В. Буркальцевой и соавт. [29]; ****данные W. Wu и соавт. [10]; †результаты настоящего исследования.

Note. *according to Fokine A. et al. [4]; **according to Sokolova O.S. et al. [5]; ***according to Burkal'tseva M.V. et al. [29]; ****according to Wu W. et al. [10]; †results of this study.

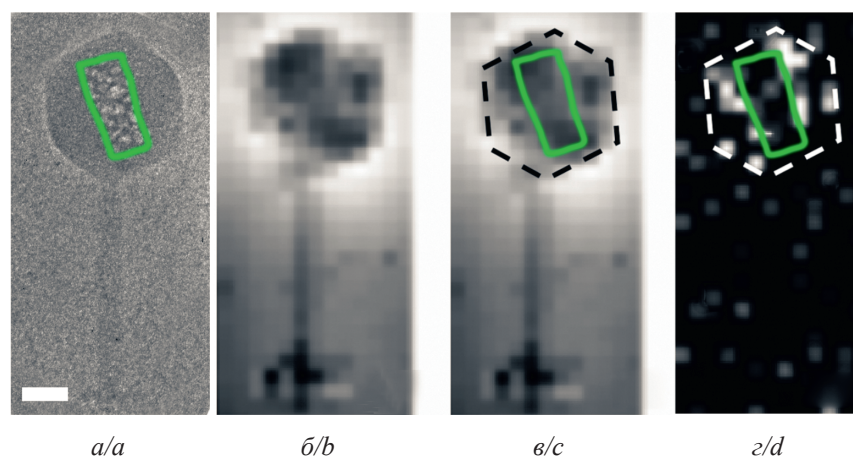


Рис. 2. Расположение внутреннего тела в капсиде бактериофага phiEL при картировании фосфора. *a)* – полученное при криоэлектронной микроскопии изображение бактериофага phiEL, облучённого высокой дозой электронов. Область внутреннего тела выделена линией зелёного цвета. Масштабный отрезок – 50 нм; *б), в)* – темнопольное изображение в высокоугловых рассеянных электронах частицы бактериофага phiEL. Границы капсида отмечены пунктирной линией чёрного цвета, область внутреннего тела выделена линией зелёного цвета (*б*); *г)* – карта распределения фосфора. Интенсивность пикселей отражает уровень сигнала элемента в спектрах характеристических потерь энергии электронами. Границы капсида отмечены пунктирной линией белого цвета; внутреннее тело показано линией зелёного цвета.

Fig. 2. Location of the internal body in phiEL bacteriophage capsid in phosphorus mapping. *a)* – cryo-electron microscopy image of the phiEL bacteriophage particle irradiated with a high dose of electrons. The inner body area is indicated with a green line. The scale bar is 50 nm; *b), c)* – high-angle annular dark-field image of the phiEL bacteriophage particle. The boundaries of the capsid are marked with a black dotted line, and the area of the inner body is indicated with green line (*c*); *d)* – phosphorus distribution map. The pixel intensity reflects the level of the phosphorus signal in the electron energy loss spectra. The borders of the capsid are marked with a white dotted line, and the inner body is shown with a green line.

русной нуклеиновой кислоты [30, 31]. Распределение фосфора оказалось неравномерным: прямоугольная область посередине капсида содержала очень слабый сигнал либо не содержала его вовсе, по краям же указанной области наблюдалась большая интенсивность сигнала. Мы объяснили это наличием в капсиде phiEL белкового тела, занимающего значительную часть внутреннего объёма. Ранее ВТ фага phiKZ идентифицировали различными способами: электронно-микро-

скопическим с негативным окрашиванием образцов [9], АСМ [13], криоЭМ [10]. В данном исследовании мы разработали и применили методику визуализации внутреннего тела с использованием высокоуглового темнопольного детектора (HAADF) и аналитического подхода СПЭМ-СХПЭЭ. Это позволило в отличие от ранних исследований идентифицировать область нахождения ВТ непосредственно в капсиде гигантского бактериофага phiEL [9, 13].

В целях валидации разработанного метода мы применили криоЭМ (рис. 1). Мы показали, что расположение и форма ВТ, оценённые с помощью «пузырьковых диаграмм» (рис. 2, а), в достаточной степени совпадают с областями отсутствия сигнала от фосфора (рис. 2, з). Размеры ВТ бактериофага *phiEL* были рассчитаны на основе литературных данных (таблица) и показали, что объём его ВТ почти в 2 раза больше такового для *phiKZ*. Полученные результаты хорошо согласуются с тем фактом, что длины геномов фагов *phiKZ* и *phiEL* различаются; при этом молекула ДНК последнего короче на ~30% [29], однако она упакована в такой же по размеру капсид [5].

Следует отметить, что описанная методика может использоваться для изучения распределения нуклеиновых кислот и картирования содержания фосфора в других вирусах (как ДНК-, так и РНК-содержащих) при сравнительно низких содержаниях искомого элемента.

ЛИТЕРАТУРА

- Ochman H., Lawrence J., Groisman E. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*. 2000; 405(6784): 299–304. <https://doi.org/10.1038/35012500>
- Duplessis C.A., Biswas B. A review of topical phage therapy for chronically infected wounds and preparations for a randomized adaptive clinical trial evaluating topical phage therapy in chronically infected diabetic foot ulcers. *Antibiotics*. 2020; 9(7): 377. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070377>
- Sharma R., Pielstick B., Bell K., Nieman T., Stubbs O., Yeates E., et al. A Novel, Highly Related Jumbo Family of Bacteriophages That Were Isolated Against *Erwinia*. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 1533. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01533>
- Fokine A., Kostyuchenko V.A., Efimov A.V., Kurochkina L.P., Sykilinda N.N., Robben J., et al. A three-dimensional cryo-electron microscopy structure of the bacteriophage ϕ KZ head. *J. Mol. Biol.* 2005; 352(1): 117–24. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.018>
- Sokolova O.S., Shaburova O.V., Pechnikova E.V., Shaytan A.K., Krylov S.V., Kiselev N.A., et al. Genome packaging in EL and Lin68, two giant ϕ KZ-like bacteriophages of *P. aeruginosa*. *Virology*. 2014; 468–470: 472–8. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.09.002>
- Hertveldt K., Lavigne R., Pleteneva E., Sernova N., Kurochkina L., Korchevskii R., et al. Genome comparison of *Pseudomonas aeruginosa* large phages. *J. Mol. Biol.* 2005; 354(3): 536–45. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.08.075>
- Mesyanzhinov V.V., Robben J., Grymonprez B., Kostyuchenko V.A., Bourkaltseva M.V., Sykilinda N.N., et al. The genome of bacteriophage ϕ KZ of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* 2002; 317(1): 1–19. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5396>
- Thomas J.A., Rolando M.R., Carroll C.A., Shen P.S., Belnap D.M., Weintraub S.T., et al. Characterization of *Pseudomonas chlororaphis* myovirus 201 ϕ 2-1 via genomic sequencing, mass spectrometry, and electron microscopy. *Virology*. 2008; 376(2): 330–8. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.04.004>
- Krylov V.N., Smirnova T.A., Minenkova I.B., Plotnikova T.G., Zhazikov I.Z., Khrenova E.A. *Pseudomonas* bacteriophage contains an inner body in its capsid. *Can. J. Microbiol.* 1984; 30(6): 758–62. <https://doi.org/10.1139/m84-116>
- Wu W., Thomas J., Naiqian C., Black L., Steven A.C. Bubblegrams reveal the inner body of bacteriophage ϕ KZ. *Science*. 2012; 335(6065): 182. <https://doi.org/10.1126/science.1214120>
- Yakunina M., Artamonova T., Borukhov S., Makarova K.S., Severinov K., Minakhin L. A non-canonical multisubunit RNA polymerase encoded by a giant bacteriophage. *Nucleic Acids res.* 2015; 43(21): 10411–20. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1095>
- Danilova Y.A., Belousova V.V., Moiseenko A.V., Vishnyakov I.E., Yakunina M.V., Sokolova O.S. Maturation of Pseudo-Nucleus Compartment in *P. aeruginosa*, Infected with Giant ϕ KZ Phage. *Viruses*. 2020; 12(10): 1197. <https://doi.org/10.3390/v12101197>
- Matsko N., Klinov D., Manykin A., Demin V., Klimenko S. Atomic force microscopy analysis of bacteriophages ϕ KZ and T4. *J. Electron. Microsc. (Tokyo)*. 2001; 50(5): 417–22. <https://doi.org/10.1093/jmicro/50.5.417>
- Fontana J., Jurado K.A., Cheng N., Ly N.L., Fuchs J.R., Gorelick R.J., et al. Distribution and Redistribution of HIV-1 Nucleocapsid Protein in Immature, Mature, and Integrase-Inhibited Virions: a Role for Integrase in Maturation. *J. Virol.* 2015; 89(19): 9765–80. <https://doi.org/10.1128/JVI.01522-15>
- Wu W., Leavitt J.C., Cheng N., Gilcrease E.B., Motwani T., Teschke C.M., et al. Localization of the houdinisome (Ejection Proteins) inside the bacteriophage P22 virion by bubblegram imaging. *mBio*. 2016; 7(4): e01152–16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01152-16>
- Wu W., Newcomb W.W., Cheng N., Aksyuk A., Winkler D.C., Steven A.C. Internal Proteins of the Procapsid and Mature Capsids of Herpes Simplex Virus 1 Mapped by Bubblegram Imaging. *J. Virol.* 2016; 90(10): 5176–86. <https://doi.org/10.1128/JVI.03224-15>
- Shebanova A., Ismagulova T., Solovchenko A., Baulina O., Lobakova E., Ivanova A., et al. Versatility of the green microalga cell vacuole function as revealed by analytical transmission electron microscopy. *Protoplasma*. 2017; 254(3): 1323–40. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1024-5>
- Scotuzzi M., Kuipers J., Wensveen D.I., De Boer P., Hagen K.C.W., Hoogenboom J.P., et al. Multi-color electron microscopy by element-guided identification of cells, organelles and molecules. *Sci. Rep.* 2017; 7: 45970. <https://doi.org/10.1038/srep45970>
- Allard-Vannier E., Hervé-Aubert K., Kaaki K., Blondy T., Shebanova A., Shaitan K.V., et al. Folic acid-capped PEGylated magnetic nanoparticles enter cancer cells mostly via clathrin-dependent endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2017; 1861(6): 1578–86. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.11.045>
- Loiko N., Danilova Y., Moiseenko A., Kovalenko V., Tereshkina K., Tutukina M., et al. Morphological peculiarities of the DNA-protein complexes in starved *Escherichia coli* cells. *PLoS One*. 2020; 15(10): e0231562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231562>
- Bazett-Jones D.P., Ottensmeyer F.P. Phosphorus distribution in the nucleosome. *Science*. 1981; 211(4478): 169–70. <https://doi.org/10.1126/science.7444457>
- Ottensmeyer F.P., Andrew J.W. High-resolution microanalysis of biological specimens by electron energy loss spectroscopy and by electron spectroscopic imaging. *J. Ultrastruct. Res.* 1980; 72(3): 336–48. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(80\)90069-6](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(80)90069-6)
- Aronova M.A., Kim Y.C., Harmon R., Sousa A.A., Zhang G., Leapman R.D. Three-dimensional elemental mapping of phosphorus by quantitative electron spectroscopic tomography (QuEST). *J. Struct. Biol.* 2007; 160(1): 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.06.008>
- Nevsten P., Evilevitch A., Wallenberg R. Chemical mapping of DNA and counter-ion content inside phage by energy-filtered TEM. *J. Biol. Phys.* 2012; 38(2): 229–40. <https://doi.org/10.1007/s10867-011-9234-8>
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Печникова Е.В., Кирпичников М.П., Соколова О.С. Радиационные повреждения в криомикроскопии: всегда ли во вред? *Природа*. 2015; (3): 25–9.
- Mishyna M., Volokh O., Danilova Ya., Gerasimova N., Pechnikova E., Sokolova O.S. Effects of radiation damage in studies of protein-DNA complexes by cryo-EM. *Micron*. 2017; 96: 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2017.02.004>
- Petrov A.S., Harvey S.C. Packaging double-helical DNA into viral capsids: structures, forces, and energetics. *Biophys. J.* 2008; 95(2): 497–502. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.131797>
- Буркальцева М.В., Крылов В.Н., Плетенева Е.А., Шабурова О.В., Крылов С.В., Волкарт Г., и др. Феногенетическая характеристика группы гигантских ϕ KZ-подобных бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa*. *Генетика*. 2002; 38(11): 1470–9.
- Bagrov D.V., Glukhov G.S., Moiseenko A.V., Karlova M.G., Litvinov D.S., Zaitsev P.A., et al. Structural characterization of β -propiolactone inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) particles. *Microsc. Res. Tech.* 2021. <https://doi.org/10.1002/jemt.23931>

REFERENCES

- Ochman H., Lawrence J., Groisman E. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*. 2000; 405(6784): 299–304. <https://doi.org/10.1038/35012500>
- Sharma R., Pielstick B., Bell K., Nieman T., Stubbs O., Yeates E., et al. A Novel, Highly Related Jumbo Family of Bacteriophages That Were Isolated Against *Erwinia*. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 1533. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01533>
- Duplessis C.A., Biswas B. A review of topical phage therapy for chronically infected wounds and preparations for a randomized adaptive clinical trial evaluating topical phage therapy in chronically infected diabetic foot ulcers. *Antibiotics*. 2020; 9(7): 377. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9070377>
- Fokine A., Kostyuchenko V.A., Efimov A.V., Kurochkina L.P., Sykilinda N.N., Robben J., et al. A three-dimensional cryo-electron microscopy structure of the bacteriophage ϕ KZ head. *J. Mol. Biol.* 2005; 352(1): 117–24. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.07.018>
- Sokolova O.S., Shaburova O.V., Pechnikova E.V., Shaytan A.K., Krylov S.V., Kiselev N.A., et al. Genome packaging in EL and Lin68, two giant ϕ KZ-like bacteriophages of *P. aeruginosa*. *Virology*. 2014; 468–470: 472–8. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.09.002>
- Hertveldt K., Lavigne R., Pleteneva E., Sernova N., Kurochkina L., Korchevskii R., et al. Genome comparison of *Pseudomonas aeruginosa* large phages. *J. Mol. Biol.* 2005; 354(3): 536–45. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.08.075>
- Mesyazhnikov V.V., Robben J., Grymonprez B., Kostyuchenko V.A., Bourkaltseva M.V., Sykilinda N.N., et al. The genome of bacteriophage ϕ KZ of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Mol. Biol.* 2002; 317(1): 1–19. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5396>
- Thomas J.A., Rolando M.R., Carroll C.A., Shen P.S., Belnap D.M., Weintraub S.T., et al. Characterization of *Pseudomonas chlororaphis* myovirus 201 ϕ 2-1 via genomic sequencing, mass spectrometry, and electron microscopy. *Virology*. 2008; 376(2): 330–8. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.04.004>
- Krylov V.N., Smirnova T.A., Minenkova I.B., Plotnikova T.G., Zhazikov I.Z., Khrenova E.A. *Pseudomonas* bacteriophage contains an inner body in its capsid. *Can. J. Microbiol.* 1984; 30(6): 758–62. <https://doi.org/10.1139/m84-116>
- Wu W., Thomas J., Naiqian C., Black L., Steven A.C. Bubblegrams reveal the inner body of bacteriophage ϕ KZ. *Science*. 2012; 335(6065): 182. <https://doi.org/10.1126/science.1214120>
- Yakunina M., Artamonova T., Borukhov S., Makarova K.S., Severinov K., Minakhin L. A non-canonical multisubunit RNA polymerase encoded by a giant bacteriophage. *Nucleic Acids res.* 2015; 43(21): 10411–20. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1095>
- Danilova Y.A., Belousova V.V., Moiseenko A.V., Vishnyakov I.E., Yakunina M.V., Sokolova O.S. Maturation of Pseudo-Nucleus Compartment in *P. aeruginosa*, Infected with Giant ϕ KZ Phage. *Viruses*. 2020; 12(10): 1197. <https://doi.org/10.3390/v12101197>
- Matsko N., Klinov D., Manykin A., Demin V., Klimenko S. Atomic force microscopy analysis of bacteriophages ϕ KZ and T4. *J. Electron. Microsc. (Tokyo)*. 2001; 50(5): 417–22. <https://doi.org/10.1093/jmicro/50.5.417>
- Fontana J., Jurado K.A., Cheng N., Ly N.L., Fuchs J.R., Gorelick R.J., et al. Distribution and Redistribution of HIV-1 Nucleocapsid Protein in Immature, Mature, and Integrase-Inhibited Virions: a Role for Integrase in Maturation. *J. Virol.* 2015; 89(19): 9765–80. <https://doi.org/10.1128/JVI.01522-15>
- Wu W., Leavitt J.C., Cheng N., Gilcrease E.B., Motwani T., Teschke C.M., et al. Localization of the houdinisome (Ejection Proteins) inside the bacteriophage P22 virion by bubblegram imaging. *mBio*. 2016; 7(4): e01152–16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01152-16>
- Wu W., Newcomb W.W., Cheng N., Aksyuk A., Winkler D.C., Steven A.C. Internal Proteins of the Procapsid and Mature Capsids of Herpes Simplex Virus 1 Mapped by Bubblegram Imaging. *J. Virol.* 2016; 90(10): 5176–86. <https://doi.org/10.1128/JVI.03224-15>
- Shebanova A., Ismagulova T., Solovchenko A., Baulina O., Lobakova E., Ivanova A., et al. Versatility of the green microalga cell vacuole function as revealed by analytical transmission electron microscopy. *Protoplasma*. 2017; 254(3): 1323–40. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1024-5>
- Scotuzzi M., Kuipers J., Wensveen D.I., De Boer P., Hagen K.C.W., Hoogenboom J.P., et al. Multi-color electron microscopy by element-guided identification of cells, organelles and molecules. *Sci. Rep.* 2017; 7: 45970. <https://doi.org/10.1038/srep45970>
- Allard-Vannier E., Hervé-Aubert K., Kaaki K., Blondy T., Shebanova A., Shaitan K.V., et al. Folic acid-capped PEGylated magnetic nanoparticles enter cancer cells mostly via clathrin-dependent endocytosis. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2017; 1861(6): 1578–86. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.11.045>
- Loiko N., Danilova Y., Moiseenko A., Kovalenko V., Tereshkina K., Tutukina M., et al. Morphological peculiarities of the DNA-protein complexes in starved *Escherichia coli* cells. *PLoS One*. 2020; 15(10): e0231562. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231562>
- Bazett-Jones D.P., Ottensmeyer F.P. Phosphorus distribution in the nucleosome. *Science*. 1981; 211(4478): 169–70. <https://doi.org/10.1126/science.7444457>
- Ottensmeyer F.P., Andrew J.W. High-resolution microanalysis of biological specimens by electron energy loss spectroscopy and by electron spectroscopic imaging. *J. Ultrastruct. Res.* 1980; 72(3): 336–48. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(80\)90069-6](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(80)90069-6)
- Aronova M.A., Kim Y.C., Harmon R., Sousa A.A., Zhang G., Leapman R.D. Three-dimensional elemental mapping of phosphorus by quantitative electron spectroscopic tomography (QuEST). *J. Struct. Biol.* 2007; 160(1): 35–48. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2007.06.008>
- Nevsten P., Evilevitch A., Wallenberg R. Chemical mapping of DNA and counter-ion content inside phage by energy-filtered TEM. *J. Biol. Phys.* 2012; 38(2): 229–40. <https://doi.org/10.1007/s10867-011-9234-8>
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Pechnikova E.V., Kirpichnikov M.K., Sokolova O.S. Radiation damages in cryomicroscopy: are always harmful? [*Radiatsionnye povrezhdeniya v kriomikroskopii: vsegda li vo vred?*] *Priroda*. 2015; (3): 25–9. (in Russian)
- Mishyna M., Volokh O., Danilova Ya., Gerasimova N., Pechnikova E., Sokolova O.S. Effects of radiation damage in studies of protein-DNA complexes by cryo-EM. *Micron*. 2017; 96: 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2017.02.004>
- Petrov A.S., Harvey S.C. Packaging double-helical DNA into viral capsids: structures, forces, and energetics. *Biophys. J.* 2008; 95(2): 497–502. <https://doi.org/10.1529/biophysj.108.131797>
- Burkal'tseva M.V., Krylov V.N., Pleteneva E.A., Shaburova O.V., Krylov S.V., Volkart G., et al. Phenogenetic characterization of a group of giant ϕ KZ-like bacteriophages of *Pseudomonas aeruginosa*. *Russian Journal of Genetics*. 2002; 38(11): 1242–50.
- Bagrov D.V., Glukhov G.S., Moiseenko A.V., Karlova M.G., Litvinov D.S., Zaitsev P.A., et al. Structural characterization of β -propiolactone inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) particles. *Microsc. Res. Tech.* 2021. <https://doi.org/10.1002/jemt.23931>

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-63>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Особенности патологии дыхательной системы у сирийских хомяков (*Mesocricetus auratus*) при инфекции вирусом SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*)

Чепур С.В., Алексеева И.И., Владимирова О.О., Мясников В.А., Тюнин М.А., Ильинский Н.С., Никишин А.С., Шевченко В.А., Смирнова А.В.

ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, 195043, Санкт-Петербург, Россия

Введение. На сегодняшний день в связи с необходимостью проведения доклинических исследований препаратов, предназначенных для профилактики и лечения новой коронавирусной инфекции COVID-19, важной задачей представляется верификация гистологических изменений дыхательной системы на экспериментальных моделях у лабораторных животных, в частности у сирийских (золотистых) хомяков (*Mesocricetus auratus*).

Цель работы – исследование патологических изменений лёгких применительно к биологической модели инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*), у сирийских хомяков.

Материал и методы. Самцов сирийских хомяков массой 80–100 г заражали путём интраназального введения культуры с содержанием возбудителя 4×10^4 ТЦД₅₀/мл (ТЦД – тканевая цитопатическая доза). Эксперимент проводили на 3, 7 и 14 сут с регистрацией гравиметрических показателей. Содержание вируса в лёгких определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Гистологические препараты ткани правого лёгкого и трахеи окрашивали гематоксилином и эозином, а также по Маллори.

Результаты и обсуждение. У инфицированных SARS-CoV-2 животных через 3 сут после заражения определяли максимальные значения репликативной активности вируса в лёгочной ткани. Спустя 7 сут на фоне снижения количественного содержания инфекционного агента в тканях лёгкого выявляли патологически значимое увеличение гравиметрических показателей органа. В период 3–14 сут после заражения в гистологической картине лёгких наблюдали развитие воспалительного процесса, характеризовавшегося последовательной сменой инфильтративно-пролиферативных, отёчно-макрофагальных и фибробластических изменений. Установлено, что начальные изменения эпителия дыхательных путей могут протекать без паранекротического интерстициального воспаления, тогда как при формировании множественного поражения лёгочной паренхимы повреждения эпителия бронхиол и ацинарных ходов могут иметь вторичный характер. В качестве патоморфологического признака, характерного для инфекции SARS-CoV-2 у данного вида, отмечено появление эпителиоидных крупноклеточных форм метаплазированного эпителия, формирующих псевдоацинарные структуры.

Заключение. В результате исследования описаны особенности патологии дыхательной системы у сирийских хомяков на экспериментальной модели инфекции SARS-CoV-2. Полученные данные имеют практическое значение как референтные и могут быть использованы при проведении доклинических исследований по оценке эффективности вакцинных препаратов и лекарственных средств.

Ключевые слова: SARS-CoV-2; гистологические изменения; дыхательная система; лёгкие; инфильтрация; макрофаги; метаплазия альвеолоцитов

Для цитирования: Чепур С.В., Алексеева И.И., Владимирова О.О., Мясников В.А., Тюнин М.А., Ильинский Н.С., Никишин А.С., Шевченко В.А., Смирнова А.В. Особенности патологии дыхательной системы у сирийских хомяков (*Mesocricetus auratus*) при инфекции вирусом SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(6): 442–451. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-63>

Для корреспонденции: Никишин Александр Сергеевич, научный сотрудник, ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации («ГНИИИ ВМ» МО РФ), 195043, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: nikishin1664@gmail.com

Участие авторов: Чепур С.В. – концепция и дизайн исследования, написание текста статьи, редактирование; Мясников В.А. – концепция и дизайн исследования, написание текста статьи, редактирование; Алексеева И.И. – сбор и обработка материала, написание текста; Владимирова О.О. – сбор и обработка материала, написание текста статьи; Тюнин М.А. – концепция и дизайн исследования, статистическая обработка, написание текста статьи, редактирование; Ильинский Н.С. – сбор и обработка материала, написание текста статьи; Никишин А.С. – сбор и обработка материала, написание текста статьи, редактирование; Шевченко В.А. – сбор и обработка материала; Смирнова А.В. – сбор и обработка материала.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю признательность Т.Н. Лавриковой за подготовку уникальных гистологических препаратов, и П.С. Баевой, принимавшей непосредственное участие в создании биологических моделей.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследования на животных выполнены по программе, одобренной Комиссией по этике и биоэтике ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ. Животных содержали в надлежащих условиях вивария (разрешение Главного государственного ветеринарного инспектора Санкт-Петербурга № 78-1102/19, сертификат ISO 9001:2015 № ST.RU.0001.M0017187, сертификат соответствия стандарту GLP № GLP-0727-1020). Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus author guidelines for animal use» (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Комитетом по этике биомедицинских исследований ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ (протокол № 21 от 23.11.2020).

Поступила 01.10.2021

Принята в печать 14.11.2021

Опубликована 30.12.2021

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-63>

Specific features of the pathology of the respiratory system in SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) infected Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*)

Sergey V. Chepur, Irina I. Alekseeva, Ol'ga O. Vladimirova, Vadim A. Myasnikov, Mikhail A. Tyunin, Nikita S. Ilinskii, Aleksandr S. Nikishin, Valentin A. Shevchenko, Anna V. Smirnova

FSBI «State Research Testing Institute of Military Medicine» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, 195043, Saint Petersburg, Russia

Introduction. Verification of histological changes in respiratory system using Syrian (golden) hamsters (*Mesocricetus auratus*) as experimental model is an important task for preclinical studies of drugs intended for prevention and treatment of the novel coronavirus infection COVID-19.

The **aim** of this work was to study pathological changes of pulmonary tissue in SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) experimental infection in Syrian hamsters.

Material and methods. Male Syrian hamsters weighting 80–100 g were infected by intranasal administration of culture SARS-CoV-2 at dose 4×10^4 TCID₅₀/ml (TCID is tissue culture infectious dose). Animals were euthanatized on 3, 7 and 14 days after infection, with gravimetric registration. The viral load in lungs was measured using the polymerase chain reaction (PCR). Right lung and trachea tissues were stained with hematoxylin-eosin and according to Mallory.

Results and discussion. The highest viral replicative activity in lungs was determined 3 days after the infection. After 7 days, on a background of the decrease of the viral load in lungs, a pathologically significant increase of the organ's gravimetric parameters was observed. Within 3 to 14 days post-infection, the lung histologic pattern had been showing the development of inflammation with a succession of infiltrative-proliferative, edematous-macrophagal and fibroblastic changes. It was found that initial changes in respiratory epithelium can proceed without paranecrotic interstitial inflammation, while in the formation of multiple lung parenchyma lesions, damage to the epithelium of bronchioles and acinar ducts can be secondary. The appearance of epithelioid large-cell metaplastic epithelium, forming pseudoacinar structures, was noted as a pathomorphological feature specific to SARS-CoV-2 infection in Syrian hamsters.

Conclusion. As a result of the study, the specific features of the pathology of the respiratory system in SARS-CoV-2 infected Syrian hamsters were described. These findings are of practical importance as reference data that can be used for preclinical studies to assess the effectiveness of vaccines and potential drugs.

Key words: SARS-CoV-2; histological changes; respiratory system; lungs; infiltration macrophages; alveolocyte metaplasia

For citation: Chepur S.V., Alekseeva I.I., Vladimirova O.O., Myasnikov V.A., Tyunin M.A., Ilinskii N.S., Nikishin A.S., Shevchenko V.A., Smirnova A.V. Specific features of the pathology of the respiratory system in SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) infected Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(6): 442-451 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-63>

For correspondence: Aleksandr S. Nikishin, Researcher, FSBI «State Research Testing Institute of Military Medicine» of the Ministry of Defense of the Russian Federation, 195043, Saint Petersburg, Russia. E-mail: nikishin1664@gmail.com

Information about the authors:Chepur S.V., <https://orcid.org/0000-0002-5324-512X>Aleksseeva I.I., <https://orcid.org/0000-0002-0924-9158>Vladimirova O.O., <https://orcid.org/0000-0002-8703-6799>Myasnikov V.A., <https://orcid.org/0000-0001-7232-4678>Tyunin M.A., <https://orcid.org/0000-0002-6974-5583>Ilinskii N.S., <https://orcid.org/0000-0001-7406-753X>Nikishin A.S., <https://orcid.org/0000-0003-1372-369X>Shevchenko V.A., <https://orcid.org/0000-0002-6984-2914>Smirnova A.V., <https://orcid.org/0000-0003-0483-5032>

Contribution: Chepur S.V. – research conception and design of the study, writing of the text, editing of the article; Myasnikov V.A. – research conception and design of the study, writing of the text, editing of the article; Aleksseeva I.I. – collecting and processing of the results; Vladimirova O.O. – collecting and processing of the results; Tyunin M.A. – research conception and design of the study, statistical processing of the results, writing of the text, editing of the article; Ilinskii N.S. – collecting and processing of the results, writing of the text, editing of the article; Nikishin A.S. – collecting and processing of the results, writing of the text, editing of the article; Shevchenko V.A. – collecting and processing of the results, writing of the text, editing of the article; Smirnova A.V. – collecting and processing of the results.

Funding. The research was funded by the State budget.

Acknowledgments. The authors express their gratitude to T.N. Lavrikova for preparing unique histological specimens, and to P.S. Baeva (Innovative Pharmaceutical Company «Silver Pharm», LLC, Saint Petersburg) for taking part in biological model creation.

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

Ethics approval. Studies on animals were performed according to the program approved by the Ethics and Bioethics Commission of the FSBI «State Research Testing Institute of Military Medicine» of the Ministry of Defense of the Russian Federation. Animals were kept in proper vivarium conditions (permission of the St. Petersburg Chief State Veterinary Inspector No. 78-1102/19, ISO 9001:2015 certificate No. ST.RU.0001.M0017187, GLP compliance certificate No. GLP-0727-1020). Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus author guidelines for animal use» (IAVES 23 July 2010). The research protocol was approved the Ethics Committee of Biomedical Research of the «State Research Testing Institute of Military Medicine» of the Ministry of Defense of the Russian Federation (Protocol No. 21 dated 23.11.2020).

Received 01 October 2021

Accepted 14 November 2021

Published 30 December 2021

Введение

Вирус SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) по аналогии с родственными РНК-вирусами и основному механизму заражения условно относят к респираторным [1]. Именно поражение дыхательной системы формирует основные клинические проявления заболевания, определяет его тяжесть и прогноз. Хотя экспрессию вируса прослеживали в различных органах, вклад их дисфункции в патогенез инфекции COVID-19 требует дальнейшего изучения [2]. Вместе с тем механизм поражения лёгких и дыхательных путей SARS-CoV-2 до настоящего времени установлен не в полной мере, что определяет актуальность гистологических исследований патологических изменений дыхательной системы на экспериментальных моделях лабораторных животных. Подобные исследования позволяют проследить особенности поражения органов дыхания в динамике [3, 4].

Интерстициальное воспаление, диффузное альвеолярное поражение и некротический бронхит/бронхиолит считаются общими гистопатологическими признаками повреждения лёгких при респираторных вирусных инфекциях, вызываемых коронавирусами SARS-CoV-2, MERS-CoV (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Merbecovirus*) и SARS-CoV (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) [5]. Изменения лёгочной ткани при

COVID-19 описываются в виде диффузного альвеолярного повреждения с интерстициальным отёком, капиллярным застоем и лимфоцитарной инфильтрацией межальвеолярных перегородок, вызывающими гипоксию, полиорганную недостаточность и смерть. Даже при бессимптомном течении вирусного процесса во время лобэктомий по поводу сопутствующей онкопатологии органа выявляются отёк ткани, наличие альвеолярного белкового экссудата и очаговая реактивная гиперплазия пневмоцитов с воспалительной клеточной инфильтрацией и многоядерными гигантскими клетками в межальвеолярных перегородках [6].

В клинической практике выделяют 4 этапа изменений лёгких при COVID-19 по данным компьютерной томографии (КТ): ранний, период прогрессии изменений, тяжёлый и диссипативный [7]. Признаками инфекции считаются двусторонние полисегментарные периферические изменения по типу «матового стекла», визуализируемые по данным КТ в виде снижения прозрачности лёгочной паренхимы при сохранении видимости стенок сосудов и бронхов в данном участке, а также консолидированные затемнения в лёгких. В качестве основного морфологического субстрата таких проявлений рассматривается интерстициальное воспаление с частичным или полным заполнением альвеолярного пространства патологическим содержимым (клеточным детритом, трансудатом, экссудатом и др.), формированием ателектазов. КТ-сканирование в клинике в первые 4 сут

заболевания показало наличие описанных рентгенологических симптомов в 75,0% случаев, однако при расширенном амбулаторном обследовании в раннем периоде нормальная картина КТ встречалась в 56,0 % наблюдений [8]. Исследование на этапе прогрессии инфекционного процесса (5–8 сут) выявляло усугубление изменений (53,0% случаев) по типу «булыжной мостовой» (симптом «лоскутного одеяла») [7]. Поражение лёгких достигало пика примерно через 10 сут после появления начальных признаков (3 этап – 9–13 сут), когда при ухудшении клинического состояния в 91,0% случаев определялись увеличение площади поражения полей лёгких, линейные помутнения, консолидации по типу «булыжной мостовой» и «обратного ореола (гало)» (симптом «атолла») [8]. На 4 этапе начиная с 14 сут в 75,0% случаев имело место постепенное разрешение повреждений [9]. Двустороннее поражение лёгких наблюдалось на раннем этапе у 28,0% пациентов, на втором этапе у 76,0% и на третьем – у 88,0% пациентов [8]. У беременных прослеживались более тяжёлые поражения [7]. Преобладающей особенностью данных КТ при обследовании бессимптомных пациентов было наличие непрозрачности по типу «матового стекла» (94,8%) с периферической локализацией (75,9%), односторонним расположением изменений (58,6%) преимущественно в одной или двух долях (65,5%) [11].

Значительную роль в формировании альвеолярного повреждения могут играть внутрисосудистые микротромбы и тромбозмболии [12]. Вирионы обнаружены в эндотелиоцитах [13], однако персистенция вируса в эндотелии до настоящего времени рассматривается как экзквизитное явление [14]. Иммуногистохимически экспрессия белков SARS-CoV-2 выявляется в эпителиальных клетках, включая слушечные клетки в альвеолярном пространстве, тогда как в кровеносных сосудах или интерстиции продукция вирусного белка выражена минимально [14]. В этой связи первичной патологией лёгочной ткани при COVID-19 всё же считается диффузное альвеолярное повреждение с локализацией вируса в пневмоцитах и эпителии трахеи, тогда как микротромбы наблюдаются в единичных полях зрения, а явления эндотелиита не прослеживаются. Вместе с тем формирующаяся многофакторная эндотелиальная дисфункция приводит к сужению сосудов с последующей ишемией органов, развитию воспаления с отёком тканей и гиперкоагуляцией [15]. Расширение лёгочных сосудов по данным КТ отмечается в местах образования новых лёгочных инфильтратов [16].

Преимущественным субстратом поражения в лёгких умерших от SARS-CoV-2 является альвеолярное экссудативное и интерстициальное воспаление. В альвеолах преобладают макрофаги и моноциты, тогда как лимфоциты (в основном CD4+ Т-клетки), эозинофилы и нейтрофилы встречаются в меньшем количестве. Прослеживаются многоядерные гигантские клетки. В лёгочной паренхиме выявляются очаговые кровоизлияния и организация экссудата в альвеолярных полостях; в мелких сосудах могут

присутствовать единичные гиалиновые тромбы. При массивном выпоте имеют место образование фибриновых нитей в интерстиции межалвеолярных перегородок с последующим фиброзом, а также появление гиалиновых мембран в просвете альвеол. Выпадение фибрина наиболее выражено при остром респираторном дистресс-синдроме (ОРДС) [17]. Выявляются также пролиферация альвеолярного эпителия с преимущественной гиперплазией клеток II типа и очаговая десквамация эпителия в альвеолах и мелких бронхах [14]. В межалвеолярных перегородках обнаруживаются лимфоцитарно-моноцитарные инфильтраты, конгломераты нейтрофильных гранулоцитов и тромбоцитов. В случаях поражения средней степени тяжести присутствуют функционально истощённые тромбоциты и гипореактивные нейтрофилы, тогда как при тяжёлом течении COVID-19 отмечается чрезмерная активация этих клеток по сравнению с таковой в биоматериалах, полученных от здоровых людей из контрольной группы или больных пневмонией, не связанной с COVID-19 [18].

У части пациентов формируется плевральный выпот. Лимфаденопатия средостения оказывается редкой находкой [16]. Вследствие ателектазов могут образовываться препятствия воздухообмену с образованием гигантских эмфизематозных булл, пневмоторакса и пневмомедиастинума [19].

В настоящее время активно ведутся работы по поиску эффективных средств профилактики и терапии COVID-19 с использованием различных видов экспериментальных животных в качестве лабораторных моделей. Среди них особое место занимает биологическая модель новой коронавирусной инфекции у сирийских (золотистых) хомячков (*Mesocricetus auratus*), позволяющая с высокой надёжностью воспроизводить течение инфекционного процесса различной степени тяжести. Основными проявлениями COVID-19 у данного вида являются появление одышки, потеря массы тела, поражение различных отделов респираторного тракта [20]. Так, по данным КТ-сканирования лёгких сирийских хомячков, выполненного в динамике после заражения вирусом SARS-CoV-2, выявлены патологические признаки, соответствующие таковым у человека. К ним относят полисегментарные изменения по типу «матового стекла» с преимущественно центральной перибронхиальной локализацией, определяемые на 2–4 сут заболевания; формирование периферических очагов консолидации лёгочной ткани к 7–8 сут наблюдения; восстановление воздушности с 10 сут болезни [21]. В свою очередь, результаты гистологического исследования поражений лёгких вирусом SARS-CoV-2 демонстрируют развитие интерстициальной пневмонии и альвеолярного отёка, характеризующихся миграцией лейкоцитов и макрофагов в очаг патологического процесса. В период реконвалесценции отмечаются гиперплазия пневмоцитов II типа, расширение межалвеолярных перегородок за счёт фиброза различной степени выраженности [20].

Сведения о поражении дыхательной системы при

COVID-19 представляют особую важность в ходе проведения доклинических исследований новых лекарственных препаратов для профилактики и лечения этого заболевания. С учётом этого целью настоящей работы стало изучение патологических изменений в нижних дыхательных путях и лёгких применительно к биологической модели инфекции вирусом SARS-CoV-2 у сирийских хомяков.

Материал и методы

Экспериментальное исследование выполнено на 240 самцах сирийских хомяков массой 80–100 г, полученных из питомника АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (Санкт-Петербург). Животные содержались в стандартных условиях вивария. Культура вируса SARS-CoV-2 выделена в лабораториях ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ из ПЦР-позитивного материала, полученного от больных COVID-19, и накоплена на культуре клеток почки африканской зелёной мартышки (*Chlorocebus sabaeus*) Vero B (Биолот, Россия); на этой же клеточной линии определяли среднюю тканевую цитопатическую дозу вируса (ТЦД₅₀/мл) по методу Рида и Менча. Заражение предварительно наркотизированных (раствор «Золетил 100» в дозе 40 мг/кг внутривенно) сирийских хомяков осуществляли однократным интраназальным введением 26 мкл культуры вируса, содержащей SARS-CoV-2 в количестве 4×10^4 ТЦД₅₀/мл. Эвтаназию животных проводили передозировкой общего анестетика (растворы «Ксила» 20 мг/мл и «Золетил 100» 50 мг/мл (соотношение 1 : 1) в объёме 1 мл на 1 кг массы тела внутримышечно) с последующим обескровливанием путём пересечения нижней полой вены на 3, 7 и 14 сут после индукции заболевания. Определение динамики формирования отёка лёгких проводили с использованием гравиметрических методов. Для этого рассчитывали коэффициент относительной массы лёгкого и степень влагонасыщения органа посредством формул:

$$\text{коэффициент относительной массы лёгкого} = \frac{\text{масса лёгкого, г}}{\text{масса тела животного, г}} \times 100 (\%) \quad (1);$$

$$\text{степень влагонасыщения ткани лёгкого} = \frac{\text{масса высушенного лёгкого, г}}{\text{масса влажного лёгкого, г}} \times 100 (\%) \quad (2).$$

Высушивание левого лёгкого осуществляли в сушильном шкафу при температуре 60 °С до стабилизации значения его массы. Образцы тканей трахеи и правого лёгкого фиксировали 10% нейтральным формалином по Лилли и жидкостью Карнуа (6 частей абсолютного этилового спирта (C₂H₅OH), 3 части хлороформа (CHCl₃) и 1 часть ледяной уксусной кислоты (CH₃COOH)). После стандартной проводки материал помещали в парафин и готовили срезы толщиной 3–5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином, а также по Маллори. Регистрацию изменений структуры тканей осуществляли на цифровом фотомикроскопе Leica DM 2500 (Leica, Германия) при увеличении объектива $\times 20$ –100. После извлечения тканей левого лёгкого гомогенизировали. Из полученного го-

могената выделяли вирусную РНК с использованием набора RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen, Германия) для проведения обратной транскрипции и определения вирусной нагрузки методом количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Статистический анализ экспериментальных данных проводили при помощи пакетов программ Statistica v.10 в операционной среде Windows 7. Результаты подвергали стандартной статистической обработке, алгоритм которой определяли исходя из условий нормальности распределения. Вывод о статистической значимости различий делали при $p < 0,05$. Сравнение проводили с характеристиками животных группы виварного контроля с учётом динамики изменений за период проведения эксперимента.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines For Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Комитетом по этике биомедицинских исследований организации (Протокол № 21 от 23.11.2020).

