



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

1

Том 67 • 2022

Volume 67 • Issue 1 • 2022

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 соответ-
ствии с правилами для авторов
(см. <https://www.virusjour.elpub.ru>).

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

Подписано в печать 28.02.2022.
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, 2022

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

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

(VOPROSY VIRUSOLOGII)

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

1

Том 67 · 2022

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)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Чвала И.А. (к.в.н.; Владимир, Россия)

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

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

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

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

Яшкульов 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 February 28, 2022.
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, 2022

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

PROBLEMS OF VIROLOGY

(VOPROSY VIROLOGII)

SCIENTIFIC THEORETICAL JOURNAL ISSUED
ONCE IN TWO MONTHS

Published since 1956

1

Volume 67 · 2022

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, 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

- Панасюк Я.В., Власенко Н.В., Чурилова Н.С., Клушкина В.В., Дубоделов Д.В., Кудрявцева Е.Н., Корабельникова М.И., Родионова З.С., Семенов Т.А., Кузин С.Н., Акимкин В.Г.**
Современные представления о роли гена X вируса гепатита В (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*) в патогенезе инфекции, вызванной вирусом гепатита В* 7
- Глотов А.Г., Глотова Т.И., Нефедченко А.В., Котенева С.В.**
Генетический полиморфизм и распространение пестивирусов (*Flaviviridae: Pestivirus*) крупного рогатого скота в мире и в Российской Федерации 18

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Костинов М.П., Журавлев П.И., Локтионова М.Н., Шмитько А.Д., Полищук В.Б., Татаринчик А.А., Смирнова О.А., Фурсов И.С.**
Сопоставление напряжённости гуморального иммунитета к кори с заболеваемостью в различных возрастных группах из числа медицинских работников г. Москвы 27
- Демин М.В., Тихомиров Д.С., Бидерман Б.В., Дроков М.Ю., Сударикиев А.Б., Туполева Т.А., Филатов Ф.П.**
Мутации в гене *UL97* цитомегаловируса (*Herpesvirales: Herpesviridae: Cytomegalovirus: Human betaherpesvirus 5*), ассоциированные с устойчивостью к ганцикловиру, у реципиентов аллогенных стволовых гемопоэтических клеток 37
- Коноплева М.В., Фельдшерова А.А., Эльгорт Д.А., Туполева Т.А., Кохановская Н.А., Панкратова В.Н., Семенов Т.А., Суслов А.П.**
Иммуноферментная идентификация escape-мутантов S143L и G145R вируса гепатита В (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*)* 48
- Бумбали С., Балде Т.А.Л., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Найденова Е.В., Валутите Д.Э., Щемелев А.Н., Зуева Е.Б., Эсауленко Е.В., Тололян Арег А.**
Распространенность маркеров вирусного гепатита В среди доноров крови в Гвинейской Республике* 59
- Морозова О.В., Новикова Н.А., Епифанова Н.В., Новиков Д.В., Мохонов В.В., Сашина Т.А., Зайцева Н.Н.**
Выявление SARS-COV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) у детей с острой кишечной инфекцией в Нижнем Новгороде за период 2020–2021 гг. 69
- Жугунисов К.Д., Мамбеталиев М.А., Азанбекова М.А., Кенжебаева М.К., Килибаев С.С., Туысканова М.С., Джапашева А.С., Омуртай А.Д., Табыс Ш.Т.**
Выделение нового штамма М-2020 вируса оспы верблюдов (*Poxviridae: Orthopoxvirus: Camel痘 virus*) в Республике Казахстан и изучение его репродукции на различных биологических системах* 77
- ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ**
К 90-летию профессора Георгия Артемьевича Галегова 87

CONTENTS

REVIEWS

- Panasiuk Ya.V., Vlasenko N.V., Churilova N.S., Klushkina V.V., Dubodelov D.V., Kudryavtseva E.N., Korabelnikova M.I., Rodionova Z.S., Semenenko T.A., Kuzin S.N., Akimkin V.G.**
Modern views on the role of X gene of the hepatitis B virus (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*) in the pathogenesis of the infection it causes* 7
- Glotov A.G., Glotova T.I., Nefedchenko A.V., Koteneva S.V.**
Genetic diversity and distribution of bovine pestiviruses (*Flaviviridae; Pestivirus*) in the world and in the Russian Federation. 18

ORIGINAL RESEARCHES

- Kostinov M.P., Zhuravlev P.I., Loktionova M.N., Shmitko A.D., Polishchuk V.B., Tatarinchik A.A., Smirnova O.A., Fursov I.S.**
Comparison of measles incidence in different age groups with the intensity of specific humoral immunity in healthcare workers in Moscow 27
- Demin M.V., Tikhomirov D.S., Biderman B.V., Drokov M.Yu., Sudarikov A. B., Tupoleva T.A., Filatov F.P.**
Mutations in the UL97 gene of cytomegalovirus (*Herpesvirales: Herpesviridae: Cytomegalovirus: Human betaherpesvirus 5*) associated with ganciclovir resistance in recipients of allogeneic hematopoietic stem cells . . . 37
- Konopleva M.V., Feldsherova A.A., Elgort D.A., Tupoleva T.A., Kokhanovskaya N.A., Pankratova V.N., Semenenko T.A., Suslov A.P.**
Identification by enzyme immunoassay of escape mutants S143L and G145R of hepatitis B virus (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*)* 48
- Boumbaly S., Balde T.A.L., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Naidenova E.V., Valutite D.E., Shchemelev A.N., Zueva E.B., Esaulenko E.V., Totolian Areg A.**
Prevalence of viral hepatitis B markers among blood donors in the Republic of Guinea* 59
- Morozova O.V., Novikova N.A., Epifanova N.V., Novikov D.V., Mokhonov V.V., Sashina T.A., Zaytseva N.N.**
Detection SARS-COV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) in children with acute intestinal infection in Nizhny Novgorod during 2020–2021 69
- Zhugunissof K.D., Mambetaliyev M.A., Azanbekova M.A., Kenzhebaeva M.K., Kilibayev S.S., Tuyskanova M.S., Dzhapasheva A.S., Omurtay A.D., Tabys Sh.T.**
Isolation of a new strain M-2020 of the camelpox virus (*Poxviridae: Orthopoxvirus: Camelpox virus*) in Republic of Kazakhstan and study of its reproduction in various biological systems* 77
- ANNIVERSARY DATES**
To the 90th birth anniversary of professor Georgy A. Galegov 87

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

ОБЗОРЫ

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-84>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Современные представления о роли гена X вируса гепатита В (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*) в патогенезе инфекции, вызванной вирусом гепатита В

Панасюк Я.В.¹, Власенко Н.В.¹, Чурилова Н.С.¹, Клушкина В.В.¹, Дубоделов Д.В.¹, Кудрявцева Е.Н.¹, Корабельникова М.И.¹, Родионова З.С.¹, Семенов Т.А.², Кузин С.Н.¹, Акимкин В.Г.¹

¹ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 111123, Москва, Россия;

²ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия

В обзоре представлена информация о роли X гена вируса гепатита В (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*) (ВГВ) и кодируемого им белка X в патогенезе вирусного гепатита В (ГВ). Рассмотрена эволюция возбудителя от первоосновы до современного варианта гепаднавирусов (*Hepadnaviridae*) как процесс, начавшийся около 407 млн лет назад и продолжающийся до настоящего времени. Обобщены результаты научных трудов зарубежных исследователей о многообразии воздействия белка X на течение инфекционного процесса и роли этой вирусной структуры в механизмах канцерогенеза. Описаны различия в характере влияния белка на течение заболевания у пациентов различных этнических групп с учётом генотипической принадлежности ВГВ. Обсуждается значение определения генетической вариативности гена X как фундаментальной характеристики вируса, имеющей значение для оценки рисков распространения гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) среди населения Российской Федерации.