Результаты и обсуждение

Изменения относительной массы лёгких хомяков и степени их влагонасыщения в соотношении с репликативной активностью вируса представлены на **рис. 1**.

Наиболее показательна динамика влагонасыщения лёгкого со сменой фаз от 3 к 7 сут. Снижение показателя характеризует уплотнение ткани органа при нарастании инфильтрации, возникновении ателектазов и изменении кровенаполнения; возрастание данного показателя отражает формирование интерстициального и альвеолярного отёка.

Гистологические исследования образцов ткани органа начиная с 3 сут после заражения животных выявили поражение воздухоносных и респираторных отделов. С этого срока отмечали резкое снижение воздушности лёгочной паренхимы за счёт формирования множественных микроателектазов, наличия умеренно выраженной лимфогистиоцитарной инфильтрации, интерстициального и альвеолярного отёка. В крупных и средних бронхах на всех сроках исследования прослеживали сохранение непрерывности клеточного слоя цилиндрического эпителия на фоне уменьшения количества секрета в бокаловидных клетках, потери многорядности эпителиального пласта, десквамации апикальных частей эпителиоцитов и эозинофилии их поражённой цитоплазмы (**рис. 2**). Десквамация апикальных частей клеток в мелких бронхах приводила к окклюзии просветов части бронхов наряду со значительным количеством слизистого отделяемого, клеток инфильтрата и диапедезных эритроцитов. Капиллярная сеть паренхимы была выражено полнокровной, артериальные сосуды большей частью спазмированы, в венозных наблюдались агрегация эритроцитов и гемолиз.

Далее, на 7 сут на фоне сохранения относительной

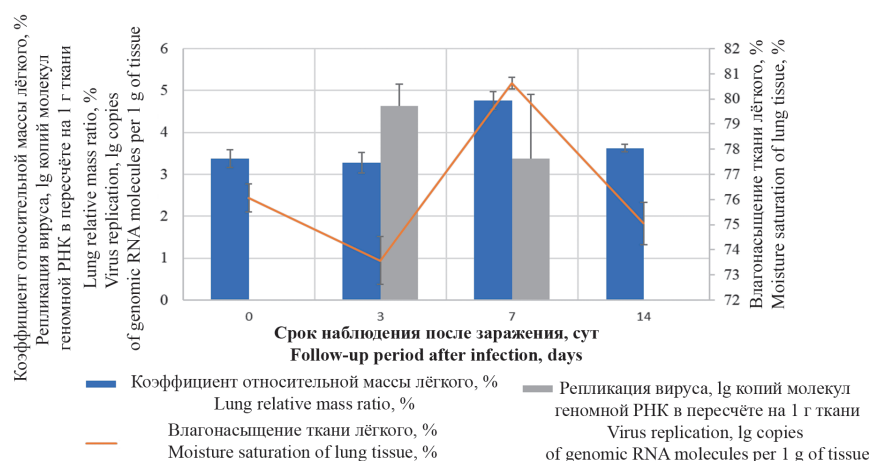


Рис. 1. Количественные характеристики патологического процесса в лёгких: изменение относительной массы и степени влагонасыщения (значения вынесены на дополнительную ось ординат). Репликация вируса в лёгочной ткани представлена в виде значения десятичного логарифма (lg) копий молекул геномной РНК в пересчёте на 1 г ткани.

Fig. 1. Quantitative characteristics of the pathological process in lungs: changes in lung relative mass and degree of its moisture saturation (the values are shown in the additional ordinate axis). Virus replication in the lung tissue is presented as the decimal logarithm (lg) genomic RNA copies per 1 g of the tissue.

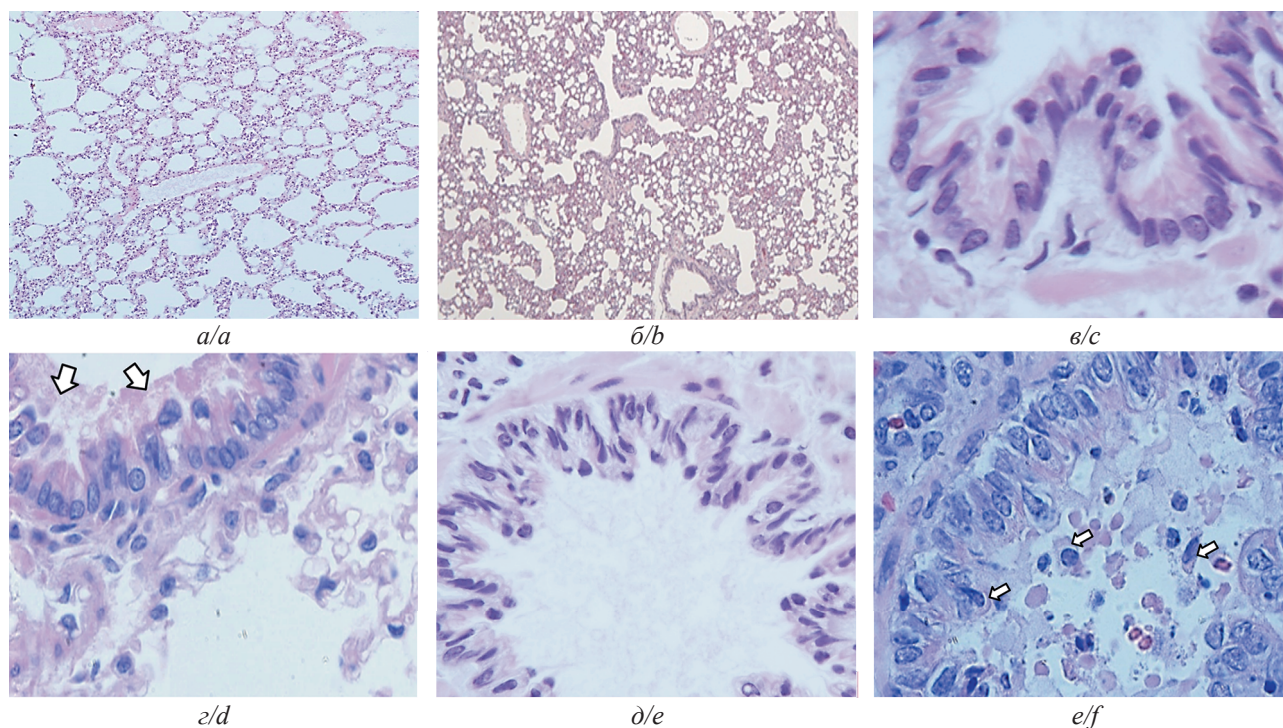


Рис. 2. Структуры респираторного тракта сирийских хомяков в норме и на 3 сут после заражения SARS-CoV-2 в дозе 4×10^4 ТЦД₅₀/мл (26 мкл/особь интраназально). Равномерно воздушная паренхима лёгких животных интактной группы, свободные просветы воздухоносных путей (а); снижение воздушности лёгких за счёт выраженного утолщения межальвеолярных перегородок (б). Слизистая оболочка мелких бронхов интактных хомяков покрыта однорядным призматическим эпителием (в), рядность которого у инфицированных животных нарушается за счёт отёка и образования клеточного инфильтрата (г), апикальные полюса клеток слущиваются (показано белыми стрелками). Свободные просветы мелких бронхов интактных животных (д) у инфицированных особей заполняются клеточным детритом вследствие десквамации эпителия, диапедеза эритроцитов и нейтрофильных гранулоцитов (е) с выходом макрофагов в просвет бронхов (показано белыми стрелками). Микрофотографии, окраска гематоксилином и эозином, увеличение объектива $\times 10$ (а, б), $\times 40$ (д), $\times 100$ (в, г, е).

Fig. 2. Respiratory tract structures of the Syrian hamsters in health and on day 3 after SARS-CoV-2 infection at dose 4×10^4 TCID₅₀/ml (26 μ l/individual intranasally). Evenly air lung parenchyma of intact animals, bright lumens of airways (a); lung airiness decrease from the marked interalveolar septum thickening (b). The small bronchi mucous membrane of intact hamsters is covered with a single-row cylindrical epithelium (c), whose lane in infected animals is disturbed due to edema and cellular infiltration (d), the apical cellular poles are desquamated (white arrows). Small bronchi's bright lumens of intact animals (e) are filled with cell debris from the epithelium desquamation, erythrocyte and neutrophilic granulocyte diapedesis (f), with the release of macrophages into the bronchi lumen (white arrows). Microphotographs, hematoxylin and eosin stain, objective lens magnification $\times 10$ (a, b), $\times 40$ (e), $\times 100$ (c, d, f).

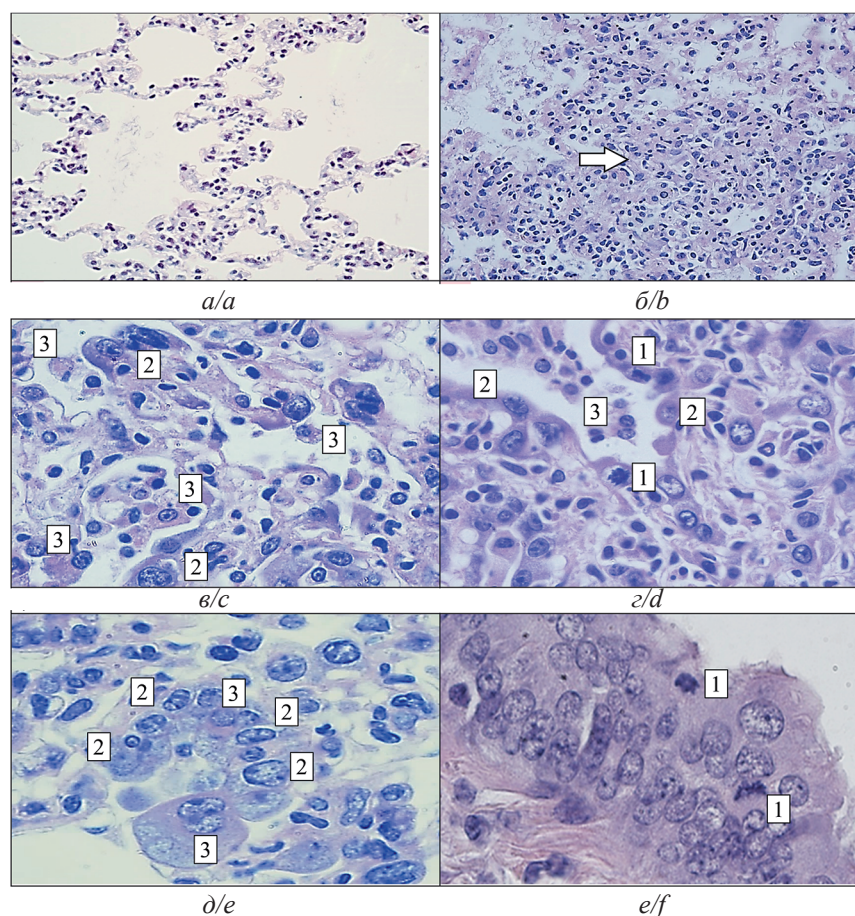


Рис. 3. Очаговые воспалительные изменения в лёгких сирийских хомяков на 7 сут после заражения SARS-CoV-2 в дозе 4×10^4 ТЦД₅₀/мл (26 мкл/особь интраназально). В отличие от лёгочной ткани интактных хомяков (а) у инфицированных животных выявлялись очаги инфильтративных изменений межальвеолярных перегородок (белая стрелка) с умеренным интраальвеолярным выпотом (б). Клеточный состав инфильтрата представлен лимфоцитарно-гистиоцитарным компонентом и сегментоядерными лейкоцитами (в). Регенерация слущенного альвеолярного эпителия осуществляется призматическими клетками терминальных бронхиол, в которых выявляли фигуры митозов (г). Крупноклеточные эпителиоидные формы и макрофаги различной степени зрелости формируют псевдоацинарные структуры (д). Очаговая гиперплазия эпителия выстилки крупного бронха с признаками пролиферации эпителиоцитов (е). Микрофотографии, окраска гематоксилином и эозином, увеличение объектива $\times 20$ (а, б), $\times 100$ (в–е).

1 – фигуры митозов, 2 – эпителиоидные формы, 3 – активированные макрофаги.

Fig. 3. Focal inflammatory changes in lungs of Syrian hamsters on day 7 after SARS-CoV-2 infection at dose 4×10^4 TCID₅₀/ml (26 μ l/individual intranasally). Compared to the intact hamsters' lung tissue (a), foci of infiltrative changes were detected in the interalveolar septa (white arrow), with a moderate intraalveolar effusion (b). The infiltrate cell compound is represented by the lymphocytic-histiocytic component and segmental leukocytes (c). The desquamated alveolar epithelium regeneration is implemented by prismatic cells of terminal bronchioles, where mitotic figures were detected (d). Large-cell epithelioid forms and macrophages of various maturity form pseudoacinar structures (e). Focal hyperplasia of the large bronchus' lining epithelium with signs of proliferation of epithelial cells (f). Microphotographs, hematoxylin and eosin stain, objective lens magnification $\times 20$ (a, b), $\times 100$ (c–f).

1, mitotic figures; 2, epithelioid forms; 3, activated macrophages.

воздушности части лёгочной ткани выявляли плотные очаги воспалительных изменений различного размера, большей частью привязанные к сосудисто-бронхиальным профилям мелкого калибра, по-видимому, эквивалентные рентгенологическим затемнениям по типу «матового стекла». На фоне выраженного к этому сроку экссудативного процесса (тотальному интерстициальному и фокальному альвеолярному отёку) наблюдали значительные инфильтративно-пролиферативные изменения с десквамацией альвеолярного эпителия. В очагах отмечали наличие многочисленных клеток преимущественно лимфо-гистиоцитарного инфильтрата с некоторым количе-

ством сегментоядерных лейкоцитов (рис. 3). В подобных участках не определялись структурные границы альвеол и терминальных бронхиол. Стиранию этих различий способствовала метаплазия эпителиоцитов с потерей их дифференцировки. Клетки приобретали атипичное строение эпителиоидных форм с резко увеличенными в размерах ядрами и ядрышками неправильных очертаний. Визуализировали многочисленные митозы указанных форм и клеток инфильтрата. Десквамация поражённого эпителия позволяла проследить в более воздушных участках перегородки, лишённые клеток альвеолярной выстилки. Нередко в паренхиме, примыкающей к бронхиолам, находили

множественные псевдоацинарные образования, выстланные плотным рядом метаплазированных клеток с гиперхромной цитоплазмой или клетками бронхиального эпителия. В альвеолах наблюдали макрофаги различной формы и степени зрелости, наполненные фагоцитированным детритом и эритроцитами.

Наконец, к 14 сут экспериментального инфекционного процесса у хомяков уменьшались размеры очагов уплотнения и выравнивалась воздушность паренхимы. Однако большая часть перегородок оставалась утолщённой как вследствие интерстициального отёка, так и за счёт содержания активных форм макрофагального ряда с большими объёмами цитоплазмы. В просветах альвеол также отмечали скопления макрофагов, элиминирующих экссудат. В отдельных

альвеолах по-прежнему визуализировали фрагменты экссудата, в том числе с диапедезными эритроцитами. Снижалась частота встречаемости оголённых альвеолярных перегородок. В бронхах наблюдали фокусы гиперплазии эпителия с конденсацией гетерохроматина на кариолемме крупных ядер нередко эллиптической или бобовидной формы; в отдельных участках около бронхиальной паренхимы увеличилось количество псевдоацинарных образований (рис. 4). К данному сроку крупные сосуды паренхимы лёгкого в большинстве своём имели нормальное кровенаполнение, тогда как сосуды гемомикроциркуляторного русла межальвеолярных перегородок поражённой ткани сохраняли признаки повышенного кровенаполнения и стаза. В утолщённых межальвеолярных перегородках

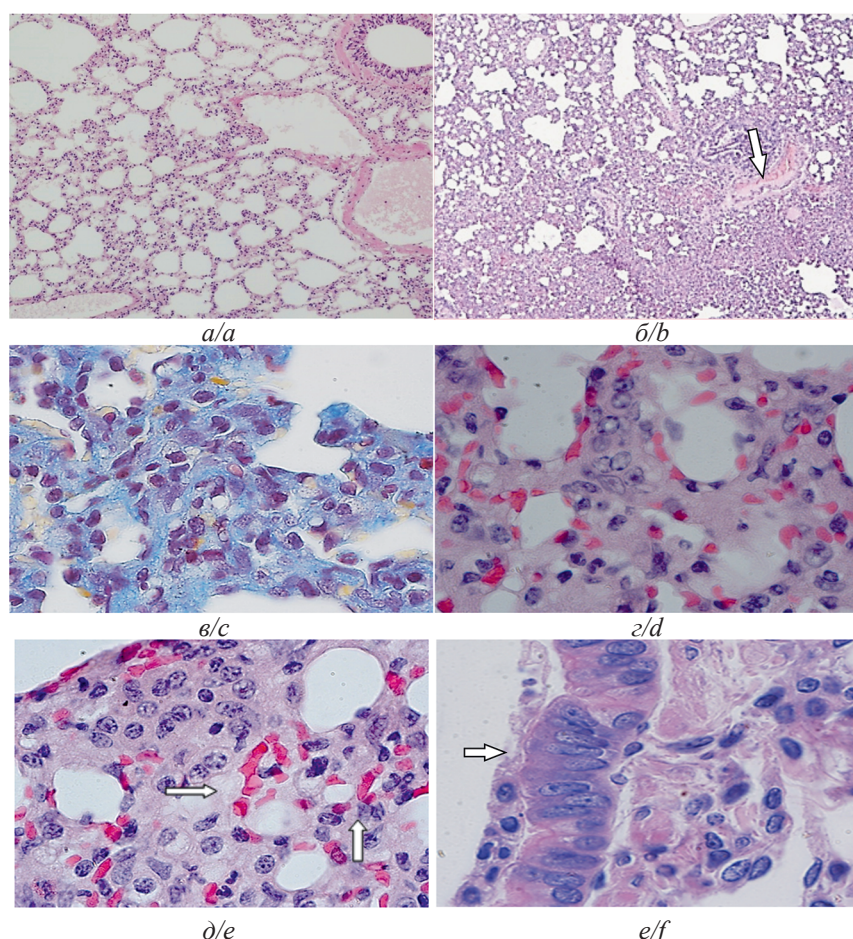


Рис. 4. Изменения структуры лёгких сирийских хомяков на 14 сут после заражения SARS-CoV-2 в дозе 4×10^4 ТЦД₅₀/мл (26 мкл/особь интраназально). По сравнению с группой интактных хомяков (а) у инфицированных выявляли воспалительную консолидацию ткани лёгкого (б) (белая стрелка). В очагах консолидации прослеживали активацию фибробластов и формирование коллагенового остова (в). В утолщённых межальвеолярных перегородках прослеживали различные варианты нарушений гемомикроциркуляции (г) с активацией светлоядерных фибробластоподобных клеток (белые стрелки) (д), определяющих формирование коллагенового остова и постинфекционную консолидацию паренхимы. На фоне сохранения интерстициального отёка прослеживали очаговую пролиферацию эпителиоцитов (белая стрелка) и активированные формы макрофагов, резорбирующих экссудат (е). Микрофотографии, окраска гематоксилином и эозином (а, б, г-е) и по Маллори (в), увеличение объектива $\times 20$ (а-б), $\times 100$ (в-е).

Fig. 4. Changes in lung structure of Syrian hamsters on day 14 after SARS-CoV-2 infection at dose 4×10^4 TCID₅₀/ml (26 μ l/individual intranasally). Compared to intact hamsters (a), an inflammatory pulmonary consolidation (b) was detected in the group of infected animals (white arrow). In the foci of consolidation, activation of fibroblasts and formation of a collagenous backbone were visible (c). In the thickened interalveolar septa, various hemomicrocirculatory disorders (d) were observed, with an activation of light-nucleated fibroblast-like cells (white arrows) (e), which determine the collagenous backbone formation and post-infectious parenchyma consolidation. On retention of interstitial edema, focal proliferation of epithelial cells (white arrow) and exudate-resorbing activated macrophages (f) were observed. Microphotographs, hematoxylin and eosin (a, b, d-f), and Mallory (c) stain, objective lens magnification $\times 20$ (a-b), $\times 100$ (c-f).

ках прослеживали активированные фибробластоподобные элементы; накопление коллагенового матрикса определяло постинфекционную консолидацию лёгочной паренхимы.

Заключение

Таким образом, в динамике инфекционного процесса COVID-19 на экспериментальной модели сирийских хомяков прослежены антигензависимые изменения альвеолярного и воздухоносного компонентов лёгочной паренхимы, характеризующиеся последовательной сменой инфильтративно-пролиферативных, отёчно-макрофагальных и фибробластических компонентов тканевой реакции.

Показано, что начальные изменения эпителия крупных дыхательных путей (в ряде случаев с выраженными повреждениями эпителиальной выстилки) могут протекать без паранекротического интерстициального воспаления, тогда как при формировании множественных очаговых повреждений паренхимы поражение эпителия бронхиол и ацинарных ходов с выходом макрофагов в просвет бронхиол и диапедезом эритроцитов в этих локусах может иметь вторичный характер, вовлекаясь в воспалительный процесс альвеол. В ацинарном компоненте лёгочной ткани наибольшие изменения отмечены в межальвеолярных септах, утолщение которых за счёт инфильтрата и отёка интерстиция ограничивало воздухообмен. Характерным для модели инфекции SARS-CoV-2 у сирийских хомяков следует признать образование эпителиоидных крупноклеточных форм метаплазированного эпителия, формирующих псевдоацинарные структуры.

Прослеженные морфологические изменения структуры лёгочной ткани определяют направления фармакологической терапии и позволяют соотнести проявления патологического процесса с данными рентгенологических исследований. По мере формирования интерстициального и альвеолярного отёка с активацией различных популяций фагоцитов количество мишеней для терапии глюкокортикостероидами снижается, тогда как регресс структурных повреждений можно предполагать на фоне применения ингибиторов рецепторов цитокинов. Положительное влияние могут оказывать также ингибиторы синтазы оксида азота (NO).

Полученные данные могут рассматриваться как референтные с возможностью практического использования в ходе проведения доклинических исследований по оценке эффективности вакцин и лекарственных средств, направленных на лечение новой коронавирусной инфекции COVID-19.

ЛИТЕРАТУРА

- Чепур С.В., Плужников Н.Н., Чубарь О.В., Бакулина Л.С., Литвиненко И.В., Макаров В.А., и др. Респираторные РНК-вирусы: как подготовиться к встрече с новыми пандемическими штаммами. *Успехи соврем. биологии*. 2020; 140(4): 359–77. <https://doi.org/10.31857/S0042132420040043>
- Bradley B.T., Maioli H., Johnston R., Chaudhry I., Fink S.L., Xu P.H., et al. Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections in Washington State: a case series. *Lancet*. 2020; 396(10247): 320–32. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31305-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31305-2)
- Чучалин А.Г. COVID-19 пневмония: лекция для студентов ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»; 2020. Available at: <https://youtu.be/hTVZSwa7X5c> (accessed October 14, 2021).
- Becker R.C. COVID-19-associated vasculitis and vasculopathy. *J. Thromb. Thrombolysis*. 2020; 50(3): 499–511. <https://doi.org/10.1007/s11239-020-02230-4>
- Calabrese F., Pezzuto F., Fortarezza F., Hofman P., Kern I., Panizo A., et al. Pulmonary pathology and COVID-19: lessons from autopsy. The experience of European Pulmonary Pathologists. *Virchows Arch*. 2020; 477(3): 359–72. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02886-6>
- Tian S., Hu W., Niu L., Liu H., Xu H., Xiao S.Y. Pulmonary pathology of early-phase 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia in two patients with lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* 2020; 15(5): 700–4. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.02.010>
- Li M., Lei P., Zeng B., Li Z., Yu P., Fan B., et al. Coronavirus Disease (COVID-19): Spectrum of CT findings and temporal progression of the disease. *Acad. Radiol.* 2020; 27(5): 603–8. <https://doi.org/10.1016/j.acra.2020.03.003>
- Bernheim A., Mei X., Huang M., Yang Y., Fayad Z.A., Zhang N., et al. Chest CT findings in Coronavirus Disease-19 (COVID-19): Relationship to duration of infection. *Radiology*. 2020; 295(3): 685–91. <https://doi.org/10.1148/radiol.2020200463>
- Pan F., Ye T., Sun P., Gui S., Liang B., Li L., et al. Time course of lung changes at chest CT during recovery from Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Radiology*. 2020; 295(3): 715–21. <https://doi.org/10.1148/radiol.2020200370>
- Liu H., Liu F., Li J., Zhang T., Wanga D., Lan W. Clinical and CT imaging features of the COVID-19 pneumonia: Focus on pregnant women and children. *J. Infect.* 2020; 80(5): e7–13. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.007>
- Meng H., Xiong R., He R., Weichen L., Bo H., Lin Z., et al. CT imaging and clinical course of asymptomatic cases with COVID-19 pneumonia at admission in Wuhan, China. *J. Infect.* 2020; 81(1): e33–9. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.004>
- Mohanty S.K., Satapathy A., Naidu M.M., Mukhopadhyay S., Sharma S., Barton L.M., et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease 19 (COVID-19) – anatomic pathology perspective on current knowledge. *Diagn. Pathol.* 2020; 15(1): 103. <https://doi.org/10.1186/s13000-020-01017-8>
- Iba T., Connors J.M., Levy J.H. The coagulopathy, endotheliopathy, and vasculitis of COVID-19. *Inflamm. Res.* 2020; 69(12): 1181–9. <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01401-6>
- Zhang H., Zhou P., Wei Y., Yue H., Wang Y., Hu M., et al. Histopathologic changes and SARS-CoV-2 immunostaining in the lung of a patient with COVID-19. *Ann. Intern. Med.* 2020; 172(9): 629–32. <https://doi.org/10.7326/M20-0533>
- Varga Z., Flammer A.J., Steiger P., Haberecker M., Andermatt R., Zinkernagel A.S., et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*. 2020; 395(10234): 1417–8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30937-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30937-5)
- Jain A. COVID-19 and lung pathology. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 2020; 63(2): 171–2. https://doi.org/10.4103/IJPM.IJPM_280_20
- Rizzo P., Viecelli Dalla Segà F., Fortini F., Marracino L., Rapezzi C., Ferrari R., et al. COVID-19 in the heart and the lungs: could we «Notch» the inflammatory storm? *Basic Res. Cardiol.* 2020; 115(3): 31. <https://doi.org/10.1007/s00395-020-0791-5>
- Nicolai L., Leunig A., Brambs S., Kaiser R., Weinberger T., Weigand M., et al. Immunothrombotic dysregulation in COVID-19 pneumonia is associated with respiratory failure and coagulopathy. *Circulation*. 2020; 142(12): 1176–89. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.048488>
- Sun R., Liu H., Wang X. Mediastinal emphysema, giant bulla, and pneumothorax developed during the course of COVID-19 pneumonia. *Korean J. Radiol.* 2020; 21(5): 541–4. <https://doi.org/10.3348/kjr.2020.0180>
- Rosenke K., Meade-White K., Letko M., Clancy C., Hansen F., Liu Y., et al. Defining the Syrian hamster as a highly susceptible pre-clinical model for SARS-CoV-2 infection. *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9(1): 2673–84. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1858177>
- Imai M., Iwatsuki-Horimoto K., Hatta M., Loeber S., Halfmann P.J., 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>

REFERENCES

1. Chepur S.V., Pluzhnikov N.N., Chubar' O.V., Bakulina L.S., Litvinenko I.V., Makarov V.A., et al. Respiratory RNA viruses: how to prepare for meeting with new pandemic strains [*Respiratornye RNK-virusy: kak podgotovit'sya k vstreche s novymi pandemicheskimi shtammami*]. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2020; 140(4): 359–77. <https://doi.org/10.31857/S0042132420040043> (in Russian)
2. Bradley B.T., Maioli H., Johnston R., Chaudhry I., Fink S.L., Xu P.H., et al. Histopathology and ultrastructural findings of fatal COVID-19 infections in Washington State: a case series. *Lancet*. 2020; 396(10247): 320–32. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31305-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31305-2)
3. Chuchalin A.G. COVID-19 pneumonia: lecture for FSAEI HE Pirogov Russian National Research Medical University students; 2020. Available at: <https://youtu.be/hTVZSwa7X5c> (in Russian) (accessed October 14, 2021).
4. Becker R.C. COVID-19-associated vasculitis and vasculopathy. *J. Thromb. Thrombolysis*. 2020; 50(3): 499–511. <https://doi.org/10.1007/s11239-020-02230-4>
5. Calabrese F., Pezzuto F., Fortarezza F., Hofman P., Kern I., Panizo A., et al. Pulmonary pathology and COVID-19: lessons from autopsy. The experience of European Pulmonary Pathologists. *Virchows Arch*. 2020; 477(3): 359–72. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02886-6>
6. Tian S., Hu W., Niu L., Liu H., Xu H., Xiao S.Y. Pulmonary pathology of early-phase 2019 novel coronavirus (COVID-19) pneumonia in two patients with lung cancer. *J. Thorac. Oncol*. 2020; 15(5): 700–4. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.02.010>
7. Li M., Lei P., Zeng B., Li Z., Yu P., Fan B., et al. Coronavirus Disease (COVID-19): Spectrum of CT findings and temporal progression of the disease. *Acad. Radiol*. 2020; 27(5): 603–8. <https://doi.org/10.1016/j.acra.2020.03.003>
8. Bernheim A., Mei X., Huang M., Yang Y., Fayad Z.A., Zhang N., et al. Chest CT findings in Coronavirus Disease-19 (COVID-19): Relationship to duration of infection. *Radiology*. 2020; 295(3): 685–91. <https://doi.org/10.1148/radiol.2020200463>
9. Pan F., Ye T., Sun P., Gui S., Liang B., Li L., et al. Time course of lung changes at chest CT during recovery from Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Radiology*. 2020; 295(3): 715–21. <https://doi.org/10.1148/radiol.2020200370>
10. Liu H., Liu F., Li J., Zhang T., Wanga D., Lan W. Clinical and CT imaging features of the COVID-19 pneumonia: Focus on pregnant women and children. *J. Infect*. 2020; 80(5): e7–13. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.007>
11. Meng H., Xiong R., He R., Weichen L., Bo H., Lin Z., et al. CT imaging and clinical course of asymptomatic cases with COVID-19 pneumonia at admission in Wuhan, China. *J. Infect*. 2020; 81(1): e33–9. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.004>
12. Mohanty S.K., Satapathy A., Naidu M.M., Mukhopadhyay S., Sharma S., Barton L.M., et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease 19 (COVID-19) – anatomic pathology perspective on current knowledge. *Diagn. Pathol*. 2020; 15(1): 103. <https://doi.org/10.1186/s13000-020-01017-8>
13. Iba T., Connors J.M., Levy J.H. The coagulopathy, endotheliopathy, and vasculitis of COVID-19. *Inflamm. Res*. 2020; 69(12): 1181–9. <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01401-6>
14. Zhang H., Zhou P., Wei Y., Yue H., Wang Y., Hu M., et al. Histopathologic changes and SARS-CoV-2 immunostaining in the lung of a patient with COVID-19. *Ann. Intern. Med*. 2020; 172(9): 629–32. <https://doi.org/10.7326/M20-0533>
15. Varga Z., Flammer A.J., Steiger P., Haberecker M., Andermatt R., Zinkernagel A.S., et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*. 2020; 395(10234): 1417–8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30937-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30937-5)
16. Jain A. COVID-19 and lung pathology. *Indian J. Pathol. Microbiol*. 2020; 63(2): 171–2. https://doi.org/10.4103/IJPM.IJPM_280_20
17. Rizzo P., Vieceli Dalla Sega F., Fortini F., Marracino L., Rapezzi C., Ferrari R., et al. COVID-19 in the heart and the lungs: could we «Notch» the inflammatory storm? *Basic Res. Cardiol*. 2020; 115(3): 31. <https://doi.org/10.1007/s00395-020-0791-5>
18. Nicolai L., Leunig A., Brambs S., Kaiser R., Weinberger T., Weigand M., et al. Immunothrombotic dysregulation in COVID-19 pneumonia is associated with respiratory failure and coagulopathy. *Circulation*. 2020; 142(12): 1176–89. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.120.048488>
19. Sun R., Liu H., Wang X. Mediastinal emphysema, giant bulla, and pneumothorax developed during the course of COVID-19 pneumonia. *Korean J. Radiol*. 2020; 21(5): 541–4. <https://doi.org/10.3348/kjr.2020.0180>
20. Rosenke K., Meade-White K., Letko M., Clancy C., Hansen F., Liu Y., et al. Defining the Syrian hamster as a highly susceptible preclinical model for SARS-CoV-2 infection. *Emerg. Microbes Infect*. 2020; 9(1): 2673–84. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1858177>
21. Imai M., Iwatsuki-Horimoto K., Hatta M., Loeber S., Halfmann P.J., 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>

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-83>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021



Анализ особенностей белка Tat вируса иммунодефицита человека 1 типа суб-субтипа A6 (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1*)

Кузнецова А.И.¹, Громов К.Б.^{1,2}, Киреев Д.Е.², Шлыкова А.В.², Лопатухин А.Э.²,
Казеннова Е.В.¹, Лебедев А.В.¹, Туманов А.С.¹, Ким К.В.¹, Бобкова М.Р.¹

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

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

Введение. Белок Tat вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) является главным фактором регуляции транскрипции генома ВИЧ и имеет ряд дополнительных внутриклеточных и внеклеточных активностей. Как и другим белкам ВИЧ, Tat свойственна изменчивость, при этом некоторые аминокислотные замены внутри белка Tat, включая субтип-специфичные, способны влиять на его функциональность. В РФ наиболее широко распространён ВИЧ 1 типа (ВИЧ-1) суб-субтипа A6. Исследования полиморфизма структурных областей генома A6 выявили многочисленные характерные особенности этого варианта, однако изучение области генома, кодирующей Tat, у ВИЧ-1 суб-субтипа A6 не проводилось.

Цели и задачи. Основной целью работы был анализ особенностей белка Tat у ВИЧ-1 суб-субтипа A6. Задачами исследования были выявление характеристических замен, сравнение полиморфизма белка Tat суб-субтипа A6 и наиболее близкого к нему суб-субтипа A1, а также определение статистически достоверных различий в функционально значимых доменах Tat суб-субтипа A6 и наиболее изученного субтипа B.

Материал и методы. Материалом для работы послужили нуклеотидные последовательности ВИЧ-1 суб-субтипов A6, A1, A2, A3, A4, субтипа B и референсная нуклеотидная последовательность, полученные из международной базы данных Los Alamos.

Результаты и обсуждение. Мутации Q54N и Q60H являются характеристическими заменами для A6. Продемонстрированы существенные достоверные различия в частоте естественных полиморфизмов белка Tat между суб-субтипами A6 и A1. В функционально значимом CPP-регионе выявлены мутации, достоверно различающиеся по частоте между суб-субтипом A6 и субтипом B ВИЧ-1 – R53K, Q54N, Q54P и R57G.

Заключение. Белок Tat варианта A6 ВИЧ-1 обладает особенностями, позволяющими достоверно отличить его от других генетических вариантов вируса. Выявленные в функционально значимом CPP-регионе мутации потенциально способны изменять активность данного белка. Полученные данные могут составить основу для разработки лекарственных и вакцинных препаратов.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1); суб-субтип A6; мутации; полиморфизм; белок Tat

Для цитирования: Кузнецова А.И., Громов К.Б., Киреев Д.Е., Шлыкова А.В., Лопатухин А.Э., Казеннова Е.В., Лебедев А.В., Туманов А.С., Ким К.В., Бобкова М.Р. Анализ особенностей белка Tat вируса иммунодефицита человека 1 типа суб-субтипа A6 (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1*). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(6): 452-463. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-83>

Для корреспонденции: Кузнецова Анна Игоревна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории вирусов лейкозов, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия. E-mail: a-myznikova@list.ru

Участие авторов: Кузнецова А.И. – методология исследования, анализ и интерпретация полученных данных, подготовка и редактирование текста, разработка окончательного варианта статьи; Громов К.Б. – литературный поиск, работа с базой данных Los Alamos; Киреев Д.Е. – анализ и интерпретация полученных данных, подготовка и редактирование текста; Шлыкова А.В. – статистический анализ, подготовка и редактирование текста; Лопатухин А.Э. – статистический анализ, подготовка и редактирование текста; Казеннова Е.В. – методология исследования, разработка окончательного варианта статьи; Лебедев А.В. – литературный поиск, анализ и интерпретация полученных данных; Туманов А.С. – работа с базой данных Los Alamos, статистическая обработка результатов; Ким К.В. – работа с базой данных Los Alamos, статистическая обработка результатов; Бобкова М.Р. – визуализация, разработка концепции исследования, разработка окончательного варианта статьи.

Финансирование. Исследование выполнено с привлечением средств гранта Министерства образования и науки Российской Федерации (Минобрнауки РФ) (уникальный идентификатор проекта RFMEFI61019X0020) в рамках осуществления международного проекта CARE «Горизонт 2020» (соглашение № 825673).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 11.10.2021

Принята в печать 24.11.2021

Опубликована 30.12.2021

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-83>

Analysis of Tat protein characteristics in human immunodeficiency virus type 1 sub-subtype A6 (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1*)

Anna I. Kuznetsova¹, Konstantin B. Gromov^{1,2}, Dmitry E. Kireev², Anastasia V. Shlykova², Alexey E. Lopatukhin², Elena V. Kazennova¹, Aleksey V. Lebedev¹, Alexander S. Tumanov¹, Kristina V. Kim¹, Marina R. Bobkova¹

¹D.I. Ivanovsky Institute of Virology 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;

²FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor), Moscow, 111123, Russia

Introduction. Tat protein is a major factor of HIV (human immunodeficiency virus) transcription regulation and has other activities. Tat is characterized by high variability, with some amino acid substitutions, including subtype-specific ones, being able to influence on its functionality. HIV type 1 (HIV-1) sub-subtype A6 is the most widespread in Russia. Previous studies of the polymorphisms in structural regions of the A6 variant have shown numerous characteristic features; however, Tat polymorphism in A6 has not been studied.

Goals and tasks. The main goal of the work was to analyze the characteristics of Tat protein in HIV-1 A6 variant, that is, to identify substitutions characteristic for A6 and A1 variants, as well as to compare the frequency of mutations in functionally significant domains in sub-subtype A6 and subtype B.

Material and methods. The nucleotide sequences of HIV-1 sub-subtypes A6, A1, A2, A3, A4, subtype B and the reference nucleotide sequence were obtained from the Los Alamos international database.

Results and discussion. Q54H and Q60H were identified as characteristic substitutions. Essential differences in natural polymorphisms between sub-subtypes A6 and A1 have been demonstrated. In the CPP-region, there were detected mutations (R53K, Q54H, Q54P, R57G) which were more common in sub-subtype A6 than in subtype B.

Conclusion. Tat protein of sub-subtype A6 have some characteristics that make it possible to reliably distinguish it from other HIV-1 variants. Mutations identified in the CPP region could potentially alter the activity of Tat. The data obtained could form the basis for the drugs and vaccines development.

Keywords: human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1); sub-subtype A6; mutations; polymorphism; Tat protein

For citation: Kuznetsova A.I., Gromov K.B., Kireev D.E., Shlykova A.V., Lopatukhin A.E., Kazennova E.V., Lebedev A.V., Tumanov A.S., Kim K.V., Bobkova M.R. Analysis of Tat protein characteristics in human immunodeficiency virus type 1 sub-subtype A6 (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1*). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(6): 452-463. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-83>

For correspondence: Anna I. Kuznetsova, Ph.D. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of T-lymphotropic viruses, D.I. Ivanovsky Institute of Virology 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. E-mail: a-myznikova@list.ru

Information about the authors:

Kuznetsova A.I., <https://orcid.org/0000-0001-5299-3081>

Gromov K.B., <https://orcid.org/0000-0002-9316-1975>

Kireev D.E., <https://orcid.org/0000-0002-7896-2379>

Shlykova A.V., <https://orcid.org/0000-0002-1390-8021>

Lopatukhin A.E., <https://orcid.org/0000-0002-2826-699X>

Kazennova E.V., <https://orcid.org/0000-0002-7912-4270>

Lebedev A.V., <https://orcid.org/0000-0001-6787-9345>

Tumanov A.S., <https://orcid.org/0000-0002-6221-5678>

Kim K.V., <https://orcid.org/0000-0002-4150-2280>

Bobkova M.R., <https://orcid.org/0000-0001-5481-8957>

Contribution: Kuznetsova A.I. – study methodology, data analysis and interpretation, text preparation and editing, article's final version development; Gromov K.B. – thematic literature search, working with Los Alamos database; Kireev D.E. – data analysis and interpretation, text preparation and editing; Shlykova A.V. – statistical analysis, text preparation and editing; Lopatukhin A.E. – statistical analysis, text preparation and editing; Kazennova E.V. – methodology of the study, article's final version development; Lebedev A.V. – thematic literature search, data analysis and interpretation; Tumanov A.S. – working with Los Alamos database, statistical analysis; Kim K.V. – working with Los Alamos database, statistical analysis; Bobkova M.R. – visualization, study conceptualization, article's final version development.