Ключевые слова: вирус гепатита В (ВГВ); ген X; белок X; канцерогенез; гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК); обзор

Для цитирования: Панасюк Я.В., Власенко Н.В., Чурилова Н.С., Клушкина В.В., Дубоделов Д.В., Кудрявцева Е.Н., Корабельникова М.И., Родионова З.С., Семенов Т.А., Кузин С.Н., Акимкин В.Г. Современные представления о роли гена X вируса гепатита В (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*) в патогенезе инфекции, вызванной вирусом гепатита В. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(1): 7-17.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-84>

Для корреспонденции: Панасюк Я.В., врач-эпидемиолог лаборатории вирусных гепатитов 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: epidbsmp@mail.ru

Участие авторов. Все авторы внесли равный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.10.2021
Принята в печать 24.11.2021
Опубликована 28.02.2022

REVIEW ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-84>

Modern views on the role of X gene of the hepatitis B virus (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*) in the pathogenesis of the infection it causes

Yarina V. Panasiuk¹, Natalia V. Vlasenko¹, Nadezhda S. Churilova¹, Vitalina V. Klushkina¹, Dmitry V. Dubodelov¹, Elena N. Kudryavtseva¹, Marina I. Korabelnikova¹, Zinaida S. Rodionova¹, Tatiana A. Semenenko², Stanislav N. Kuzin¹, Vasily G. Akimkin¹

¹FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor) Moscow, 111123, Russia;

²FSBI «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

The review presents information on the role of hepatitis B virus (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*) (HBV) X gene and the protein it encodes (X protein) in the pathogenesis of viral hepatitis B. The evolution of HBV from primordial to the modern version of hepadnaviruses (*Hepadnaviridae*), is outlined as a process that began about 407 million years ago and continues to the present. The results of scientific works of foreign researchers on the variety of the influence of X protein on the infectious process and its role in the mechanisms of carcinogenesis are summarized. The differences in the effect of the X protein on the course of the disease in patients of different ethnic groups with regard to HBV genotypes are described. The significance of determining the genetic variability of X gene as a fundamental characteristic of the virus that has significance for the assessment of risks of hepatocellular carcinoma (HCC) spread among the population of the Russian Federation is discussed.

Key words: *hepatitis B virus (HBV); gene X; protein X; carcinogenesis; hepatocellular carcinoma (HCC); review*

For citation: Panasiuk Ya.V., Vlasenko N.V., Churilova N.S., Klushkina V.V., Dubodelov D.V., Kudryavtseva E.N., Korabelnikova M.I., Rodionova Z.S., Semenenko T.A., Kuzin S.N., Akimkin V.G. Modern views on the role of X gene of the hepatitis B virus (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*) in the pathogenesis of the infection it causes. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(1): 7-17.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-84>

For correspondence: Panasiuk Ya.V., Physician-Epidemiologist of the Viral Hepatitis Laboratory, Department of Molecular Diagnostics and Epidemiology, FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor) Moscow, 111123, Russia. E-mail: epidbsmp@mail.ru

Information about the authors:

Panasiuk Ya.V., <https://orcid.org/0000-0002-9335-4953>

Vlasenko N.V., <https://orcid.org/0000-0002-2388-1483>

Churilova N.S., <https://orcid.org/0000-0001-5344-5829>

Klushkina V.V., <https://orcid.org/0000-0001-8311-8204>

Dubodelov D.V., <https://orcid.org/0000-0003-3093-5731>

Kudryavtseva E.N., <https://orcid.org/0000-0002-7325-8577>

Korabelnikova M.I., <https://orcid.org/0000-0002-2575-8569>

Rodionova Z.S., <https://orcid.org/0000-0003-0401-279X>

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

Kuzin S.N., <https://orcid.org/0000-0002-0616-9777>

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

Contribution. All of the authors made an equal contribution to the research and analysis and to the preparation of the article, and read and approved the final version before publication

Funding. The research was funded by the State budget.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Received 12 October 2021

Accepted 24 November 2021

Published 28 February 2022

Введение

Вирусный гепатит В (ГВ) до настоящего времени остаётся глобальной проблемой мирового здравоохранения, что обусловлено значительным ущербом

здоровью населения многих стран мира и большим количеством летальных исходов непосредственно от этого заболевания, а также от связанных с ним

цирроза печени (ЦП) и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК). Последняя является одним из наиболее тяжёлых осложнений ГВ [1]. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), от ГВ ежегодно умирают 820 тыс. человек, из них более 650 тыс. от ЦП или ГЦК и около 130 тыс. – от острого ГВ [1, 3]. Сейчас 296 млн жителей планеты живут с хронической ВГВ-инфекцией и ежегодно инфицируются ещё 1,5 млн человек. По показателю летальности среди онкологических заболеваний в мире ГЦК занимает 3 место [2]. На сегодняшний день после первичного выявления ГЦК средняя продолжительность жизни не превышает 11 мес., а 5-летняя выживаемость составляет лишь 6,9% [3].

Развитие рака печени при хроническом гепатите В (ХГВ) с учётом крайне неблагоприятного прогноза и значительного распространения обоих заболеваний во многих странах предопределило большое внимание учёных к этой проблеме. Как показали результаты многих выполненных к настоящему моменту исследований, феномен канцерогенеза при ВГВ-инфекции обусловлен свойствами и взаимодействиями белков, кодируемых генами вируса, главным образом – взаимодействием белка X с генами-мишенями и белками клетки организма хозяина. Определение роли гена X и кодируемого им одноимённого белка в патологическом процессе, инициированном ВГВ, – одно из ведущих исследовательских направлений, реализуемых в различных странах [9–17]. Известные на сегодняшний день аминокислотные замены в X-белке детерминируют появление новых воздействий вируса на гепатоциты, не свойственных его дикому варианту, таких как инициация канцерогенеза, геномная нестабильность, формирование раковых стволовых клеток, активация репликации вируса иммунодефицита человека (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus*) (ВИЧ), ускоренное развитие канцерогенеза при микст-инфекции ХГВ и хронического вирусного гепатита С (ХГС), а также суперинфекция вирусом гепатита D (дельта) (ВГД) [9, 10, 13, 16–18].

Цель данного обзора – представление актуальной информации и обобщение результатов исследований по определению роли гена X ВГВ и кодируемого им белка в патогенезе ГВ.

Эволюция вируса гепатита В

Фундаментальные исследования, посвящённые происхождению ВГВ, привели к весьма интересным результатам, которые объясняют многие свойства вируса. Его археологический возраст определён в результате выделения этого патогена из 400-летних мумий, найденных на территории Кореи и Италии [4]. Геном ВГВ также секвенирован из останков скелетов возрастом 7 тыс. лет в Евразии [4]. В ходе проведённого скрининга вирусы семейства *Hepadnaviridae* идентифицированы у ряда различных представителей животного мира, включая обезьян-капуцинов (*Cebus*) Южной Америки, рыбу-синюгу (синца) (*Ballerus ballerus*) Северной Америки, саргана (*Ablennes*

hians) Восточного моря, австралийского окуня (латеса) (*Lates calcarifer*), тибетской лягушки (*Nanorana parkeri*), африканской цихлиды (*Cichlidae*), а также 2 видов ящериц (*Lacertilia*) [4].

Идентификация интегрированных в зародышевую линию гепаднавирусов у некоторых птиц (*Aves*) и рептилий (*Reptilia*), проведённая А. Suh и соавт., указывает на очень древнее происхождение этого семейства, прототип которого сформировался более 200 млн лет назад, что соответствует триасовому периоду мезозойской эры [21, 22]. Интеграция ДНК вируса в геном зародышевой линии птиц, вставка эндогенного вирусного элемента (еВГВ), свидетельствующая о преодолении межвидового барьера с переходом на птиц, произошла от 77 до 90 млн лет назад (меловой период мезозоя). Выстроенная Р. Revill и соавт. [4] эволюционная модель предполагает, что структурными предшественниками будущего гепаднавируса предположительно стали ретроэлементы геномов насекомых (*Insecta*), послужившие первоосновой гена полимеразы ВГВ [5]. В ходе дальнейшего эволюционного процесса этот вирус приобрёл ген *core* что подтверждено в исследовании С. Lauber и соавт. [38]. По мнению авторов работы, основанной на филогенетическом анализе и предположительной дате разделения гепаднавируса рыб (*Pisces*) (общий предок) на гепаднавирус лучепёрых (*Actinopterygii*) и лопастепёрых (*Sarcopterygii*) рыб, эволюция гепаднавируса началась свыше 437 млн лет назад, что соответствует ордовикскому периоду палеозойской эры. Ген S, также ответственный за гепатотропность вируса, сформировался в ходе его эволюционного развития в организме птиц [23, 24]. Согласно данным А. Suh и соавт. [21, 22] и F.J. van Hemert и соавт. [12], при очередном преодолении межвидового барьера (переходе от птиц к млекопитающим (*Mammalia*)), осуществлённом 25–10 тыс. лет назад, гепаднавирус приобрёл новый ген X, кодирующий соответствующий белок.

Следует отметить, что своим регуляторным функциям данный ген, вероятно, во многом обязан своему происхождению. Существует 2 теории формирования гена X. Одна из теорий описана в работе F.J. van Hemert и соавт. [12] выявили сходство белка X с ферментом клетки человека тимин-ДНК-гликозилазой (*thymine-DNA glycosylase, TDG*) – одним из ключевых участников эксцизионной репарации нуклеотидов. Авторы предположили, что ген X сформировался посредством того, что в ходе эволюции гепаднавирус «захватил» соответствующую последовательность из генома организма хозяина примерно 10 тыс. лет назад. Согласно точке зрения исследователей, ингибирование белком X инициированной TDG эксцизионной репарации нуклеотидов клеточной ДНК может быть связано с происхождением этой белковой структуры от указанного клеточного фермента. Другая теория формирования гена X предложена А. Suh и соавт. [21, 22]. В соответствии с их предположениями образование X-подобной открытой рамки считывания (*open reading frame, ORF*) могло произойти в про-

цессе эволюции путём сегментарного дублирования прекорового/корового (*precore/core*) гена ORF и последующего перекрытия части генома. Эта гипотеза базируется на том, что в геноме вирусов рода *Avihepadnaviridae* перекрываются ORF генов полимеразы и *precore/core*.

Столь продолжительная эволюция ВГВ предопределила его широкое представительство в животном мире. Принципиальным отличием *Orthohepadnaviridae* от *Avihepadnaviridae* является отсутствие у последних полноценного X-гена, и тот факт, что возникновение ГЦК в естественных условиях зафиксировано исключительно у млекопитающих, связывают с наличием гена X и активностью кодируемого им белка [16]. Вместе с тем S.F. Chang и соавт. [16] сообщили в 2001 г. об обнаружении X-подобной ORF в геноме ВГВ, инфицирующего уток (*Anatinae*), что позволило высказать предположение о продолжающейся до настоящего времени эволюции ВГВ. Результаты изучения происхождения и эволюционного развития этого вируса объяснили такие его характеристики, как значительную распространённость у разных видов животных, появление новых рекомбинантов, существование в организме в форме квазивидовой популяции и полиорганный пораженный организм хозяина, а также раскрыли причины резистентности возбудителя к противовирусной терапии.

Строение гена X вируса гепатита В

В геноме ВГВ ген X занимает позиции с 1374 по 1838 п.н. [17, 19, 20]. В то же время, по мнению A. González и соавт., к зоне данного гена следует

отнести и сайт инициации транскрипции, представляющий собой некодирующую последовательность в области от 1255 до 1374 п.н. [19]. Важной характеристикой генома ВГВ является его компактизация. Ген X частично перекрывается с геном полимеразы на участке 1374–1621 п.н., а также с *precore/core* геном в позициях 1814–1838 п.н. [17, 19, 20]. Схема организации гена X (1374–1838 п.н.), в которую включён также сайт инициации его транскрипции (1171–1361 п.н.), представлена на рисунке [20, 21].

Сайт инициации транскрипции гена X (некодирующий участок), как и его кодирующая зона (1374–1838 п.н.), содержат гиперконсервативные участки, расположенные в позициях с 1255 по 1286 и с 1563 по 1602 п.н. [19]. Наличие в области данного гена перекрывающихся последовательностей генов полимеразы, *precore/core* гена, а также многих регуляторных некодирующих последовательностей, значимых для репликации и транскрипции вирусного генома, делает эту его часть потенциально важной мишенью для терапии [19].