Funding. The authors acknowledge the contribution of CARE Consortium funded by the European Union's Horizon 2020 programme (grant agreement No 825673) and the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (unique project identifier RFMEFI61019X0020)

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

Received 11 October 2021

Accepted 24 November 2021

Published 30 December 2021

Введение

Несмотря на высокую эффективность современных средств антиретровирусной терапии (АРТ), необходимость поиска новых препаратов сохраняется. Одна из причин этого – феномен лекарственной устойчивости вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), ограничивающей возможность выбора схем АРТ, в особенности у пациентов с длительной историей лечения. Другая задача таких исследований – получение эффективных соединений с высоким уровнем безопасности и максимальным удобством приёма. Параллельно с разработкой новых фармакологических агентов ведутся работы по созданию профилактических и терапевтических вакцин против ВИЧ.

Одной из мишеней специфического воздействия будущих лечебных и вакцинных препаратов могут стать неструктурные белки вируса [1–3]. В настоящей работе продолжено обсуждение особенностей этих белков для суб-субтипа А6 ВИЧ 1 типа (ВИЧ-1), наиболее широко распространённого в России [4, 5]; объектом исследований в данном случае выступил белок Tat.

Внутриклеточные активности Tat

Белок Tat (trans-activator of transcription; транс-активатор транскрипции) вместе с другим белком – Rev – объединяется в группу регуляторных белков и играет ключевую роль в регуляции уровня транскрипции ВИЧ [6]. Этот протеин контролирует транскрипционный процесс посредством модуляции активности вирусного промотора и клеточной РНК-полимеразы II (RNAP II; RNA POL II) [7]. В зависимости от участия Tat транскрипцию провирусной ДНК разделяют на 2 этапа: Tat-зависимый и Tat-независимый.

Перед началом транскрипции провирусная ДНК ВИЧ освобождается от гистонов; происходит ремоделирование (перестройка) хроматина, что обеспечивает доступность этой молекулы (рис. 1). Первый этап – инициация с участием низкопроцессивной RNA POL II – начинается с присоединения факторов NF-κB и SP1, продолжаясь формированием так называемой TAR-петли (trans-activation response element; элемент ответа на реактивацию – Tat-связывающий элемент, имеющий структуру в виде короткой петли и расположенный на 5'-конце вирусного транскрипта), и заканчивается образованием коротких фрагментов РНК, кодирующих преимущественно регуляторные белки Tat и Rev. Далее короткие транскрипты перемещаются в цитоплазму, где они транслируются с образованием указанных белков [6–8]. Благодаря наличию сигнала ядерной локализации вновь образовавшийся Tat проникает в ядро [9], после чего начинается Tat-зависимый этап транскрипции нуклеиновой

кислоты ВИЧ [6–8]. Tat связывается с TAR-элементом и рекрутирует к участку инициации так называемый позитивный фактор элонгации транскрипции – комплекс Р-TEFb, состоящий из киназы CDK-9 и циклина T1. Эти события приводят к повышению процессивности RNA POL II с последующим формированием полноразмерных молекул РНК [3, 7, 8, 10]. В дополнение к описанному механизму белок Tat участвует в активации ацетилирования гистонов нуклеосом, делая таким образом ДНК доступной для RNA POL II и стимулируя этим инициацию транскрипции вирусной РНК [11, 12]. Отсутствие любой из описанных активностей Tat отменяет транскрипцию и поддерживает состояние латентности вируса в инфицированных клетках [13].

Дополнительная, не связанная с охарактеризованной выше активностью Tat заключается в его существенном влиянии на функцию митохондрий в заражённых клетках: изменяя транскрипцию митохондриальной ДНК (мтДНК) и вызывая повреждения её молекулы, данный белок возможно, опосредует митохондриальную дисфункцию, наблюдаемую у ВИЧ-инфицированных пациентов [14, 15].

Ещё один внутриклеточный эффект белка Tat состоит в способности ингибировать пролиферацию клеток посредством нарушения формирования митотического веретена [16]; это является вкладом в патогенез ВИЧ-инфекции и снижение числа CD4+ Т-клеток (рис. 2).

Внеклеточные эффекты Tat

В ходе внутриклеточного размножения ВИЧ белок Tat образуется в избытке, и хотя он не имеет необходимого для секреции сигнального пептида, этот протеин может использовать так называемые неклассические пути для выхода из клетки, в частности определяемые его сродством к фосфолипидам клеточной мембраны. Альтернативным вариантом является высвобождение Tat в момент разрушения инфицированных клеток [17]. Таким образом, белок попадает в межклеточное пространство и в последующем достигает практически всех тканей и клеток организма, взаимодействует с рецепторами на их поверхности и поглощается путём эндоцитоза [17, 18].

Tat не имеет выраженной вторичной структуры, будучи гибким и малоупорядоченным, однако это не препятствует его тесному связыванию с элементами внутриклеточного транскрипционного аппарата, а также со многими молекулами-«партнёрами» при нахождении в растворимой форме вне пределов клетки [1, 17].

Одной из наиболее изученных мишеней негативного воздействия белка Tat является центральная нерв-

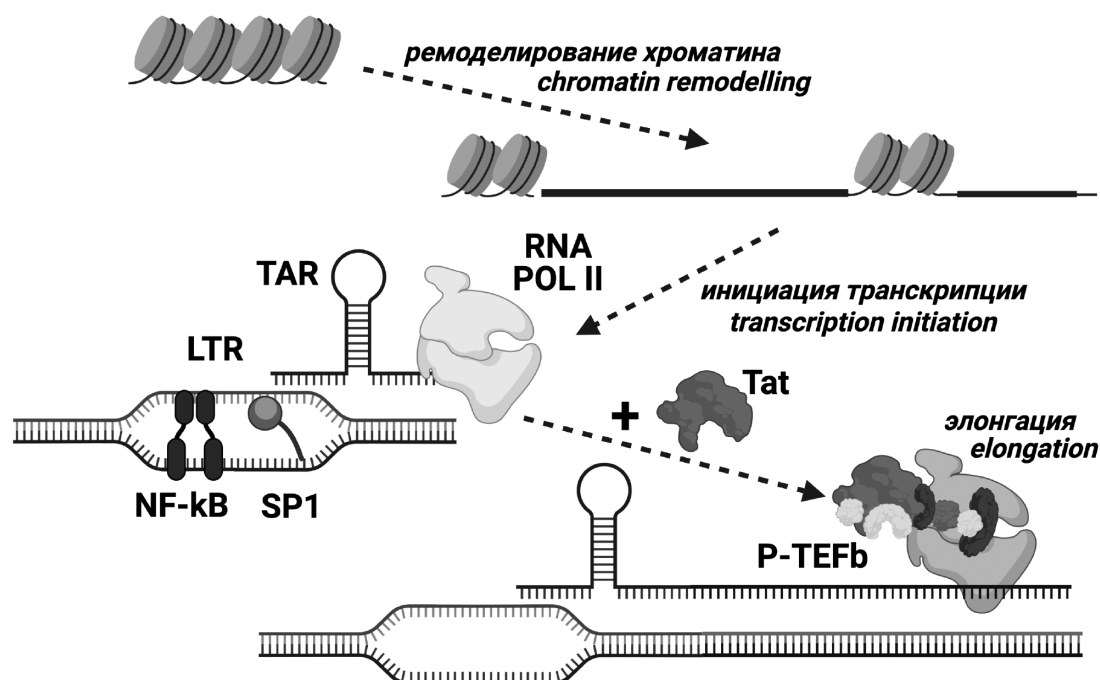


Рис. 1. Транскрипция провирусной ДНК вируса иммунодефицита человека. RNA Pol II – клеточная РНК-полимераза II, TAR – элемент ответа на трансактивацию; LTR – длинные концевые повторы; NF-κB и SP1 – ядерные факторы, регулирующие скорость инициации вирусной транскрипции; Tat – белок Tat; P-TEFb – позитивный фактор элонгации транскрипции. Иллюстрация создана с применением графической программы BioRender, <https://biorender.com/>.

Fig. 1. Transcription of proviral human immunodeficiency virus DNA. RNA Pol II, cellular RNA polymerase II; TAR, transactivation response element; LTR, long terminal repeats; NF-κB and SP1, nuclear factors that regulate the rate of viral transcription initiation; Tat, Tat protein; P-TEFb, positive transcription elongation factor. The illustration was created using the graphics program BioRender, <https://biorender.com/>.

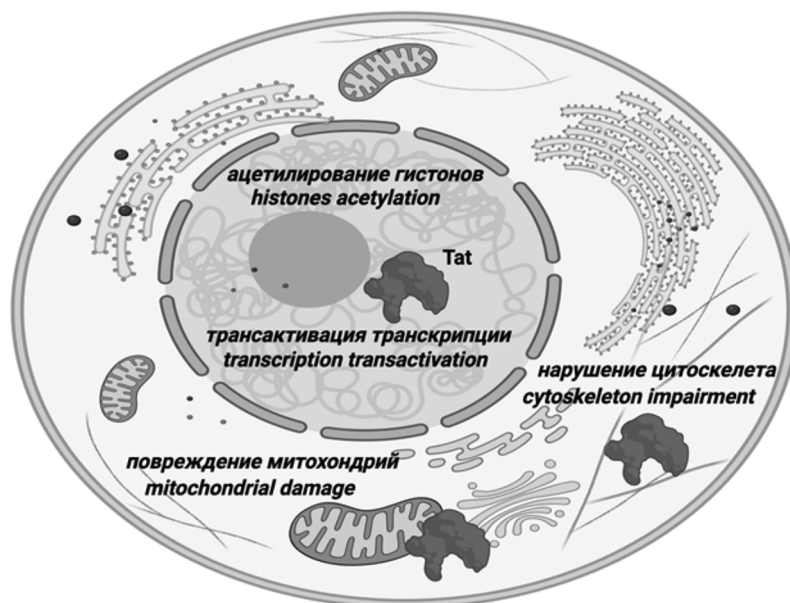


Рис. 2. Внутриклеточные активности белка Tat. Иллюстрация создана с применением графической программы BioRender, <https://biorender.com/>.

Fig. 2. Intracellular activities of Tat protein. The illustration was created using the graphics program BioRender, <https://biorender.com/>.

ная система (ЦНС). Непосредственно инфицировать нейроны ВИЧ не способен по причине отсутствия соответствующих рецепторов на их поверхности, поэтому все эффекты этого белка в данном случае

определяются исключительно проникновением его растворимой формы извне в клетки ЦНС. Результатом сочетанного действия Tat и других белков ВИЧ становятся нарушения, обозначаемые термином

«нейрокогнитивные расстройства, связанные с ВИЧ» (HIV-associated neurocognitive disorders, HAND), выраженность которых может доходить до степени деменции. Механизм действия Tat при этом связывают как с прямым нейротоксическим действием через повреждение нейронального цитоскелета, так и с деструкцией синаптических структур ЦНС [1, 18, 19].

Воздействие Tat на сердечно-сосудистую систему может проявляться участием в формировании лёгочной гипертензии, часто сопровождающей ВИЧ-инфекцию. В этой ситуации патофизиологический механизм предположительно обусловлен разрушением ДНК эндотелиальных клеток в сочетании с хроническим окислительным стрессом под воздействием проникающего в них Tat [20, 21]. Влияя на кардиомиоциты и парасимпатические нейроны, белок может вызывать брадикардию [22]. Кроме того, существует предположение о его ассоциации с повышенным риском развития атеросклероза у ВИЧ-инфицированных пациентов [23], что связывают с дисфункцией макрофагов и непосредственным влиянием на эндотелиоциты.

Онкогенный потенциал Tat также можно считать подтверждённым; обладая способностью взаимодействовать как с белковыми молекулами, так и с ДНК, он вмешивается в процессы размножения клеток, ускоряя клеточный цикл и способствуя опухолевому ангиогенезу [24]. Кроме того, известно, что Tat препятствует репарации двуцепочечных разрывов ДНК [24].

Структура и полиморфизм Tat

Tat представляет собой небольшой ядерный белок (от 86 до 106 аминокислот (АК), обычно 101), который кодируется 2 отдельными экзонами и содержит несколько доменов (рис. 3). Первый экзон включает АК в позициях с 1 по 72 и служит матрицей для синтеза транскрипционно активного белка Tat72, практически полностью обеспечивающего процесс элонгации транскрипции. Вторым экзон (73–101 АК) перекрывается с геном *env* и ответствен в основном за дополнительные функции Tat, возможно, опосредующие экспрессию хромосомных генов человека, связанных с активацией Т-клеток и их апоптозом [8, 25, 26].

Участок белка Tat72 состоит из 5 функциональных доменов (рис. 3):

1) первый (I) N-концевой домен (1–21 АК) включает пролин-обогащённый (Pro, P) участок и консервативный остаток триптофана (Trp, W) в 11 позиции; функция этого и второго доменов связана с взаимодействием с циклином Т1;

2) второй (II) домен (22–37 АК) включает 7 высококонсервативных остатков цистеина (Cys, C) в позициях 22, 25, 27, 30, 31, 34 и 37;

3) третий (III) домен (38–48 АК) – коровый (core), включающий гидрофобную последовательность 43LGISYG48; ответствен за контакт с гистоновыми ацетилтрансферазами и белком SP1;

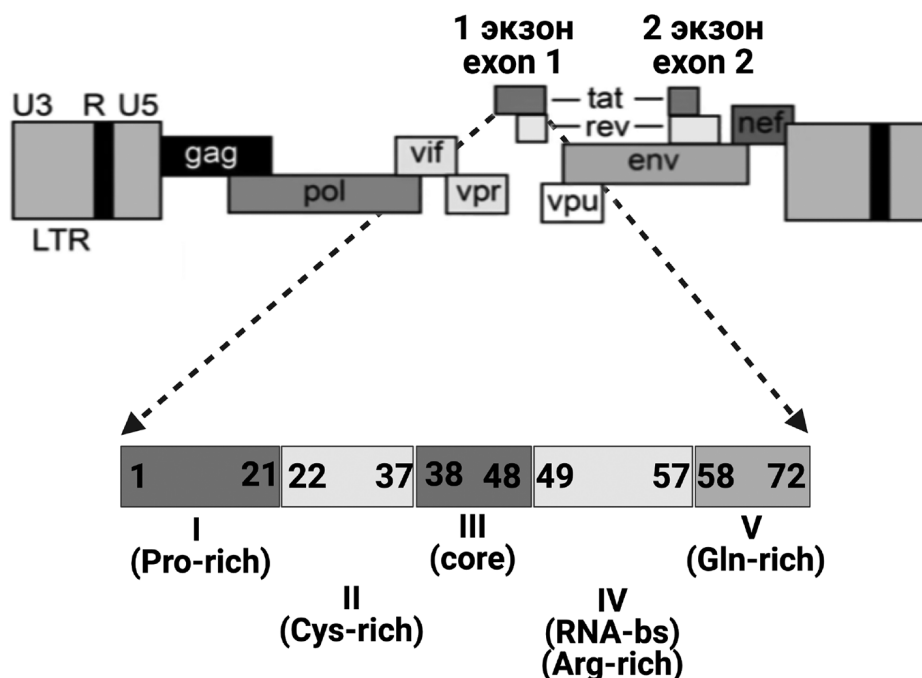


Рис. 3. Ген *tat* и функциональные домены белка Tat72. Tat кодируется двумя экзонами. Первые пять доменов (Tat72) кодируются первым экзонам. I (Pro-rich) – первый домен, пролин-богатая область; II (Cys-rich) – второй домен, цистеин-богатая область; III (core) – третий домен (коровый); IV (RNA-bs) (Arg-rich) – четвёртый домен, аргинин-богатая область, связывается с TAR-элементом РНК ВИЧ; V (Gln-rich) – пятый домен, глутамин-богатая область. Иллюстрация создана с применением графической программы BioRender, <https://biorender.com/>.

Fig. 3. *Tat* gene and functional domains of Tat72 protein. Tat is encoded by two exons. The first five domains are encoded by the first exon. I (Pro-rich), first domain, proline-rich region; II (Cys-rich), second domain, cysteine-rich region; III, third domain (core); IV (RNA-bs) (Arg-rich), fourth domain, arginine-rich region, binds to the TAR element of HIV RNA; V (Gln-rich), fifth domain, glutamine-rich region. The illustration was created using the graphics program BioRender, <https://biorender.com/>.

4) четвёртый (IV) – положительно заряженный домен (49–57 АК) содержит высококонсервативный аргинин-богатый (Arg, R) мотив 49RKRRQRRR57 и служит главным участком связывания TAR. Этот домен обладает повышенной склонностью к ядерной локализации, участвуя при этом в секреции и поглощении белка Tat;

5) пятый (V) – глутамин-обогащённый (Gln, Q) регион (58–72 АК) демонстрирует наибольшую степень генетической изменчивости; вместе с четвёртым доменом обеспечивает ядерную локализацию Tat [1, 9, 13, 25].

Шестой (VI) домен (73–101 АК), кодируемый вторым экзоном, содержит RGD-мотив, служащий лигандом для некоторых интегринов, и высококонсервативный мотив 86ESKKKVE92, который может быть связан с оптимизацией репликации ВИЧ-1 *in vivo* и Tat-опосредованной защитой от апоптоза CD4⁺ Т-лимфоцитов [25, 26].

Несмотря на высокую мутационную изменчивость ВИЧ-1, Tat является относительно консервативным белком. В наибольшей степени это относится к его первым 56 АК, что указывает на их важную функциональную роль в активности этой молекулы. Среди консервативных остатков находятся все остатки Cys (кроме C31), большая часть остатков Pro, консервативный остаток Trp в 11 позиции и основной домен (остатки лизина (Lys, K) и Arg в позициях 49–57) [17]. Тем не менее, как и прочим белкам ВИЧ, для Tat свойственна вариабельность. В этой связи имеющиеся, хотя и немногочисленные, исследования посвящены анализу последовательностей этого протеина, изучению влияния особенностей структуры Tat на его свойства, а также на клинические проявления ВИЧ-инфекции, включая анализ субтип-специфических замен. Объектом исследований чаще всего выступали II, IV и V домены Tat, а сравнение проводилось между 2 субтипами – в наибольшей степени изученным В и считающимся наиболее агрессивным С; некоторые из полученных данных приводятся ниже.

Так, эксперименты на культуре клеток [27] и животных моделях [28], анализ клинических изолятов [29] и клинико-эпидемиологических данных пациентов [30] показали возможное влияние мутации C30S31 в дицстеиновом мотиве Tat (C30C31) на характер нейротропности ВИЧ-инфекции и в частности на вероятность развития когнитивных расстройств (HAND). Проведённые исследования также оценили значимость основного CPP-региона (cell penetrating peptide; пептид проникновения в клетку) из 10 АК (48–57), связанного с проникновением Tat в клетки. Интернализация Tat опосредуется его связыванием с гепарансульфат протеогликаном (heparan sulfate proteoglycan, HSPG), экспрессируемыми на клеточной поверхности всех тканей, включая ткани мозга; при этом отрицательно заряженные HSPG взаимодействуют с положительно заряженными остатками Arg и лизина (Lys, K) в CPP-регионе [31–33]. Полиморфизмы CPP могут изменять степень поглощения клетками белка Tat, влияя на распространение «вторичного»

воспалительного сигнала в ЦНС. Исследования *in vitro* методом конфокальной микроскопии с флуоресцентно мечеными пептидами установили, что замены R57S или R57G значительно снижают клеточный захват Tat с участием CPP [18].

Изучение полиморфизмов в функционально значимых доменах Tat различных субтипов ВИЧ показало, что регион CPP этого белка у ВИЧ-1 подтипов В, D и F в значительной степени сохраняет полный набор из 8 остатков Arg/Lys, необходимый для оптимального поглощения Tat, однако 3 субтипа – А, С и G – продемонстрировали наличие замен R57S или R57G [18]. Недавнее исследование полиморфизмов в Cys-, Arg- и Gln-обогащённых доменах белка Tat ВИЧ-1 субтипа С в Южной Бразилии продемонстрировало, что АК-замены C31S, R57S, Q63E у субтипа С встречались в 82, 74 и 80% случаев, тогда как у В – в 10, 20 и 20% соответственно, а мутация Р60Q чаще выявлялась у субтипа В, чем у С (в 55 и 6% случаев соответственно) [34].

В России широко распространён ВИЧ-1 суб-субтипа А6, который вызвал инфекцию более чем у 70% пациентов [4, 35, 36]. К настоящему моменту изучение полиморфизма белка Tat в отношении ВИЧ-1 суб-субтипа А6 не проводилось. Вместе с тем выполненные ранее исследования других областей генома этого вируса установили наличие характерных для А6 отличий от других субтипов и рекомбинантных форм [37–40]. Получение сведений о структуре Tat у суб-субтипа А6 может быть полезным на различных этапах разработки новых препаратов для лечения и эрадикации ВИЧ-инфекции, создания вакцин и диагностических средств.

Целью данной работы было изучение особенностей области белка Tat, кодируемой первым экзоном и обеспечивающей трансактивацию, у суб-субтипа А6 ВИЧ-1: выявление характеристических замен, сравнение полиморфизмов А6 и наиболее близкого ему А1, а также выявление статистически значимых различий в дицстеиновом мотиве и CPP-регионе у суб-субтипа А6 и наиболее изученного в отношении биологических и клинических свойств субтипа В. Полученные данные позволят определить особенности структуры Tat у вирусов суб-субтипа А6 ВИЧ-1, спрогнозировать некоторые биологические свойства этого варианта и характер течения вызываемой им инфекции. Кроме того, результаты могут послужить стимулом для дальнейших исследований свойств белка Tat в культуре клеток и клинической практике.