Структура и функции белка X вируса гепатита В

Транслируемый X-геном белок состоит из 154 а.о., имеет молекулярную массу 17 кДа и обладает транскрипционной и трансактиваторной активностью отдельных клеточных и вирусных промоторов. Структура белка X включает 2 домена: N-концевой, кодируемый 5'-областью X-гена с 1374 по 1523 п.н. (1–50 а.о.), и C-концевой, кодируемый 3'-областью с 1524 по 1838 п.н. (51–155 а.о.). Первый из них опосредует проапоптотическую функцию, в то вре-

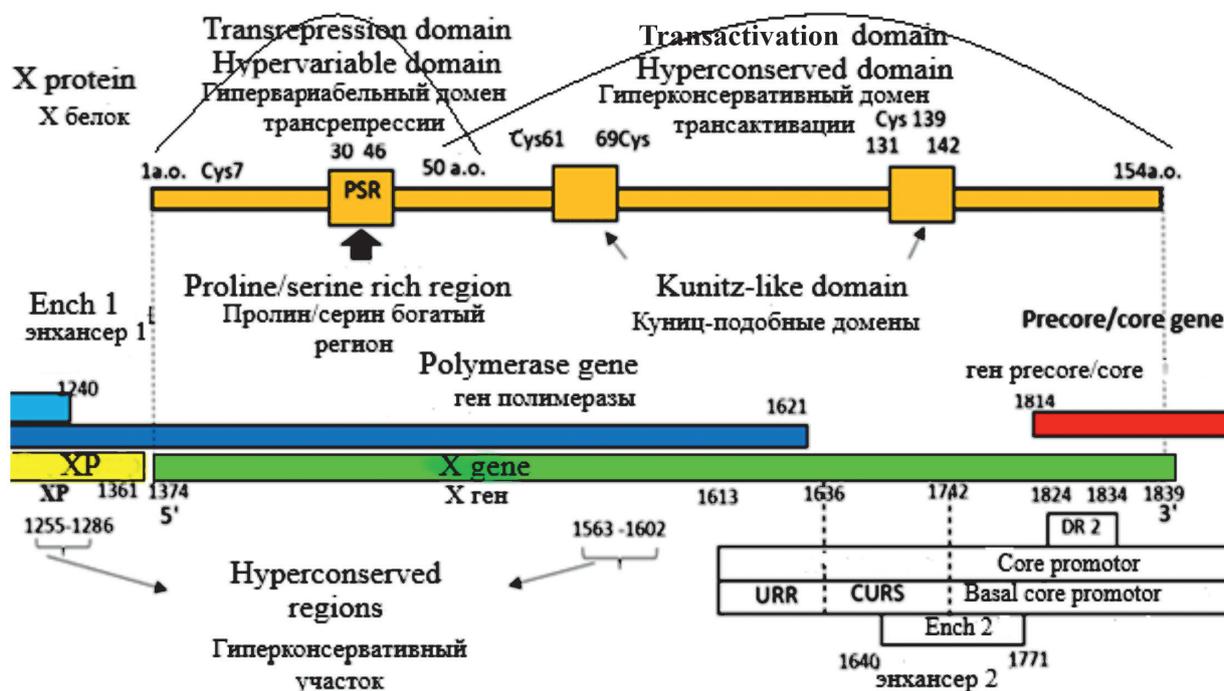


Рис. Строение гена X и транслируемого им белка X вируса гепатита В.
Fig. The structure of X gene and translated X protein of the hepatitis B virus.

мя как С-концевой ответственной за процессы трансактивации [20]. В последнее время установлено, что N-концевой домен белка по сравнению с С-концевым более вариативен, что обусловлено наличием в последнем 3 из 4 консервативных остатков аминокислот [19, 40, 49]. При этом вариативность доменов зависит от генотипа ВГВ. В N-концевом домене больше переменных аминокислотных позиций (6, 12, 26, 30, 38, 40, 42), чем в С-концевом (78, 91, 101, 102, 118, 119) [49]. В области более консервативного С-концевого домена белка находится также Куниц-подобный (Kunitz-like) домен, расположенный в 2 разъединённых позициях – с 61 по 69 и со 131 по 142 а.о. Он обладает способностью ингибировать функцию некоторых клеточных протеаз [19]. С. Prieto и соавт. [72] показали, что процесс димеризации белка X обусловлен наличием в его составе участка, богатого серином (Ser, S) и пролином (Pro, P).

Белок X, как хорошо известно сегодня, плейотропен; его влияние на инфекционный процесс весьма многообразно. W.-K. Sung и соавт. [11] определили 184 гена-мишени и 144 фактора транскрипции, с которыми может взаимодействовать данная белковая структура, однако не все эти взаимодействия к настоящему времени изучены. Плейотропность белка X зависит от его локализации (в ядре клетки или в субклеточном пространстве), определяющей взаимодействие с ядерными и цитоплазматическими факторами [42, 43]. По данным M.J. Bouchard и соавт. [13], D. Когучеуев и соавт. [43], этот белок, находясь в ядре и цитоскелете, существует около 3 ч, в цитозоле – от 15 до 20 мин. Результаты исследований L. Belloni и соавт. [42] свидетельствуют о том, что ядерная локализация белка X приводит к активации им клеточных протоонкогенов. В свою очередь, A. Ali и соавт. [44] в обзорной статье привели тот факт, что локализация белка в ядре связана с вставкой в позиции 204 нуклеотидной последовательности. При внутриядерном расположении белок X участвует в регуляции транскрипции вирусного и клеточного геномов, а также реализует свой онкогенный потенциал, регулируя экспрессию генов хозяина, взаимодействуя с компонентами базального аппарата транскрипции (RPB5, TFIIB, TBP), а также специфическими транскрипционными факторами [44]. Находясь же в цитоплазме, данный протеин ассоциируется с внешней мембраной митохондрий, изменяя проводимость анионного мембранного канала, что впоследствии ведёт к модулированию апоптоза [13, 42, 43].

Главная функция белка X – регулирование экспрессии генов вируса и клеточного генома – опосредуется несколькими механизмами: разрушением комплекса структурного поддержания хромосом Smc5/6 (в гепатоците выполняет функцию рестрикции вирусных факторов) и модификатора хроматина SETDB1, препятствующего транскрипции вирусного генома; использованием клеточных эпигенетических механизмов; активацией протоонкогенов клетки [42, 45, 48]. Высказана точка зрения о том, что способность раз-

рушать Smc5/6 приобретена белком в процессе преодоления межвидового барьера от птиц к млекопитающим и, возможно, её следует рассматривать как основную функцию этой белковой структуры [46, 47]. L. Belloni и соавт. [42] установили, что взаимодействие белка X с ацетилтрансферазами (CBP, p300, PCAF) приводит к ацетилированию клеточного и вирусного геномов, а также к активации протоонкогенов клетки и процесса транскрипции ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК) вируса. Функция опосредования белком X гиперметилирования промоторов генов-супрессоров клеточных опухолей реализуется благодаря активации им группы ферментов – ДНК-метилтрансфераз DNMT1, DNMT3A1 и DNMT3A2, в результате чего подавляется транскрипция ряда опухолевых супрессоров в клетке.

Белок X способен также активировать транскрипцию клеточных протоонкогенов и генома вируса, взаимодействуя с компонентами основного транскрипционного комплекса РНК-полимеразы II (RPB5, TFIIB, TFIIN) и специфическими факторами транскрипции (ATF/CREB, ATF3, c/EBP, NF-IL-6, Ets, Egr, SMAD4, Oct1, RXR-рецептором, p53).

Показано, что фосфорилирование Ser в позициях 155, 162 и 170 белка core запускается при участии белка X и является необходимым для поэтапной инкапсидации вирусного генома с образованием полукольцевой ДНК, способной к дальнейшей репликации. Таким образом была определена роль этого белкового образования в репликации генома ВГВ [71].

Механизмы канцерогенеза при вирусном гепатите В, ассоциированные с функционированием белка X

К настоящему времени доказана патогенетическая связь белка X и ГЦК, которая реализуется несколькими путями: посредством интеграции вирусного генома в клеточный, активации протоонкогенов, а также гиперметилирования генов-супрессоров опухолей [42, 45, 48]. В 2006 г. открыт ещё один эффект прямого канцерогенного воздействия, заключающийся в инициации некоторыми белками генома ВГВ образования раковых стволовых клеток (РСК) [62].

F. Su и соавт. [50] описали механизм канцерогенеза, связанный с проапоптотической активностью белка X. Согласно представлению исследователей, в инициации канцерогенной активности могут принимать участие не только белок X, имеющий увеличенный трансформационный потенциал как результат мутаций в нём, но и изменённые варианты данного белка с ингибированной трансформационной активностью за счёт активации проапоптотического домена [13, 50]. По мнению авторов, различные вариации изменённых белков существуют одновременно в форме квазивидов [13, 18, 50]. В экспериментах показано, что реализация проапоптотической активности белка X, проявляющаяся при ингибировании С-концевого домена (ответственного за трансформационную активность и взаимодействие белка с фактором некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor alpha, TNF-α))

приводит к активации апоптоза и естественному выживанию неопластических гепатоцитов. Последние, в свою очередь, интенсивно синтезируют митогенные ростовые факторы. Активность проапоптотической функции белка X дикого варианта вируса способствует распространению возбудителя в пределах поражённой печени. При апоптозе гепатоцитов резко возрастает продукция факторов роста печёночных клеток, которые усиливают регенерацию органа, создавая условия для диссеминации ВГВ в новые инфицированные гепатоциты [50].

Один из основных аспектов канцерогенного действия связан со способностью ВГВ интегрироваться в геном клетки организма хозяина [44, 46]. D.A. Shafritz, M.C. Kew [52] в числе первых описали взаимосвязь между такой способностью и злокачественной клеточной трансформацией. Последующие работы, выполненные различными научными группами, позволили выявить несколько опосредующих канцерогенез эффектов, ассоциированных с феноменом интеграции ВГВ. Среди них цис-опосредованный инсерционный мутагенез генов вируса и клетки хозяина; индукция хромосомной нестабильности за счёт интегрированной ДНК; экспрессия мутантных генов ВГВ из устойчивой интегрированной формы [51, 53, 54]. Результаты исследований показали, что интеграция вирусного генома в клеточный геном происходит в ранние сроки с момента инфицирования. В частности, экспериментально подтверждено, что первое слияние обоих геномов осуществляется в течение первых 30 мин после инфицирования. Сравнение частоты интеграции в поражённые ГЦК и здоровые гепатоциты продемонстрировало, что в опухолевой ткани встраивание более часто осуществляется в кодирующие геномные участки, тогда как в интактных клетках отмечена интеграция в интроны. Изменённый белок X увеличивает количество сайтов и частоту интеграционных событий посредством инициации путей передачи сигналов, направленных на повреждение генома клетки.

Интеграция в кодирующие участки приводит к экспрессии химерных онкогенных белков, при этом независимо от локализации инсерционных последовательностей отмечено усиление экспрессии клеточных генов, в которые встроились фрагменты ВГВ. Встраивание вируса в геном клеток опухолевой ткани (в отличие от здоровых гепатоцитов) происходит в повторяющиеся участки генома, результатом чего становится транскрипционная активность протоонкогенов. В ходе проведенных исследований установлено, что частота интеграционных событий коррелирует с прогрессированием и более тяжёлым течением ГВ, а также с развитием ГЦК в молодом возрасте минуя цирротическую стадию. Кроме того, продемонстрировано, что подобная интеграция имеет место как при хроническом, так и при остром течении ГВ независимо от возраста пациента [51, 53, 54].

Процесс интеграции вирусного генома сопровождается его фрагментацией, в результате чего гены X и S оказываются способными к экспрессии, нахо-

дясь рядом со своими промоторами, а гены *core* и *Pol* по причине удалённости от таковых экспрессироваться не могут [51, 53, 54]. Показано, что при встраивании гена X происходит его фрагментация с множественными разрывами нуклеотидной последовательности. Наиболее ранними сайтами интеграции ВГВ в геном человека являются ретротранспозоны SINE, THE-1B-LTR, MER-5B и LINE-2. Интеграция в ретротранспозоны может иметь результатом распространение вирусных инсерций по геному с последующим развитием ГЦК. Доказана также возможность встраивания геномных фрагментов вируса в протоонкогены: NBPF-1, PRR-16, PRKG-1, RunX1, hAT-18, DNTNP, PEB-4, FAM90, PCDH-15, lncRNA, C14orf29, а также гены, кодирующие обратную транскриптазу теломеразы человека (hTERT), миелоидного лейкоза смешанного происхождения 4 (MLL4) и ген, кодирующий циклин e1 (CCNE1) [51, 53, 54].

Важным фактором ВГВ-ассоциированного канцерогенеза служат РСК. В ряде экспериментов продемонстрирована способность белков вируса индуцировать формирование таких клеток, для которых характерны самообновление и дифференцировка по всем присутствующим в опухоли малигнизированным клеточным линиям [59–61]. В частности, установлено, что белок X активирует митогенные сигнальные каскады посредством взаимодействия с транскрипционными факторами NF-κB, AP-1, AP-2, c-EBP и ATF/CREB, что ведёт к появлению РСК. В этих же экспериментах авторы показали, что интеграция гена X и образование белка X с делецией карбокси-конца иницируют факторы транскрипции плюрипотентных стволовых клеток линий Oct4, Nanog, Klf4 – потенциальных предшественников именно РСК, а также маркеры последних, такие как EpCAM и β-катенин. Утративший карбокси-конец X-белок способен также инициировать образование подмножества маркеров CD133 указанных клеток [66–68]. CD133, известный также как AC133 или проминин-1, является антигеном клеточной поверхности РСК и в медицинской практике служит диагностическим маркером, свидетельствующим о наличии у пациента РСК и высокой вероятности формирования новообразования ряда локализаций. Его также выделяют из опухолей различных органов, включая головной мозг, толстую кишку, поджелудочную железу, простату, лёгкие и печень [83]. Положительный результат определения CD133 указывает на наличие у пациента РСК и имеет важное значение в диагностике ГЦК [59–63]. Изучение свойств ГЦК свидетельствует о том, что экспрессирующие CD133 клеточные элементы обладают более высоким пролиферативным потенциалом, чем клетки, не имеющие этого маркера [62, 63]. Помимо этого, обнаружено, что присутствие CD133 придаёт раковым клеткам устойчивость к химическому и радиоактивному воздействию, апоптозу, а также указывает на более интенсивное развитие химио- и радиоустойчивости опухоли Согласно данным Z. Li [63], цитоплазматическая экспрессия CD133 кор-

релирует с прогрессирующим течением опухолевого процесса, тогда как ядерная ассоциирована с более постепенным развитием ГЦК.