Материал и методы

Из международной базы данных Los Alamos (Los Alamos National Laboratory; Main Search Interface of HIV Sequence Database; www.lanl.gov) были отображены 142 нуклеотидные последовательности первого экзона гена *tat* ВИЧ-1 суб-субтипа А6, 50 аналогичных последовательностей суб-субтипа А1, 6 нуклеотидных последовательностей суб-субтипа А2, 4 последовательности А3, 3 – А4 и 50 нуклеотидных последовательностей субтипа В. При этом для А2, А3 и А4 анализировались все представленные в базе нуклеотид-

ные последовательности первого экзона *tat*. В качестве референсной использовалась нуклеотидная последовательность штамма ВИЧ-1 дикого типа HXB2 (K03455). Все последовательности были выровнены относительно референсной HXB2 в программе MEGA v.10.2.2 (www.megasoftware.net). Размер анализируемого фрагмента составил 213 нуклеотидных оснований первого экзона гена *tat* (71 из 72 АК, кодируемых первым экзоном этого гена). После выравнивания некротные трём нуклеотидные вставки, включавшие повторяющиеся последовательности нуклеотидов, были интерпретированы как ошибки чтения и удалены.

После этого проведён контроль качества нуклеотидных последовательностей, в ходе которого из анализа исключены последовательности, содержавшие: а) замены в стартовом кодоне; б) стоп-кодона; в) пропуски нуклеотидов; г) следующие 2 раза подряд N-вырождения.

Для каждого из суб-субтипов А – А6, А1, А2, А3, А4, а также для субтипа В консенсусные последовательности получали в 2 этапа. Первоначально для каждого варианта вируса с помощью программного обеспечения Advanced Consensus Maker tool на сайте базы данных Los Alamos (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/CONSENSUS/AdvCon.html>) формировалась нуклеотидная консенсусная последовательность. Алгоритм данной программы предполагает включение в консенсус наиболее часто встречаемого нуклеотида по заданной позиции. Так как каждая АК кодируется триплетом, а при формировании консенсуса по каждому нуклеотиду осуществляется независимый анализ, то в случае равновероятного нахождения 2 нуклеотидов в одной позиции при образовании консенсусной последовательности АК существует возможность ошибок. В связи с этим на втором этапе при помощи программы MEGA v.10.2.2 осуществляли «ручную» проверку и корректировку консенсусных нуклеотидных последовательностей, собранных в Advanced Consensus Maker tool.

После этого проводили сравнение полученных последовательностей между собой и с референс-последовательностью, выявляя характеристические замены для суб-субтипа А6; при этом под характеристическими заменами понимали мутации, встречающиеся в составе генома вируса с частотой >50%.

Сравнение консенсусных последовательностей и референс-последовательности HXB2 осуществляли в программе MEGA 10.2.2. Вначале были отмечены позиции, различающиеся у консенсуса суб-субтипа А6 и референс-штамма HXB2. Затем позиции с выявленными различиями АК были сопоставлены соответствующим позициям в консенсусах суб-субтипов А1, А2, А3, А4 и субтипа В.

При сравнении естественных полиморфизмов А6 и А1 первоначально посредством программы MEGA v.10.2.2 выявляли естественные полиморфизмы обоих суб-субтипов относительно референсного штамма HXB2; при этом под полиморфизмами понимали мутации – единичные замены, встречающиеся в ≥1% наблюдений [41]. Далее с применением программного модуля Nonparametric Statistics из пакета STATISTICA 8.0

(StatSoft Inc., США) выявляли сайты со статистически достоверными различиями ($p < 0,05$ при использовании критерия χ^2). В дальнейшем анализе для большей наглядности из выявленных позиций со статистически значимыми различиями учитывали только те, в которых частота полиморфизма одного из сравниваемых суб-субтипов составляла ≥20%.

Отдельно сравнивали мутации – единичные замены в функционально значимых дицистеиновом мотиве и СРР-регионе белка Tat суб-субтипа А6 и субтипа В ВИЧ-1. После выявления всех имеющихся замен в анализируемых регионах для обоих вариантов вируса при помощи модуля Nonparametric Statistics (программный пакет STATISTICA 8.0) выявляли сайты с достоверными различиями ($p < 0,05$ в случае применения критерия χ^2).

Результаты

В данной работе мы проводили анализ 71 из 72 АК, расположенных в области Tat, кодируемой первым экзоном гена *tat*. В результате проведения контроля качества по 1 нуклеотидной последовательности суб-субтипов А6 (AF193275) и А1 (FJ388942), а также 3 таковых субтипа В (AB097870, A07867, AY819715) были исключены из дальнейшего процесса. Таким образом, в окончательный анализ вошли 141 последовательность суб-субтипа А6, 49 – суб-субтипа А1, 6 – суб-субтипа А2, 4 – суб-субтипа А3, 3 – А4 и 47 нуклеотидных последовательностей субтипа В.

После проверки и корректировки в MEGA v.10.2.2 консенсусных нуклеотидных последовательностей, собранных в Advanced Consensus Maker tool, в соответствующих им последовательностях АК произведены следующие замены:

- в консенсусе суб-субтипа А6: в 36 позиции изолейцин (Ile, I) заменён на валин (Val, V);
- в консенсусе суб-субтипа А2: в 36 позиции метионин (Met, M) заменён на R/L/V; в 69 позиции I – на I/V;
- в консенсусе суб-субтипа А3: в 12 позиции гистидин (His, H) заменён на H/Q; в 23 позиции серин (Ser, S) – на аспарагин (Asn, N)/S; в 24 позиции K заменён на N/K; в 53 позиции K – на K/R;
- в консенсусе суб-субтипа А4: в 36 позиции I заменён на V/M/S; в 60 позиции H – на H/R/тирозин (Tyr, Y);
- в консенсусе субтипа В: в 39 позиции I заменён на треонин (Thr, T).

По итогам сравнения консенсусной последовательности А6 с референсной HXB2 и последующего сопоставления с таковыми суб-субтипов А1, А2, А3, А4 и субтипа В получены данные, приведённые в **табл. 1**. Отмечены позиции АК, по которым консенсус суб-субтипа А6 отличался от консенсуса для штамма HXB2, а также указаны АК в соответствующих позициях у субтипа В и суб-субтипов А1, А2, А3 и А4.

Из таблицы видно, что наименьшие отличия от HXB2 выявлены, как и предполагалось, у субтипа В (позиции 42, 59, 61, 67). Для прочих вариантов вируса во всех доменах Tat обнаружены отличия как от референсного штамма HXB2, так и от В.

На основе анализа представленных в **табл. 1** дан-

ных выделены 2 группы АК-замен у суб-субтипа А6: а) типичные исключительно для А6 (Q54H, Q60H); б) характерные как для А6, так и для других суб-субтипов А (E2D, R7N, K12N, T23S, F32W, I39L, T40K, R57G, A58T, N61S, Q63K, T64D, A67N, S68P, L69I).

При сравнении естественных полиморфизмов в области, кодируемой первым экзоном гена *tat*, суб-субтипов А6 и филогенетически близкого к нему А1 установлены значительные различия во всех анализируемых доменах (табл. 2).

Анализ мутаций – единичных замен в дицистеиновом мотиве (С30С31) белка Tat не выявил достоверных различий у суб-субтипа А6 и у субтипа В ВИЧ-1, тогда как в СРР-регионе (АК-позиции 48–57) у этих вариантов вируса обнаружены 4 замены со статистически значимыми различиями – R53K, Q54H, Q54P, R57G (табл. 3).

Обсуждение

Как уже отмечалось, белок Tat является транс-активатором транскрипции генома ВИЧ, а также обладает рядом дополнительных внутри- и внеклеточных активностей. Мутации (АК-замены) внутри его молекулы способны влиять на эффективность функциони-

рования этого белка; при этом некоторые влияющие на функциональность Tat замены могут быть субтип-специфичными. Более того, белок Tat находится в перечне стратегических разработок для функционального излечения от ВИЧ-инфекции [2]. К настоящему времени созданы 2 анти-ВИЧ-протеина: Null-basic (мутантный Tat) и HT1 (гибридный белок HEX-IM1-Tat), подавляющие вирусную транскрипцию путём влияния на взаимодействие Tat и Rev с клеточными факторами [42, 43]. Получены также 2 малые молекулы – дидегидрокортистатин А (dCA) и триптолид, которые подавляют активность белка Tat посредством его прямого ингибирования либо усиления протеосомной деградации, соответственно [44, 45]. Помимо этого, в стадии разработки находятся 2 вакцины на основе Tat, которые, как уже показано, вызывают образование Tat-нейтрализующих антител, приводят к повышению числа CD4⁺ Т-клеток и снижению вирусной нагрузки у ВИЧ-инфицированных лиц [46, 47]. В данной работе изучались особенности области, кодируемой первым экзоном гена *tat*, у ВИЧ-1 суб-субтипа А6, наиболее распространённого на территории РФ.

Таблица 1. Аминокислотные позиции, в которых АК консенсуса суб-субтипа А6 отличались от АК в референсном штамме HXB2, и АК в соответствующих позициях консенсусов субтипа В и суб-субтипов А1, А2, А3, А4 вируса иммунодефицита человека 1 типа*

Table 1. The amino acid positions in which the consensus of sub-subtype A6 were different from the reference strain HXB2, and amino acids in consensus of subtype В and sub-subtypes A1, A2, A3, A4 human immunodeficiency virus type 1 in the corresponding positions*

Домен Domain	Номер позиции АК Amino acid position number	Штамм HXB2 HXB2 strain	Субтип В В subtype	Суб-субтип А6 A6 sub-subtype	Суб-субтип А1 A1 sub-sub- type	Суб-субтип А2 A2 sub-sub- type	Суб-субтип А3 A3 sub-subtype	Суб-субтип А4 A4 sub-subtype
I	2	E	E	D	D	E	E	E
	7	R	R	N	N	K	N	N
	12	K	K	N	N	N	H/Q	K
II	23	T	T	S	S	N	S/N	N
	32	F	F	W	Y	Y	W	Y
III	39	I	I	L	L	L	L	L
	40	T	T	K	N	N	N	K
	42	A	G	G	G	G	G	G
IV	54	Q	Q	H	Q	P	Q	L
	57	R	R	G	G	G	G	G
V	58	A	A	T	T	P	T	T
	59	H	P	P	P	S	P	P
	60	Q	Q	H	Q	Q	Q	H/R/Y
	61	N	D	S	S	S	S	S
	63	Q	Q	K	K	K	K	K
	64	T	T	D	D	D	D	D
	67	A	V	N	N	N	N	N
	68	S	S	P	P	P	P	P
	69	L	L	I	I	I/V	V	I

***Примечание.** Жирным шрифтом выделены позиции с характеристическими заменами и кандидатами на характеристические замены для суб-субтипа А6.

***Note.** Positions with characteristic substitutions and candidates for characteristic substitutions in sub-subtype A6 are shown in bold.

Таблица 2. Частота встречаемости мутаций (единичных замен) в области, кодируемой первым экзоном гена *tat*, вариантов суб-субтипов A1 и A6 вируса иммунодефицита человека 1 типа**Table 2. Frequency of mutations (single substitutions) in the region coded by the first exon of *tat* gene of human immunodeficiency virus type 1 sub-subtypes A1 and A6**

Домен Domain	Мутация Mutation	Частота встречаемости (%) Frequency of occurrence, percentage		Домен Domain	Мутация Mutation	Частота встречаемости (%) Frequency of occurrence, percentage		Домен Domain	Мутация Mutation	Частота встречаемости (%) Frequency of occurrence, percentage	
		A1	A6			A1	A6			A1	A6
I	E2D	87,8	99,3	III	I39L	73,5	99,3	V	A58T	67,3	85,8
	R7N	81,6	93,6		I39Q	24,5	0,0		Q60H	14,3	75,9
	K19T	77,6	0,7		T40K	20,4	92,2		T64D	79,6	98,6
	A21P	57,1	0,7		T40N	59,2	6,4		A67N	87,8	62,4
II	T23S	53,1	85,8	IV	R53K	26,5	9,9	V	S68P	91,8	59,6
	T23N	44,9	11,3		Q54H	0,0	63,1		S68L	4,1	28,4
	N24K	77,6	13,5		Q54P	6,1	22,7		L69I	59,2	89,4
	F32W	6,1	95		R57G	63,3	92,2		L69V	32,7	5,0
	F32Y	85,7	0,0						S70P	83,7	7,8
	Q35P	28,6	0,0						T64D	79,6	98,6
	V36I	0,0	36,9						A67N	87,8	62,4

Примечание. Мутациями считали замены в указанных позициях в сравнении с референс-штаммом HXB2. Жирным шрифтом выделены позиции, в которых замены у суб-субтипа A6 встречались более чем в 3,5 раза чаще.

Note. Mutations were defined as the substitutions in the indicated positions in comparison with the reference strain HXB2. The positions in which substitutions in the A6 subtype were found more than 3.5 times often are shown in bold.

Таблица 3. Мутации в дицистеиновом домене и CPP-регионе белка Tat вируса иммунодефицита человека 1 типа суб-субтипа A6 и субтипа B**Table 3. Mutations in the dicysteine domain and CPP region of Tat protein in human immunodeficiency virus type 1 subtype A6 and subtype B**

	Мутация Mutation	Суб-субтип A6 A6 sub-subtype <i>n</i> = 141	Субтип B B subtype <i>n</i> = 47	<i>p</i> -критерий <i>p</i> value
Дицистеиновый домен (C30C31) Dicysteine domain (C30C31)	C30R	2	0	0,4150
	C31S	7	1	0,4207
	C31V	5	0	0,1986
CPP-регион (48–57 позиции АК)	R49S	0	1	0,0857
	R52Q	1	0	0,5641
	R52W	1	1	0,4183
	R53K	14	0	0,0327
	R53G	0	1	0,0857
	Q54H	89	0	0,0000
	Q54P	32	2	0,0134
	Q54R	9	0	0,0856
	Q54S	2	0	0,4150
	Q54N	1	0	0,5641
CPP– region (48–57 aa positions)	R56C	1	0	0,5641
	R56H	1	0	0,5641
	R57G	130	3	0,0000
	R57E	1	0	0,5641
	R57A	1	0	0,5641

Примечание. Жирным шрифтом выделены замены со статистически значимыми различиями между суб-субтипом A6 и субтипом B. Анализ проводился при использовании критерия χ^2 .

Note. Substitutions with statistically significant differences between sub-subtype A6 and subtype B are shown in bold. The analysis was carried out using the χ^2 test.

По результатам выполненного исследования мутации Q54H и Q60H интерпретированы как характеристические замены для суб-субтипа A6 (табл. 1). Обращают на себя внимание также мутации F32W и T40K, выявлявшиеся в консенсусных последовательностях

суб-субтипа A6 и суб-субтипов A3 и A4 соответственно, но не обнаруженные в консенсусных последовательностях субтипа B, суб-субтипов A1 и A2 (табл. 1). Учитывая небольшие выборки последовательностей A3 и A4, позиции F32W и T40K следует также рассма-

тривать в качестве претендентов (кандидатов) на характеристические замены для ВИЧ-1 суб-субтипа А6.

При сопоставлении профилей естественных полиморфизмов белка Tat у суб-субтипов А6 и А1 в каждом домене, кодируемом первым экзоном гена *tat*, наблюдались значимые различия (табл. 2). Особое внимание следует обратить на замены F32W, V36I, T40K, Q54N, Q54P, Q60H, S68L, которые у А6 встречались более чем в 3,5 раза чаще.

При анализе частоты встречаемости мутаций в функционально значимых доменах достоверных различий в дицстеиновом мотиве у суб-субтипа А6 и субтипа В не обнаружено, тогда как в СРР-регионе найдены замены со статистически значимыми различиями – R53K, Q54N, Q54P и R57G (табл. 3). В настоящее время известно, что интернализация Tat опосредуется взаимодействием положительно заряженных остатков Arg и Lys в СРР-регионе с отрицательно заряженными HSPG на поверхности клеток, а замена R57G значительно снижает клеточный захват Tat [17, 23]. У суб-субтипа А6 замена R57G присутствовала в 92,2% (в 130 из 141 последовательности), тогда как у субтипа В – в 6,4% (3 из 47 последовательностей). Потенциально широко распространённая в Tat суб-субтипа А6 замена R57G (92,2%) способна вызывать снижение воспалительного потенциала данного белка, однако необходимо принимать во внимание возможное влияние других замен у Tat А6 в СРР-регионе: R53K (9,9% наблюдений), Q54N (63,1%) и Q54P (22,7%), которые могут как усиливать, так и ослаблять эффект мутации R57G.

Заключение

В результате проведённого анализа области белка Tat, кодируемой первым экзоном, у суб-субтипа А6 обнаружены характеристические замены, продемонстрированы существенные достоверные различия естественных полиморфизмов между А6 и А1, в СРР-регионе выявлены мутации с достоверно значимыми различиями для суб-субтипа А6 и наиболее изученного субтипа В. В целом полученные данные указывают на то, что Tat у суб-субтипа А6 обладает характерными особенностями и содержит АК-замены, которые потенциально способны оказывать влияние на функциональность этого белка. Полученные нами данные позволяют учитывать особенности Tat у ВИЧ-1 суб-субтипа А6 при разработке лекарственных препаратов и вакцин. Результаты экспериментов могут послужить стимулом для изучения комплексного влияния выявленных замен в СРР-регионе Tat у А6 на патогенный потенциал данного белка в клеточной культуре, а также для анализа клинических особенностей течения ВИЧ-инфекции у пациентов, инфицированных ВИЧ-1 суб-субтипа А6.

ЛИТЕРАТУРА

- Campbell G.R., Loret E.P. What does the structure-function relationship of the HIV-1 Tat protein teach us about developing an AIDS vaccine? *Retrovirology*. 2009; 6: 50. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-50>
- Jin H., Li D., Lin M.H., Li L., Harrich D. Tat-based therapies as an adjuvant for an HIV-1 functional cure. *Viruses*. 2020; 12(4): 415. <https://doi.org/10.3390/v12040415>
- Asamitsu K., Fujinaga K., Okamoto T. HIV tat/P-TEFb interaction: a potential target for novel anti-HIV therapies. *Molecules*. 2018; 23(4): 933. <https://doi.org/10.3390/molecules23040933>
- Лаповок И.А., Лопатухин А.Э., Киреев Д.Е., Казеннова Е.В., Лебедев А.В., Бобкова М.Р., и др. Молекулярно-эпидемиологический анализ вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в России в 1987–2015 гг. *Терапевтический архив*. 2017; 89(11): 44–9. <https://doi.org/10.17116/terarkh2017891144-49>
- Громов К.Б., Киреев Д.Е., Мурзакова А.В., Лопатухин А.Э., Казеннова Е.В., Бобкова М.Р. Анализ полиморфизма белка Nef вариантов ВИЧ-1 (*Human immunodeficiency virus-1, Lentivirus, Orthoretrovirinae, Retroviridae*), циркулирующих в странах бывшего СССР. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(6): 281–90. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-281-290>
- Rosen C.A. Tat and Rev: positive modulators of human immunodeficiency virus gene expression. *Gene Expr*. 1991; 1(2): 85–90.
- Clark E., Nava B., Caputi M. Tat is a multifunctional viral protein that modulates cellular gene expression and functions. *Oncotarget*. 2017; 8(16): 27569–81. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15174>
- Ajasin D., Eugenin E.A. HIV-1 Tat: Role in bystander toxicity. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2020; 10: 61. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00061>
- Spector C., Mele A.R., Wigdahl B., Nonnemacher M.R. Genetic variation and function of the HIV-1 Tat protein. *Med. Microbiol. Immunol*. 2019; 208(2): 131–69. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00583-z>
- Asamitsu K., Okamoto T. The Tat/P-TEFb protein-protein interaction determining transcriptional activation of HIV. *Curr. Pharm. Des*. 2017; 23(28): 4091–7. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170710164148>
- Nekhai S., Jeang K.T. Transcriptional and post-transcriptional regulation of HIV-1 gene expression: role of cellular factors for Tat and Rev. *Future Microbiol*. 2006; 1(4): 417–26. <https://doi.org/10.2217/17460913.1.4.417>
- Vardabasso C., Manganaro L., Lusic M., Marcello A., Giacca M. The histone chaperone protein nucleosome assembly protein-1 (hNAP-1) binds HIV-1 Tat and promotes viral transcription. *Retrovirology*. 2008; 5: 8. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-8>
- Kamori D., Ueno T. HIV-1 Tat and viral latency: What we can learn from naturally occurring sequence variations. *Front. Microbiol*. 2017; 8: 80. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00080>
- Rodríguez-Mora S., Mateos E., Moran M., Martín M.Á., López J.A., Calvo E., et al. Intracellular expression of Tat alters mitochondrial functions in T cells: a potential mechanism to understand mitochondrial damage during HIV-1 replication. *Retrovirology*. 2015; 12: 78. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0203-3>
- Darbinian N., Darbinyan A., Merabova N., Selzer M.E., Amini S. HIV-1 and HIV-1-Tat induce mitochondrial DNA damage in human neurons. *HIV AIDS*. 2020; 6(1): 176. <https://doi.org/10.16966/2380-5536.176>
- Kim J., Kim Y.S. Effect of HIV-1 Tat on the formation of the mitotic spindle by interaction with ribosomal protein S3. *Sci. Rep*. 2018; 8(1): 8680. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27008-w>
- Debaixieux S., Rayne F., Yezid H., Beaumelle B. The ins and outs of HIV-1 Tat. *Traffic*. 2012; 13(3): 355–63. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01286.x>
- Ruiz A.P., Ajasin D.O., Ramasamy S., DesMarais V., Eugenin E.A., Prasad V.R. A naturally occurring polymorphism in the HIV-1 Tat basic domain inhibits uptake by bystander cells and leads to reduced neuroinflammation. *Sci. Rep*. 2019; 9(1): 3308. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39531-5>
- Wenzel E.D., Avdoshina V., Mocchetti I. HIV-associated neurodegeneration: exploitation of the neuronal cytoskeleton.