**Связь нуклеотидных замен в гене *X*
и аминокислотных замен в белке *X*
с реализацией механизмов канцерогенеза
при вирусном гепатите В**

Большое внимание уделяется проблеме влияния замен в гене *X* и кодируемом им белке на канцерогенный потенциал ВГВ. К настоящему времени выполнен ряд исследований, результаты которых указывают на значительную роль как одиночных нуклеотидных/аминокислотных замен, так и их сочетаний, при которых может формироваться синергизм. Это, в свою очередь, обуславливает более быстрое прогрессирование патологического процесса при ГВ до ЦП и ГЦК. Авторы отметили вариативность сценариев развития вызываемой ВГВ инфекции у пациентов различных этнических групп [8, 11, 16].

На сегодняшний день к наиболее изученным следует отнести 2 двойные замены 1762Т/1764А и 1764Т/1766G, а также одиночную замену 1758С [20]. Как показали Н. Kim и соавт. [20], наличие двойной замены 1762Т/1764А в гене *X* ведёт ещё к 3 смысловым нуклеотидным заменам – G1386А/С, С1653Т, Т1753V и, соответственно, к аминокислотным заменам V5M/L, H94Y, I127V в *X*-белке. Кроме того, двойная замена 1762Т/1764А часто сочетается с делецией в области С-концевого домена этого белка. Указанная двойная замена, по мнению многих исследователей, не ассоциируется с какой-либо этнической группой и повсеместно распространена у пациентов с ГЦК [8, 10–13, 16, 17, 35].

Особый интерес представляет обнаружение R. Salpini и соавт. [15] аминокислотной замены F30V в высококонсервативной области N-концевого домена белка *X*. Авторы связывают её наличие с угнетением апоптоза повреждённых клеточных элементов, что создаёт условия для развития ГЦК посредством сохранения и накопления клеток с повреждениями в геноме. Тем не менее охарактеризованная замена не связана с ускорением клеточного цикла. Малигнизация и последующее развитие ГЦК при ГВ, вызванном вирусом с изменённым белком *X*, согласно мнению исследователей, осуществляются посредством 2 независимых путей, которые могут быть реализованы одновременно, поскольку ВГВ в инфицированном организме существует, как правило, в различных генетических вариациях или, как описано выше, в квазивидах. Таким образом, один путь канцерогенеза, связанный с *X*-белком с активированным трансформационным доменом, обеспечивает клеточную опухолевую трансформацию, тогда как другой механизм, ассоциированный с этим же проапоптотически активным белком, способствует отбору неопластических клеток, продуцирующих митогенные факторы роста [5, 15, 44].

В настоящее время в научной печати появляется всё больше сообщений о том, что ВГВ способен иници-

ировать раковое поражение не только ткани печени, но и других органов, таких как поджелудочная железа, желудок, слизистая оболочка полости рта, толстая кишка. Следует отметить, что онкогенез внепечёночной локализации, по представлениям ряда авторов, связан со свойством белка *X* влиять на транскрипцию протоонкогенов клетки человека [55–58]. Работы по изучению ГВ-ассоциированных новообразований в основном посвящены таким нозологическим формам, как рак желудка и неходжкинская лимфома. Доказательством участия ВГВ в формировании рака желудка, согласно мнению P. Niedźwiedzka-Rystwej и соавт. [57], служит значительно большее количество белка *X* в опухолевой ткани органа по сравнению со здоровой.

Отдельного внимания заслуживает сообщение Н. Kim и соавт. [67] о выявлении делеции в *X*-белке в позициях с 127 по 134 а.о., ассоциированной с пониженной его секрецией и замедлением сборки вирионов. Как полагают исследователи, наличие данного генетического изменения может обусловить развитие скрытого течения ВГВ-инфекции у вакцинированных лиц. В ряде работ выявлена зависимость тяжести течения заболевания и его исхода от генотипической характеристики вируса, причём важным фактором является также этническая принадлежность больных. Так, при обследовании когорты пациентов в Северной Индии установлено, что инфицирование ВГВ генотипа А чаще приводит к хроническому ГВ, тогда как для аналогичной группы исследуемых в Испании, инфицированных этим же генотипом, зафиксирована высокая частота спонтанного вирусного клиренса [5, 6, 66]. Кроме того, имеются данные об «этнической» специфичности отдельных замен в гене *X* и транслируемом им белке ВГВ. Согласно А. Tuteja и соавт. [6], для населения Северной Индии в качестве специфичных для белка *X* отмечены следующие аминокислотные замены: V37L, L98С, E126R, V133Y, A144H, P145Q. В рамках ещё одного выполненного на территории Индии исследования к специфичным отнесены другие 5 замен аминокислот – L37I, S46P, H86P/R, L98I, T105A [70]. Специфические нуклеотидные замены обнаружены также при обследовании лиц с ГЦК в Китае и Японии, для которой расценены как связанные с этнической принадлежностью 6 замен нуклеотидов в гене *X* (1485Т, 1653Т, 1470А, 1479А, 1575G, 1719G) [64]. В обзоре W. Li и соавт. [68], посвящённом анализу генетической вариативности этого гена у пациентов из Японии и Китая с ХГВ, отмечены 5 специфических, по мнению авторов, нуклеотидных замен: 1383С, 1485Т, 1631Т, 1719Т и 1800С.

Большого внимания заслуживает также сообщение А. Tuteja и соавт. [6] относительно обнаружения межгенотипического рекомбинанта ВГВ А/Д, у которого ген *X* соответствовал генотипу Д, в то время как остальной геном – генотипу А. Исследователи считают, что такая генетическая рекомбинация ВГВ детерминирует более высокую канцерогенность и снижает эффективность применяемых противовирусных препаратов.

Необходимо отдельно отметить сложности, сопутствующие изучению влияния отдельных замен в нуклеотидной последовательности *X*-гена. Имеющиеся проблемы связаны с наличием перекрывающихся последовательностей этого гена и базового (основного, минимального) корового промотора (basal core promoter, ВСП). Изучение генетической вариабельности гена *X* связано с необходимостью проведения генетической диссекции, поскольку замены в перекрывающейся последовательности приводят к мутациям областей в данном гене и ВСП [65]. Последний является регуляторной последовательностью вирусного генома, инициирующей транскрипцию прекоровой (precore) и прегеномной РНК (пгРНК). В рамках определения влияния замены в *X*-гене на усиление синтеза пгРНК, и, следовательно, репликации генома ВГВ, осуществлена диссекция ВСП и гена *X*. Это позволило установить, что усиление репликации вирус-

ного генома опосредовано изменением ВСП, а не гена *X* [65].

Обобщённые результаты поиска в литературе информации о нуклеотидных заменах в гене *X* и аминокислотных заменах в кодируемом им белке, ассоциированных с развитием ГЦК, представлены в **таблице**.

Влияние белка X на течение и исходы вирусного гепатита В при дельта-инфекции и микст-инфекции с вирусом иммунодефицита человека

Изучение эволюции инфекционного процесса, вызванного ВГВ и ВГД, позволило как при ко-, так и при суперинфекции выявить закономерное снижение репликации ДНК первого из них [10]. Авторы данного исследования, выполненного на группе пациентов в Испании, объясняют подобный эффект взаимодействием клеточной РНК-полимеразы II, необходи-

Таблица. Нуклеотидные замены в гене X и аминокислотные замены в белке X, описанные в литературе

Table. Nucleotide substitutions in X gene and amino acid substitutions in X protein available in the publications

Нуклеотидные замены в гене X Nucleotide substitutions in X gene	Аминокислотные замены в белке X Amino acid substitutions in X protein	Этническая принадлежность пациента Patient ethnicity	Источник References
1762 (T), 1764 (A)	K130M/V131I	Корея, Саудовская Аравия, Китай Korea, Saudi Arabia, China	[44]
G1386A/C	V5M/L	Корея, Китай Korea, China	[20]
C1653T	H94Y	Корея, Китай, Япония Korea, China, Japan	[20]
T1753V	I127V	Китай China	[20]
	X8Del	Корея Korea	[20]
	I127T/K130M/V131L	Саудовская Аравия Saudi Arabia	[13]
	K130M/V131I/ F132Y	Саудовская Аравия Saudi Arabia	[13]
G1727, C1741, C1761, T1773, T1773/G1775, T1673/G1679, A1757/T1764/G1766	F30V	Саудовская Аравия Saudi Arabia	[13]
1485T, 1653T, 1470A, 1479A, 1575G, 1719G		Франция, Италия France, Italy	[15]
T1674C/G, T1753V, T1768A, C1773T		Япония Japan	[20]
A1383C, C1485T, C1631T, G1719T, T1800C		Китай China	[20]
	V37L, L98C, E126R, V133Y, A144H, P145Q	Япония, Китай, Корея Japan, China, Korea	[20]
	L37I, S46P, H86P/R, L98I, T105A	Северная Индия Northern India	[6]
		Индонезия Indonesia	[70]
Вставка 204AGGCC в сочетании с заменами G260A и G/C/T 264A Insert 204AGGCC in combination with G260A and G/C/T264A replacements		–	[44]
	Делеция 14 аминокислот в COOH-домене Deletion of 14 amino acids in the COOH domain	–	[44]

Примечание. «←» – отсутствие данных.

Note. «←», no data available.

мой для репликации генома ВГВ, с антигеном ВГД L-HDAg (так называемым большим – *англ.* large), а также активацией клеточного противовирусного белка МхА. L-HDAg, воздействуя на энхансер 2 ВГВ, индуцирует нуклеотидные замены в гене *X*, которые, транслируясь на белок *X*, ингибируют процесс репликации генома ВГВ. В качестве общей закономерности исследователи отмечают, что при дельта-инфекции возрастает общее количество нуклеотидных замен в геноме ВГВ. Важно отметить, что при вирусном гепатите D нуклеотидные замены локализуются в области 1255–1611 п.н., частично включающей сайт инициации транскрипции гена *X* и непосредственно этот ген. Согласно точке зрения авторов, повышенная генетическая вариабельность указанного региона генома ВГВ связана с влиянием врождённого иммунитета и/или взаимодействием L-HDAg с РНК-полимеразой II. В работе Т. Goto и соавт. [73], также посвящённой взаимодействию L-HDAg ВГД с *X*-белком, показана активация клеточных белков – трансформирующего фактора роста бета (transforming growth factor beta, TGF-β) и активирующего белка 1 (транскрипционного фактора) (activating protein 1, AP-1). Эти белки выполняют роль регуляторов пролиферации, клеточной дифференцировки и других процессов, связываясь с белками SMAD3 и STAT3, а также иницируя сигнальный путь c-Jun, который активирует скрытую форму TGF-β, и непосредственно фосфорилирующего SMAD3. Совокупность этих процессов ведёт к усилению трансляции профибротических молекул. Результатом описанных взаимодействий, по представлению авторов исследования, является развитие у пациентов фиброза печени. Кроме того, взаимодействие L-HDAg ВГД и белка *X* приводит к активации клеточного фактора SRF который является важным промотормым и регуляторным элементом, обуславливающим увеличение продукции ростовых факторов и белков протоонкогенов.

Нынешнюю эпидемиологическую ситуацию по ГВ и ВИЧ-инфекции в мире специалисты характеризуют как эпидемию с перманентно возрастающим числом вовлечённых лиц. При общности путей передачи обоих возбудителей в настоящее время часто регистрируются микст-инфекции ГВ + ВИЧ. Важно отметить, что к настоящему моменту доказано взаимовлияние этих заболеваний, включающее роль белка *X* в изменении течения ВИЧ-инфекции. Как продемонстрировали М. Gómez-Gonzalo и соавт. [18], при ГВ/ВИЧ-микст-инфекции происходит блокада клеточных белков АРОВЕС3G, обладающих противовирусным эффектом, с последующей активацией репликации РНК ВИЧ. В основе этого эффекта лежит способность белка *X* индуцировать непрерывную репликацию генома ВИЧ-1 и транскрипцию длинных концевых повторов (long terminal repeats, LTRs) РНК данного вируса посредством взаимодействия с его белком Tat и сигналами активации Т-клеток. Активация репликации генома ВИЧ-1 происходит в результате связывания белка *X* с сайтом Sp1 LTRs ВИЧ-1 и при взаимодействии белков *X* ВГВ и Tat ВИЧ-1.

Процесс репликации последнего инициируется также посредством активации *X*-белком семейства клеточных протеинов NF-κB и NF-AT. Показано, что способность активировать репликацию РНК ВИЧ-1 связана с заменами в С-концевом домене *X*-белка, локализованными в пределах от 57 до 104 а.о.

Заключение

Выполненный обзор научных публикаций, затрагивающих вопросы определения воздействия гена *X* и транслируемого им белка на течение ВГВ-инфекции, позволяет констатировать, что с этими структурами связаны 3 основных направления влияния, каждое из которых характеризуется многообразием используемых механизмов. Во-первых, ген *X* обеспечивает интеграцию ВГВ в геном клетки хозяина. Во-вторых, белок *X* с помощью прямых и опосредованных механизмов регулирует транскрипцию ДНК ВГВ. В-третьих, этот белок является главным фактором, иницирующим множество механизмов канцерогенеза. Как показывает анализ литературы, большое внимание специалисты уделяют изучению влияния различных нуклеотидных замен в гене *X* и соответствующих им аминокислотных замен в одноимённом белке на течение вызываемой ВГВ инфекции и развитие таких её осложнений, как ЦП и ГЦК.

Обращает на себя внимание существенное преобладание работ по данной тематике, выполненных в таких странах, как КНР, Республика Корея, Япония, Индия, что можно объяснить крайне высокой актуальностью проблемы ГВ для этих стран. В Российской Федерации данные о генетической вариабельности отдельных генов ВГВ практически отсутствуют, за исключением отдельных работ, посвящённых определению гетерогенности гена *S* и транслируемого им белка. Принимая во внимание то обстоятельство, что этническая принадлежность пациентов, как это следует из приведённых выше публикаций, является важным фактором, влияющим на развитие индуцированного ВГВ инфекционного процесса и его осложнений, становится очевидной необходимость проведения таких исследований в РФ с учётом многонационального характера её населения.