- Neurovirol.* 2019; 25(3): 301–12. <https://doi.org/10.1007/s13365-019-00737-y>
20. Simenauer A., Nozik-Grayck E., Cota-Gomez A. The DNA damage response and HIV-associated pulmonary arterial hypertension. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(9): 3305. <https://doi.org/10.3390/ijms21093305>
21. Anand A.R., Rachel G., Parthasarathy D. HIV proteins and endothelial dysfunction: implications in cardiovascular disease. *Front. Cardiovasc. Med.* 2018; 5: 185. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00185>
22. Brailoiu E., Deliu E., Sporici R.A., Benamar K., Brailoiu G.C. HIV-1-Tat excites cardiac parasympathetic neurons of nucleus ambiguus and triggers prolonged bradycardia in conscious rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2014; 306(11): R814–22. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00529.2013>
23. Jiang Y., Chai L., Fasae M.B., Bai Y. The role of HIV Tat protein in HIV-related cardiovascular diseases. *J. Transl. Med.* 2018; 16(1): 121. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1500-0>
24. Isaguliantis M., Bayurova E., Avdoshina D., Kondrashova A., Chiodi F., Palefsky J.M. Oncogenic effects of HIV-1 proteins, mechanisms behind. *Cancers.* 2021; 13(2): 305. <https://doi.org/10.3390/cancers13020305>
25. Li L., Dahiya S., Kortagere S., Aiamkitsumrit B., Cunningham D., Pirrone V., et al. Impact of Tat genetic variation on HIV-1 disease. *Adv. Virol.* 2012; 2012: 123605. <https://doi.org/10.1155/2012/123605>
26. López-Huertas M.R., Mateos E., del Cojo M.S., Gómez-Esquer F., Díaz-Gil G., Rodríguez-Mora S., et al. The presence of HIV-1 Tat protein second exon delays Fas protein-mediated apoptosis in CD4⁺ T Lymphocytes: a potential mechanism for persistent viral production. *J. Biol. Chem.* 2013; 288(11): 7626–44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.408294>
27. Mishra M., Vetrivel S., Siddappa N.B., Ranga U., Seth P. Clade-specific differences in neurotoxicity of human immunodeficiency virus-1 B and C Tat of human neurons: significance of dicysteine C30C31 motif. *Ann. Neurol.* 2008; 63(3): 366–76. <https://doi.org/10.1002/ana.21292>
28. Rao V.R., Sas A.R., Eugenin E.A., Siddapa N.B., Bimonte-Nelson H., Berman J.W., et al. HIV-1 clade-specific differences in the induction of neuropathogenesis. *J. Neurosci.* 2008; 28(40): 10010–6. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2955-08.2008>
29. Rao V.R., Neogi U., Talboom J.S., Padilla L., Rahman M., Fritz-French C., et al. Clade C HIV-1 isolates circulating in Southern Africa exhibit a greater frequency of dicysteine motif-containing Tat variants than those in Southeast Asia and cause increased neurovirulence. *Retrovirology.* 2013; 10: 61. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-61>
30. Paul R.H., Joska J.A., Woods C., Seedat S., Engelbrecht S., Hoare J., et al. Impact of the HIV Tat C30C31S dicysteine substitution on neuropsychological function in patients with clade C disease. *J. Neurovirol.* 2014; 20(6): 627–35. <https://doi.org/10.1007/s13365-014-0293-z>
31. Vivès E., Brodin P., Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(25): 16010–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.25.16010>
32. Ziegler A., Seelig J. Interaction of the protein transduction domain of HIV-1 TAT with heparan sulfate: binding mechanism and thermodynamic parameters. *Biophys. J.* 2004; 86(1 Pt. 1): 254–63. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(04\)74101-6](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(04)74101-6)
33. Ziegler A., Nervi P., Dürrenberger M., Seelig J. The cationic cell-penetrating peptide CPP^{TAT} derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence. *Biochemistry.* 2005; 44(1): 138–8. <https://doi.org/10.1021/bi0491604>
34. de Almeida S.M., Rotta I., Vidal L.R.R., Dos Santos J.S., Nath A., Johnson K., et al. HIV-1C and HIV-1B Tat protein polymorphism in Southern Brazil. *J. Neurovirol.* 2021; 27(1): 126–36. <https://doi.org/10.1007/s13365-020-00935-z>
35. Bobkov A., Kazennova E., Selimova L., Bobkova M., Khanina T., Ladnaya N., et al. A sudden epidemic of HIV type 1 among injecting drug users in the former Soviet Union: identification of subtype A, subtype B, and novel gagA/envB recombinants. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 1998; 14(8): 669–76. <https://doi.org/10.1089/aid.1998.14.669>
36. Lebedev A., Lebedeva N., Moskaleychik F., Pronin A., Kazennova E., Bobkova M. Human immunodeficiency virus-1 diversity in the Moscow Region, Russia: Phylodynamics of the most common subtypes. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 320. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00320>
37. Казеннова Е.В., Лаповок И.А., Лага В.Ю., Васильев А.В., Бобкова М.Р. Естественные полиморфизмы гена *pol* варианта ВИЧ-1 IDU-A. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии.* 2012; 4(4): 44–51.
38. Васильев А.В., Казеннова Е.В., Бобкова М.Р. Предсказание фенотипа R5/X4 вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в России, с использованием компьютерных методов. *Вопросы вирусологии.* 2009; 54(3): 17–20.
39. Казеннова Е.В., Васильев А.В., Бобкова М.Р. Прогноз эффективности применения препарата Беверимат для лечения ВИЧ-инфекции в России. *Вопросы вирусологии.* 2010; 55(3): 37–41.
40. Lapovok I., Laga V., Kazennova E., Bobkova M. HIV type 1 integrase natural polymorphisms in viral variants circulating in FSU countries. *Curr. HIV Res.* 2017; 15(5): 318–26. <https://doi.org/10.2174/1570162X15666170815162052>
41. Shafer R.W., Rhee S.Y., Pillay D., Miller V., Sandstrom P., Schapiro J.M., et al. HIV protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS.* 2007; 21(2): 215–23. <https://doi.org/10.1097/qad.0b013e328011e691>
42. Jin H., Sun Y., Li D., Lin M.H., Lor M., Rustanti L., et al. Strong *in vivo* inhibition of HIV-1 replication by Nullbasic, a Tat mutant. *mBio.* 2019; 10(4): e01769–19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01769-19>
43. Leoz M., Kukanja P., Luo Z., Huang F., Cary D.C., Peterlin B.M., et al. HEXIM1-Tat chimera inhibits HIV-1 replication. *PLoS Pathog.* 2018; 14(11): e1007402. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007402>
44. Mediouni S., Chinthalapudi K., Ekka M.K., Usui I., Jablonski J.A., Clementz M.A., et al. Didehydro-cortistatin A inhibits HIV-1 by specifically binding to the unstructured basic region of Tat. *mBio.* 2019; 10(1): e02662–18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02662-18>
45. Wan Z., Chen X. Triptolide inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication by promoting proteasomal degradation of Tat protein. *Retrovirology.* 2014; 11: 88. <https://doi.org/10.1186/s12977-014-0088-6>
46. Sgadari C., Monini P., Tripiciano A., Picconi O., Casabianca A., Orlandi C., et al. Continued decay of HIV proviral DNA upon vaccination with HIV-1 Tat of subjects on long-term ART: An 8-year follow-up study. *Front. Immunol.* 2019; 10: 233. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00233>
47. Loret E.P., Darque A., Jouve E., Loret E.A., Nicolino-Brunet C., Morange S., et al. Intradermal injection of a Tat Oyi-based therapeutic HIV vaccine reduces of 1.5 log copies/mL the HIV RNA rebound median and no HIV DNA rebound following cart interruption in a phase I/II randomized controlled clinical trial. *Retrovirology.* 2016; 13: 21. <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0251-3>

REFERENCES

1. Campbell G.R., Loret E.P. What does the structure-function relationship of the HIV-1 Tat protein teach us about developing an AIDS vaccine? *Retrovirology.* 2009; 6: 50. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-50>
2. Jin H., Li D., Lin M.H., Li L., Harrich D. Tat-based therapies as an adjuvant for an HIV-1 functional cure. *Viruses.* 2020; 12(4): 415. <https://doi.org/10.3390/v12040415>
3. Asamitsu K., Fujinaga K., Okamoto T. HIV tat/P-TEFb interaction: a potential target for novel anti-HIV therapies. *Molecules.* 2018; 23(4): 933. <https://doi.org/10.3390/molecules23040933>

4. Lapovok I.A., Lopatukhin A.E., Kireev D.E., Kazennova E.V., Lebedev A.V., Bobkova M.R., et al. Molecular epidemiological analysis of HIV-1 variants circulating in Russia in 1987–2015 [*Molekulyarno-epidemiologicheskii analiz variantov VICH-1, tsirkulirovavshikh v Rossii v 1987–2015 gg.*]. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2017; 89(11): 44–9. <https://doi.org/10.17116/terarkh2017891144-49> (in Russian)
5. Gromov K.B., Kireev D.E., Murzakova A.V., Lopatukhin A.E., Kazennova E.V., Bobkova M.R. Analysis of HIV-1 (*Human immunodeficiency virus-1, Lentivirus, Orthoretrovirinae, Retroviridae*) Nef protein polymorphism of variants circulating in the former USSR countries [*Analiz polimorfizma belka Nef variantov VICH-1 (Human immunodeficiency virus-1, Lentivirus, Orthoretrovirinae, Retroviridae), tsirkuliruyushchikh v stranakh byvshego SSSR*]. *Voprosy virusologii*. 2019; 64(6): 281–90. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-6-281-290> (in Russian)
6. Rosen C.A. Tat and Rev: positive modulators of human immunodeficiency virus gene expression. *Gene Expr*. 1991; 1(2): 85–90.
7. Clark E., Nava B., Caputi M. Tat is a multifunctional viral protein that modulates cellular gene expression and functions. *Oncotarget*. 2017; 8(16): 27569–81. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15174>
8. Ajasin D., Eugenin E.A. HIV-1 Tat: Role in bystander toxicity. *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2020; 10: 61. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00061>
9. Spector C., Mele A.R., Wigdahl B., Nonnemacher M.R. Genetic variation and function of the HIV-1 Tat protein. *Med. Microbiol. Immunol*. 2019; 208(2): 131–69. <https://doi.org/10.1007/s00430-019-00583-z>
10. Asamitsu K., Okamoto T. The Tat/P-TEFb protein-protein interaction determining transcriptional activation of HIV. *Curr. Pharm. Des*. 2017; 23(28): 4091–7. <https://doi.org/10.2174/138161282366170710164148>
11. Nekhai S., Jeang K.T. Transcriptional and post-transcriptional regulation of HIV-1 gene expression: role of cellular factors for Tat and Rev. *Future Microbiol*. 2006; 1(4): 417–26. <https://doi.org/10.2217/17460913.1.4.417>
12. Vardabasso C., Manganaro L., Lusic M., Marcello A., Giacca M. The histone chaperone protein nucleosome assembly protein-1 (hNAP-1) binds HIV-1 Tat and promotes viral transcription. *Retrovirology*. 2008; 5: 8. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-5-8>
13. Kamori D., Ueno T. HIV-1 Tat and viral latency: What we can learn from naturally occurring sequence variations. *Front. Microbiol*. 2017; 8: 80. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00080>
14. Rodríguez-Mora S., Mateos E., Moran M., Martín M.Á., López J.A., Calvo E., et al. Intracellular expression of Tat alters mitochondrial functions in T cells: a potential mechanism to understand mitochondrial damage during HIV-1 replication. *Retrovirology*. 2015; 12: 78. <https://doi.org/10.1186/s12977-015-0203-3>
15. Darbinian N., Darbinian A., Merabova N., Selzer M.E., Amini S. HIV-1 and HIV-1-Tat induce mitochondrial DNA damage in human neurons. *HIV AIDS*. 2020; 6(1): 176. <https://doi.org/10.16966/2380-5536.176>
16. Kim J., Kim Y.S. Effect of HIV-1 Tat on the formation of the mitotic spindle by interaction with ribosomal protein S3. *Sci. Rep*. 2018; 8(1): 8680. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27008-w>
17. Debaisieux S., Rayne F., Yezid H., Beaumelle B. The ins and outs of HIV-1 Tat. *Traffic*. 2012; 13(3): 355–63. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01286.x>
18. Ruiz A.P., Ajasin D.O., Ramasamy S., DesMarais V., Eugenin E.A., Prasad V.R. A naturally occurring polymorphism in the HIV-1 Tat basic domain inhibits uptake by bystander cells and leads to reduced neuroinflammation. *Sci. Rep*. 2019; 9(1): 3308. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39531-5>
19. Wenzel E.D., Avdoshina V., Mocchetti I. HIV-associated neurodegeneration: exploitation of the neuronal cytoskeleton. *Neurovirol*. 2019; 25(3): 301–12. <https://doi.org/10.1007/s13365-019-00737-y>
20. Simenauer A., Nozik-Grayck E., Cota-Gomez A. The DNA damage response and HIV-associated pulmonary arterial hypertension. *Int. J. Mol. Sci*. 2020; 21(9): 3305. <https://doi.org/10.3390/ijms21093305>
21. Anand A.R., Rachel G., Parthasarathy D. HIV proteins and endothelial dysfunction: implications in cardiovascular disease. *Front. Cardiovasc. Med*. 2018; 5: 185. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00185>
22. Brailoiu E., Deliu E., Sporici R.A., Benamar K., Brailoiu G.C. HIV-1-Tat excites cardiac parasympathetic neurons of nucleus ambiguus and triggers prolonged bradycardia in conscious rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol*. 2014; 306(11): R814–22. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00529.2013>
23. Jiang Y., Chai L., Fasae M.B., Bai Y. The role of HIV Tat protein in HIV-related cardiovascular diseases. *J. Transl. Med*. 2018; 16(1): 121. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1500-0>
24. Isagulians M., Bayurova E., Avdoshina D., Kondrashova A., Chiodi F., Palefsky J.M. Oncogenic effects of HIV-1 proteins, mechanisms behind. *Cancers*. 2021; 13(2): 305. <https://doi.org/10.3390/cancers13020305>
25. Li L., Dahiya S., Kortagere S., Aiamkitsumrit B., Cunningham D., Pirrone V., et al. Impact of Tat genetic variation on HIV-1 disease. *Adv. Virol*. 2012; 2012: 123605. <https://doi.org/10.1155/2012/123605>
26. López-Huertas M.R., Mateos E., del Cojo M.S., Gómez-Esquer F., Díaz-Gil G., Rodríguez-Mora S., et al. The presence of HIV-1 Tat protein second exon delays Fas protein-mediated apoptosis in CD4⁺ T Lymphocytes: a potential mechanism for persistent viral production. *J. Biol. Chem*. 2013; 288(11): 7626–44. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.408294>
27. Mishra M., Vetrivel S., Siddappa N.B., Ranga U., Seth P. Clade-specific differences in neurotoxicity of human immunodeficiency virus-1 B and C Tat of human neurons: significance of dicysteine C30C31 motif. *Ann. Neurol*. 2008; 63(3): 366–76. <https://doi.org/10.1002/ana.21292>
28. Rao V.R., Sas A.R., Eugenin E.A., Siddappa N.B., Bimonte-Nelson H., Berman J.W., et al. HIV-1 clade-specific differences in the induction of neuropathogenesis. *J. Neurosci*. 2008; 28(40): 10010–6. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2955-08.2008>
29. Rao V.R., Neogi U., Talboom J.S., Padilla L., Rahman M., Fritz-French C., et al. Clade C HIV-1 isolates circulating in Southern Africa exhibit a greater frequency of dicysteine motif-containing Tat variants than those in Southeast Asia and cause increased neurovirulence. *Retrovirology*. 2013; 10: 61. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-61>
30. Paul R.H., Joska J.A., Woods C., Seedat S., Engelbrecht S., Hoare J., et al. Impact of the HIV Tat C30C31S dicysteine substitution on neuropsychological function in patients with clade C disease. *J. Neurovirol*. 2014; 20(6): 627–35. <https://doi.org/10.1007/s13365-014-0293-z>
31. Vivès E., Brodin P., Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem*. 1997; 272(25): 16010–7. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.25.16010>
32. Ziegler A., Seelig J. Interaction of the protein transduction domain of HIV-1 TAT with heparan sulfate: binding mechanism and thermodynamic parameters. *Biophys. J*. 2004; 86(1 Pt. 1): 254–63. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(04\)74101-6](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(04)74101-6)
33. Ziegler A., Nervi P., Dürrenberger M., Seelig J. The cationic cell-penetrating peptide CPP^{TAT} derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence. *Biochemistry*. 2005; 44(1): 138–8. <https://doi.org/10.1021/bi0491604>
34. de Almeida S.M., Rotta I., Vidal L.R.R., Dos Santos J.S., Nath A., Johnson K., et al. HIV-1C and HIV-1B Tat protein polymorphism in Southern Brazil. *J. Neurovirol*. 2021; 27(1): 126–36. <https://doi.org/10.1007/s13365-020-00935-z>
35. Bobkov A., Kazennova E., Selimova L., Bobkova M., Khanina T., Ladnaya N., et al. A sudden epidemic of HIV type 1 among injecting drug users in the former Soviet Union: identification of subtype A, subtype

- B, and novel gagA/envB recombinants. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 1998; 14(8): 669–76. <https://doi.org/10.1089/aid.1998.14.669>
36. Lebedev A., Lebedeva N., Moskaleychik F., Pronin A., Kazennova E., Bobkova M. Human immunodeficiency virus-1 diversity in the Moscow Region, Russia: Phylodynamics of the most common subtypes. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 320. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00320>
 37. Kazennova E.V., Lapovok I.A., Laga V.Yu., Vasil'ev A.V., Bobkova M.R. Natural polymorphisms of HIV-1 IDU-A variant *pol* gene [Estestvennye polimorfizmy gena *pol* varianta VICH-1 IDU-A]. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2012; 4(4): 44–51 (in Russian).
 38. Vasil'ev A.V., Kazennova E.V., Bobkova M.R. Prediction of phenotype R5/X4 of HIV-1 variants circulating in Russia, by using computer methods [Predskazanie fenotipa R5/X4 variantov VICH-1, tsirkuliruyushchikh v Rossii, s ispol'zovaniem komp'yuternykh metodov]. *Voprosy virusologii*. 2009; 54(3): 17–20 (in Russian).
 39. Kazennova E.V., Vasil'ev A.V., Bobkova M.R. Prediction of the efficacy of bevirimat used for the treatment of HIV infection in Russia [Prognoz effektivnosti primeneniya preparata Bevirimat dlya lecheniya VICH-infektsii v Rossii]. *Voprosy virusologii*. 2010; 55(3): 37–41 (in Russian).
 40. Lapovok I., Laga V., Kazennova E., Bobkova M. HIV type 1 integrase natural polymorphisms in viral variants circulating in FSU countries. *Curr. HIV Res.* 2017; 15(5): 318–26. <https://doi.org/10.2174/1570162X15666170815162052>
 41. Shafer R.W., Rhee S.Y., Pillay D., Miller V., Sandstrom P., Schapiro J.M., et al. HIV protease and reverse transcriptase mutations for drug resistance surveillance. *AIDS*. 2007; 21(2): 215–23. <https://doi.org/10.1097/qad.0b013e328011e691>
 42. Jin H., Sun Y., Li D., Lin M.H., Lor M., Rustanti L., et al. Strong *in vivo* inhibition of HIV-1 replication by Nullbasic, a Tat mutant. *mBio*. 2019; 10(4): e01769–19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01769-19>
 43. Leoz M., Kukanja P., Luo Z., Huang F., Cary D.C., Peterlin B.M., et al. HEXIM1-Tat chimera inhibits HIV-1 replication. *PLoS Pathog.* 2018; 14(11): e1007402. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007402>
 44. Mediouni S., Chinthalapudi K., Ekka M.K., Usui I., Jablonski J.A., Clementz M.A., et al. Didehydro-cortistatin A inhibits HIV-1 by specifically binding to the unstructured basic region of Tat. *mBio*. 2019; 10(1): e02662–18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02662-18>
 45. Wan Z., Chen X. Triptolide inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication by promoting proteasomal degradation of Tat protein. *Retrovirology*. 2014; 11: 88. <https://doi.org/10.1186/s12977-014-0088-6>
 46. Sgadari C., Monini P., Tripiciano A., Picconi O., Casabianca A., Orlandi C., et al. Continued decay of HIV proviral DNA upon vaccination with HIV-1 Tat of subjects on long-term ART: An 8-year follow-up study. *Front. Immunol.* 2019; 10: 233. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00233>
 47. Loret E.P., Darque A., Jouve E., Loret E.A., Nicolino-Brunet C., Morange S., et al. Intradermal injection of a Tat Oyi-based therapeutic HIV vaccine reduces of 1.5 log copies/mL the HIV RNA rebound median and no HIV DNA rebound following cart interruption in a phase I/II randomized controlled clinical trial. *Retrovirology*. 2016; 13: 21. <https://doi.org/10.1186/s12977-016-0251-3>

Указатель статей, опубликованных в журнале «Вопросы вирусологии» в 2021 г.

ОБЗОРЫ

- Ботвинкин А.Д.** Вирусы и летучие мыши: междисциплинарные проблемы. * 4, 259-268
- Гарбузенко Д.В.** Роль противовирусной терапии в лечении больных циррозом печени, ассоциированным с хронической HBV- и HCV-инфекцией. 5, 331-339
- Должикова И.В., Щербинин Д.Н., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л.** Вирус Эбола (*Filoviridae: Ebolavirus: Zaire ebolavirus*): фатальные адаптационные мутации. 1, 7-16
- Зайнутдинов С.С., Сиволобова Г.Ф., Локтев В.Б., Кочнева Г.В.** Мукозальный иммунитет и вакцины против вирусных инфекций. 6, 399-408
- Исаева О.В., Кюрегян К.К., Михайлов М.И.** Дельта-подобные вирусы (*Kolmioviridae: Deltavirus*) животных и происхождение вируса гепатита D (*hepatitis D virus*) человека. 5, 340-345
- 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. 2, 112-122
- Пашков Е.А., Корчевая Е.Р., Файзулов Е.Б., Свитич О.А., Пашков Е.П., Нечаев Д.Н., Зверев В.В.** Потенциал применения явления РНК-интерференции в терапии новой коронавирусной инфекции COVID-19. 4, 241-251
- Петрова Н.В., Ганина К.К., Тарасов С.А.** Изучение чувствительности лабораторных животных к вирусу SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*). 2, 103-111
- Попова О.Д., Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Зрелкин Д.И., Воронина Д.В., Должикова И.В., Щедляков Д.В., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л.** Обзор кандидатных вакцин для профилактики лихорадки Ласса. 2, 91-102
- Салеева Д.В., Засухина Г.Д.** Перспективы применения малых доз радиации в комплексной терапии COVID-19. 4, 252-258
- Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Борисевич С.В.** Молекулярная эволюция вируса Даби (*Phenuiviridae: Bandavirus: Dabie bandavirus*) – возбудителя острой лихорадки с тромбоцитопеническим синдромом. 6, 409-416
- Хафизов К.Ф., Петров В.В., Красовитов К.В., Золкина М.В., Акимкин В.Г.** Экспресс-диагностика новой коронавирусной инфекции с помощью реакции петлевой изотермической амплификации. 1, 17-28

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Акимкин В.Г., Петров В.В., Красовитов К.В., Борисова Н.И., Котов И.А., Родионова Е.Н., Черкашина А.С., Кондрашева Л.Ю., Тиванова Е.В., Хафизов К.Ф.** Молекулярные методы диагностики новой коронавирусной инфекции: сравнение петлевой изотермической амплификации и полимеразной цепной реакции. * 6, 417-424
- Алимбарова Л.М., Амбросов И.В., Матело С.К., Баринский И.Ф.** Противовирусная активность комплексного германийорганического соединения ацикловира в системах *in vitro* и *in vivo* в отношении вируса простого герпеса (*Herpesviridae: Alphaherpesvirinae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1/2*). 5, 368-382

- Борисевич Г.В., Кириллова С.Л., Шатохина И.В., Лебедев В.Н., Шагарова Н.В., Сыромятникова С.И., Андрус А.Ф., Ковальчук Е.А., Кириллов В.Б., Беспалов М.Л., Петров А.А., Ковальчук А.В., Пантюхов В.Б., Кутаев Д.А., Борисевич С.В., Кузнецов С.Л.** Оценка клеточного иммунитета макаков резусов методом проточной цитометрии после экспериментального инфицирования вирусом Эбола (*Filoviridae: Ebolavirus: Zaire ebolavirus*). 4, 289-298
- Борисова Н.И., Котов И.А., Колесников А.А., Каптелова В.В., Сперанская А.С., Кондрашева Л.Ю., Тиванова Е.В., Хафизов К.Ф., Акимкин В.Г.** Мониторинг распространения вариантов SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) на территории Московского региона с помощью таргетного высокопроизводительного секвенирования. * 4, 269-278
- Гайдай Е.А., Крышень К.Л., Джайн (Корсакова) Е.А., Демченко Д.В., Каргопольцева Д.Р., Кательникова А.Е., Гайдай Д.С., Балабаньян В.Ю.** Исследование специфических видов токсичности оригинального нуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека 1 типа (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus 1*) на основе субстанции 1-[2-(2-бензоилфенокси)этил]-6-метилурацил. 4, 279-288
- Догадов Д.И., Корзая Л.И., Кюрегян К.К., Карлсен А.А., Михайлов М.И.** Маркеры вирусного гепатита Е (*Hepeviridae, Orthohepevirus, Orthohepevirus A*) у импортированных низших обезьян Старого Света. 3, 182-188
- Капнина Л.Б., Селимова Л.М., Каплина Э.Н., Носик Д.Н.** Экспрессия интегринов $\beta 1$, $\alpha 4$ и молекулы клеточной адгезии ICAM-1 в присутствии дезоксирибонуклеата натрия с железом комплекса (ДНК-Na-Fe) клетками МТ-4, трансформированными Т-лимфотропным вирусом человека 1 типа (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Deltaretrovirus: Human T-lymphotropic virus type 1*). 3, 227-232
- Корзая Л.И., Догадов Д.И., Гончаренко А.М., Карлсен А.А., Кюрегян К.К., Михайлов М.И.** Распространение маркеров респираторных вирусов человека среди обезьян Адлерского приматологического центра. 6, 425-433
- 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. 2, 129-139
- Кузнецова А.И., Громов К.Б., Киреев Д.Е., Шлыкова А.В., Лопатухин А.Э., Казеннова Е.В., Лебедев А.В., Туманов А.С., Ким К.В., Бобкова М.Р.** Анализ особенностей белка Tat вируса иммунодефицита человека 1 типа суб-субтипа A6 (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1, sub-subtype A6*). * 6, 452-464
- Лобанова В.А., Клюкина В.И.** Оптимизация схемы вакцинации собак против бешенства (*Rhabdoviridae: Lyssavirus*) при помощи математической модели. * 5, 354-367
- 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. 2, 123-128

*Статьи опубликованы на русском и английском языках на сайте журнала: <https://virusjour.elpub.ru/jour>

- Мазлум А., Иголкин А.С., Зиняков Н.Г., ван Шалквик А., Власова Н.Н.** Геномные изменения вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus: African swine fever virus*), связанные с адаптацией к размножению в перевиваемой культуре клеток. 3, 211-216
- Марченко В.А., Барашкова С.В., Зелинская И.А., Торопова Я.Г., Рэмзи Э.С., Жилинская И.Н.** Экспрессия эндотелиальных факторов в клетках эндотелия человека при инфекции, вызванной вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (*Orthomyxoviridae: Alphainfluenzavirus*). 3, 198-210
- Мельникова О.В., Адельшин Р.В., Лопатовская К.В., Трушина Ю.Н., Якович Н.В., Андаев Е.И.** Биологические свойства и филогенетические связи изолятов вируса клещевого энцефалита (*Flaviviridae: Flavivirus*) сибирского субтипа, выделенных на юге Восточной Сибири в современный период. 4, 310-321
- Найденова Е.В., Карташов М.Ю., Захаров К.С., Шевцова А.П., Диалло М.Г., Нурдин И., Ба М.Б., Бумбали С., Щербакова С.А., Кутырев В.В.** Определение уровня иммунной прослойки населения Гвинейской Республики к некоторым арбовирусам.* 5, 346-353
- Новиков Д.В., Мелентьев Д.А., Мохонов В.В., Кашников А.Ю., Новикова Н.А., Лапин В.А., Мохонова Е.В., Новиков В.В.** Получение вирусоподобных частиц норовируса (*Caliciviridae: Norovirus*), содержащих белок VP1 энтеровируса Echovirus 30 (*Picornaviridae: Enterovirus: Enterovirus B*). 5, 383-389
- Попова А.Ю., Смирнов В.С., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Самойлова Л.В., Лялина Л.В., Семенова Е.В., Гурский М.А., Аксенова Е.А., Арбузова Т.В., Тотолян А.А.** Популяционный иммунитет к SARS-CoV-2 населения Новосибирской области на фоне пандемии COVID-19. 4, 299-309
- Попова А.А., Домонова Э.А., Покровская А.В., Шипулина О.Ю., Покровский В.В.** Распространённость вируса папилломы человека высокого канцерогенного риска по результатам скрининга трех анатомических локусов у мужчин, стратифицированных по сексуальному поведению и ВИЧ-статусу. 3, 217-226
- 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. 2, 140-151
- 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. 2, 152-161
- Сорокин Е.В., Царёва Т.Р., Руднева И.А., Тимофеев Б.И., Ляшко А.В., Баланова М.А., Артёмов Е.К., Гребенникова Т.В., Тимофеева Т.А.** Моноклональные антитела к гемагглютинирующему вирусу гриппа A/H7N3 (*Orthomyxoviridae: Alphainfluenzavirus: Influenza A virus*). 3, 189-197
- Трифонов Т.С., Моисеенко А.В., Буркальцева М.В., Шабурова О.В., Шайтан А.К., Крылов В.Н., Соколова О.С.** Картирование ДНК в капсиде гигантского бактериофага phiEL (*Caudovirales: Myoviridae: Elvirus*) с помощью аналитической электронной микроскопии.* 6, 434-441
- Чепур С.В., Алексеева И.И., Владимиров О.О., Мясников В.А., Тюнин М.А., Ильинский Н.С., Никишин А.С., Шевченко В.А., Смирнова А.В.** Особенности патологии дыхательной системы у сирийских хомяков (*Mesocricetus auratus*) при инфекции вирусом SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*). 6, 442-451

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

Никитина Н.В., Леонов И.К., Явдошак Л.И. Интерферогенная активность штамма ВН-3 вируса гепатита уток I типа (*Picornaviridae: Avihepatovirus: Avihepatovirus A*). 2, 162-166

ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

К 90-летию юбилею академика РАН Дмитрия Константиновича Львова.* 3, 173-181
К 90-летию академика Феликса Ивановича Ершова. 5, 390-392

НЕКРОЛОГИ

Виктор Павлович Грачёв. 4, 322
Игорь Феликсович Баринский. 4, 323-324
Ханс Дитер Кленк. 3, 233-234

Index of articles published in the journal «Problems of Virology» in 2021

REVIEWS

- Botvinkin A.D.** Bats and viruses: interdisciplinary issues.* 4, 259-268
- Dolzhiy I.V., Shcherbinin D.N., Logunov D.Yu., Gintsburg A.L.** Ebola virus (*Filoviridae: Ebolavirus: Zaire ebolavirus*): fatal adaptation mutations. 1, 7-16
- Garbuzenko D.V.** The role of antiviral therapy in the management of patients with liver cirrhosis associated with chronic HBV and HCV infection. 5, 331-339
- Isaeva O.V., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I.** Animal delta-like viruses (*Kolmioviridae: Deltavirus*) and the origin of the human hepatitis D virus (HDV). 5, 340-345
- Khafizov K.F., Petrov V.V., Krasovitsov K.V., Zolkina M.V., Akimkin V.G.** Rapid diagnostics of novel coronavirus infection by loop-mediated isothermal amplification. 1, 17-28
- 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. 2, 112-122
- Pashkov E.A., Korchevaya E.R., Faizuloev E.B., Svitich O.A., Pashkov E.P., Nechaev D.N., Zverev V.V.** Potential of application of the RNA interference phenomenon in the treatment of new coronavirus infection COVID-19. 4, 241-251
- Petrova N.V., Ganina K.K., Tarasov S.A.** Susceptibility of animal species to experimental SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) infection. 2, 103-111
- Popova O.D., Zubkova O.V., Ozharovskaia T.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Dolzhiy I.V., Shcheblyakov D.V., Naroditsky B.S., Logunov D.Yu., Gintsburg A.L.** Review of candidate vaccines for the prevention of Lassa fever 2, 91-102
- Saleeva D.V., Zasukhina G.D.** Prospects for using low-dose radiation in the complex therapy for COVID-19. 4, 252-258
- Sizikova T.E., Lebedev V.N., Borisevich S.V.** The molecular evolution of Dabie bandavirus (*Phenuiviridae: Bandavirus: Dabie bandavirus*), the agent of severe fever with thrombocytopenia syndrome. 6, 409-416
- Zainutdinov S.S., Sivolobova G.F., Loktev V.B., Kochneva G.V.** Mucosal immunity and vaccines against viral infections. 6, 399-408

ORIGINAL RESEARCHES

- Akimkin V.G., Petrov V.V., Krasovitsov K.V., Borisova N.I., Kotov I.A., Rodionova E.N., Cherkashina A.S., Kondrasheva L.Yu., Tivanova E.V., Khafizov K.F.** Molecular methods for diagnosing novel coronavirus infection: comparison of loop-mediated isothermal amplification and polymerase chain reaction.* 6, 417-424
- Alimbarova L.M., Ambrosov I.V., Matelo S.K., Barinsky I.F.** Antiviral activity of the organic germanium complex with aciclovir against the herpes simplex virus (*Herpesviridae: Alphaherpesvirinae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1/2*) in the *in vitro* and *in vivo* systems. 5, 368-382
- Borisevich G.V., Kirillova S.L., Shatokhina I.V., Lebedev V.N., Shagarova N.V., Syromyatnikova S.I., Andrus A.F., Kovalchuk E.A., Kirillov V.B., Bepalov M.L., Petrov A.A., Kovalchuk E.V., Pantyukhov V.B., Kutayev D.A., Borisevich S.V.,**

- Kuznetsov S.L.** Flow cytometry evaluation of the rhesus monkey cellular immunity following the Zaire ebolavirus (*Filoviridae: Ebolavirus: Zaire ebolavirus*) experimental infection. 4, 289-298
- Borisova N.I., Kotov I.A., Kolesnikov A.A., Kaptelova V.V., Speranskaya A.S., Kondrasheva L.Yu., Tivanova E.V., Khafizov K.F., Akimkin V.G.** Monitoring the spread of the SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) variants in the Moscow region using targeted high-throughput sequencing.* 4, 269-278
- Chepur S.V., Alekseeva I.I., Vladimirova O.O., Myasnikov V.A., Tyunin M.A., Ilinskii N.S., Nikishin A.S., Shevchenko V.A., Smirnova A.V.** Specific features of the pathology of the respiratory system in SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) infected Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). 6, 442-451
- Dogadov D.I., Korzaya L.I., Kyuregyan K.K., Karlson A.A., Mikhailov M.I.** Markers of viral hepatitis E (*Hepeviridae, Orthohepevirus, Orthohepevirus A*) in the imported Old World monkeys. 3, 182-188
- Gaidai E.A., Kryshen' K.L., Jain (Korsakova) E.A., Demchenko D.V., Kargopol'tseva D.R., Katelnikova A.E., Gaidai D.S., Balabanyan V.Yu.** Study of the specific toxic effects of the substance 1-[2-(2-benzoylphenoxy)ethyl]-6-methyluracil, the original non-nucleoside inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus 1*) reverse transcriptase. 4, 279-288
- Kalnina L.B., Selimova L.M., Kaplina E.N., Nosik D.N.** Expression of integrins $\beta 1$, $\alpha 4$ and cell adhesion molecule ICAM-1 in the presence of sodium deoxyribonucleate with ferrum complex (DNA-Na-Fe) by MT-4 cells transformed by human T-lymphotropic virus type 1 (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Deltaretrovirus: Human T-lymphotropic virus type 1*). 3, 227-232
- Korzaya L.I., Dogadov D.I., Goncharenko A.M., Karlson A.A., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I.** Prevalence of laboratory markers of human respiratory viruses in monkeys of Adler primate center. 6, 425-433
- Kostinov M.P., Zhuravlev P.I., Loktionova M.N., Shmitko A.D., Polischuk V.B., Tatarinchik A.A., Smirnova O.A., Fursov I.S.** Comparison of measles incidence in different age groups with specific humoral immunity intensity. 6,
- Kuznetsova A.I., Gromov K.B., Kireev D.E., Shlykova A.V., Lopatukhin A.E., Kazennova E.V., Lebedev A.V., Tumanov A.S., Kim K.V., Bobkova M.R.** Analysis of Tat protein characteristics in human immunodeficiency virus type 1 sub-subtype A6 (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1*)*. 6, 452-464
- Lobanova V.A., Klyukina V.I.** Optimization of rabies (*Rhabdoviridae: Lyssavirus*) dog vaccination schedule using a mathematical model.* 5, 354-367
- 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. 2, 123-128
- Marchenko V.A., Barashkova S.V., Zelinskaya I.A., Toropova Y.G., Ramsay E.S., Zhilinskaya I.N.** Modulation of endothelial factors activity in human endothelial cells in influenza A(H1N1)pdm09 virus infection. 3, 198-210
- Mazloun A., Igolkin A.S., Zinyakov N.G., van Schalkwyk A.,**

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

- Vlasova N. N.** Changes in the genome of African swine fever virus (*Asfarviridae: Asfivirus: African swine fever virus*) associated with adaptation to reproduction in continuous cell culture. 3, 211-216
- Mel'nikova O.V., Adel'shin R.V., Lopatovskaya K.V., Trushina Yu.N., Yakovchits N.V., Andaev E.I.** Biological properties and phylogenetic relationships of tick-borne encephalitis virus (*Flaviviridae, Flavivirus*) isolates of siberian subtype isolated in the south of East Siberia in modern period. 4, 310-321
- Naidenova E.V., Kartashov M.Yu., Zakharov K.S., Shevtsova A.P., Diallo M.G., Nourdine I., Bah M.B., Boumbaly S., Scherbakova S.A., Kutyrev V.V.** Study of the prevalence of antibodies to some arboviruses in the population of the Republic of Guinea.* 5, 346-353
- Novikov D.V., Melentev D.A., Mokhonov V.V., Kashnikov A.Yu., Novikova N.A., Lapin V.A., Mokhonova E.V., Novikov V.V.** Construction of norovirus (*Caliciviridae: Norovirus*) virus-like particles containing VP1 of the Echovirus 30 (*Picornaviridae: Enterovirus: Enterovirus B*). 5, 383-389
- Popova A.A., Domonova E.A., Pokrovskaya A.V., Shipulina O.Yu., Pokrovsky V.V.** Prevalence of human papillomavirus of high carcinogenic risk based on the results of screening of three anatomical locations in men, stratified by sexual behavior and HIV status. 3, 217-226
- Popova A.Y., Smirnov V.S., Ezhlova E.B., Melnikova A.A., Samoilova L.V., Lyalina L.V., Semenova E.V., Gursky M.A., Aksenova E.A., Arbuzova T.B., Totolyan A.A.** Herd immunity to SARS-COV-2 in the Novosibirsk population amid the COVID-19 pandemic. 4, 299-309
- 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. 2, 140-151
- 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. 2, 152-161
- Sorokin E.V., Tsareva T.R., Rudneva I.A., Timofeev B.I., Lyashko A.V., Balanova M.A., Artemov E.K., Grebennikova T.V., Timofeeva T.A.** Monoclonal antibodies to hemagglutinin of influenza A/H7N3 virus (*Orthomyxoviridae: Alphainfluenzavirus: Influenza A virus*). 3, 189-197
- Trifonova T.S., Moiseenko A.V., Bourkaltseva M.V., Shaburova O.V., Shaytan A.K., Krylov V.N., Sokolova O.S.** DNA mapping in the capsid of giant bacteriophage phiEL (*Caudovirales: Myoviridae: Elvirus*) by analytical electron microscopy.* 6, 434-441

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*). 2, 162-166

ANNIVERSARY DATES

- To the 90th birth anniversary of Dmitry Konstantinovich Lvov, Academician of Russian Academy of Sciences. 3, 173-181
- To the 90th birth anniversary of Felix I. Ershov, Full member of Russian Academy of Sciences. 5, 390-392

OBITUARY

- Hans-Dieter Klenk. 3, 233-234
- Igor' F. Barinsky. 4, 323-324
- Viktor P. Grachev. 4, 322

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

Problems
of Virology

Voprosy
Virusologii