Результаты определения генетической вариабельности ВГВ имеют как фундаментальное, так и прикладное значение. Новая информация о генетическом многообразии ВГВ и вызываемых ими вариантах течения ВГВ-инфекции весьма важна с точки зрения оценки и прогноза общей эпидемиологической ситуации, а также определения эффективности противоэпидемических мероприятий в стране исследования. Определение замен в отдельных генах вируса может быть использовано для формирования персонализированного подхода к тактике ведения пациентов. Необходимо подчеркнуть, что критический дефицит подобной информации в отечественной научно-медицинской практике существенно ограничивает имеющиеся современные представления о масштабности проблем, связанных с ГВ, и диктует необходимость дальнейших научных изысканий.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- WHO. Hepatitis B: Fact sheet. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b> (accessed November 29, 2021).
- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2020; 71(3): 209–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Ющук Н.Д., Климова Е.А., Знойко О.О., Кареткина Г.Н., Максимов С.Л., Маев И.В. *Вирусные гепатиты: клиника, диагностика, лечение*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2014.
Yushchuk N.D., Klimova E.A., Znoyko O.O., Karetkina G.N., Maksimov S.L., Maev I.V. *Viral Hepatitis: Clinic, Diagnosis, Treatment [Virusnye gepatity: klinika, diagnostika, lechenie]*. Moscow: GEOTAR-Media; 2014 (in Russian).
- Revoll P.A., Tu T., Netter H.J., Yuen L.K.W., Locarnini S.A., Littlejohn M. The evolution and clinical impact of hepatitis B virus genome diversity. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2020; 17(10): 618–34. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0296-6>
- Datta S. An overview of molecular epidemiology of hepatitis B virus (HBV) in India. *Virol. J.* 2008; 5: 156. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-156>
- Tuteja A., Siddiqui A.B., Madan K., Goyal R., Shalimar, Sreenivas V., et al. Mutation profiling of the hepatitis B virus strains circulating in North Indian population. *PLoS One.* 2014; 9(3): e91150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091150>
- Tarocchi M., Polvani S., Marroncini G., Galli A. Molecular mechanism of hepatitis B virus-induced hepatocarcinogenesis. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20(33): 11630–40. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i33.11630>
- Levrero M., Zucman-Rossi J. Mechanisms of HBV-induced hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* 2016; 64(1 Suppl.): S84–101. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.02.021>
- Lau K.C.K., Burak K.W., Coffin C.S. Impact of hepatitis B virus genetic variation, integration, and lymphotropism in antiviral treatment and oncogenesis. *Microorganisms.* 2020; 8(10): 1470. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101470>
- Godoy C., Taberner D., Sopena S., Gregori J., Cortese M.F., González C., et al. Characterization of hepatitis B virus X gene quasispecies complexity in mono-infection and hepatitis delta virus superinfection. *World J. Gastroenterol.* 2019; 25(13): 1566–79. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i13.1566>
- Sung W.K., Lu Y., Lee C.W.H., Zhang D., Ronaghi M., Lee C.G.L. Deregulated direct targets of the hepatitis B virus (HBV) protein, HBx, identified through chromatin immunoprecipitation and expression microarray profiling. *J. Biol. Chem.* 2009; 284(33): 21941–54. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.014563>
- van Hemert F.J., van de Klundert M.A.A., Lukashov V.V., Kootstra N.A., Berkhout B., Zaaijer H.L., et al. Protein X of hepatitis B virus: origin and structure similarity with the central domain of DNA glycosylase. *PLoS One.* 2011; 6(8): e23392. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023392>
- Al-Qahtani A.A., Al-Anazi M.R., Nazir N., Ghai R., Abdo A.A., Sanaï F.M., et al. Hepatitis B virus (HBV) X gene mutations and their association with liver disease progression in HBV-infected patients. *Oncotarget.* 2017; 8(62): 105115–25. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22428>
- Rahmani Z., Huh K.W., Lasher R., Siddiqui A. Hepatitis B virus X protein colocalizes to mitochondria with a human voltage-dependent anion channel, HVDAC3, and alters its transmembrane potential. *J. Virol.* 2000; 74(6): 2840–6. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.6.2840-2846.2000>
- Salpini R., Surdo M., Cortese M.F., Palumbo G.A., Carioti L., Cappiello G., et al. The novel HBx mutation F30V correlates with hepatocellular carcinoma *in vivo*, reduces hepatitis B virus replicative efficiency and enhances anti-apoptotic activity of HBx N terminus *in vitro*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2019; 25(7): 906.e1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.017>
- Chang S.F., Netter H.J., Hildt E., Schuster R., Schaefer S., Hsu Y.C., et al. Duck hepatitis B virus expresses a regulatory HBx-like protein from a hidden open reading frame. *J. Virol.* 2001; 75(1): 161–70. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.1.161-170.2001>
- Bouchard M.J., Schneider R.J. The enigmatic X gene of hepatitis B virus. *J. Virol.* 2004; 78(23): 12725–34. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.23.12725-12734.2004>
- Gómez-Gonzalo M., Carretero M., Rullas J., Lara-Pezzi E., Aramburu J., Berkhout B., et al. The hepatitis B virus X protein induces HIV-1 replication and transcription in synergy with T-cell activation signals: functional roles of NF-κB/NF-AT and SP1-binding sites in the HIV-1 long terminal repeat promoter. *J. Biol. Chem.* 2001; 276(38): 35435–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103020200>
- González C., Taberner D., Cortese M.F., Gregori J., Casillas R., Riveiro-Barciela M., et al. Detection of hyper-conserved regions in hepatitis B virus X gene potentially useful for gene therapy. *World J. Gastroenterol.* 2018; 24(19): 2095–107. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i19.2095>
- Kim H., Lee S.A., Kim B.J. X region mutations of hepatitis B virus related to clinical severity. *World J. Gastroenterol.* 2016; 22(24): 5467–78. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i24.5467>
- Sunzález C., Brosius J., Schmitz J., Krieger M.F., Gregori J. The genome of a Mesozoic paleovirus reveals the evolution of hepatitis B viruses. *Nat. Commun.* 2013; 4: 1791. <https://doi.org/10.1038/ncomms2798>
- Suh A., Weber C.C., Kehlmaier C., Braun E.L., Green R.E., Fritz U., et al. Early Mesozoic Coexistence of Amniotes and Hepadnaviridae. *PLoS Genet.* 2014; 10(12): e1004559. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004559>
- Lauber C., Seitz S., Mattei S., Suh A., Beck J., Herstein J., et al. Deciphering the origin and evolution of hepatitis B viruses by means of a family of non-enveloped fish viruses. *Cell Host Microbe.* 2017; 22(3): 387–99.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.0192>
- Pesavento P.A., Jackson K., Scase T., Tse T., Hampson B., Munday J.S., et al. A novel hepadnavirus is associated with chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma in cats. *Viruses.* 2019; 11(10): 969. <https://doi.org/10.3390/v11100969>
- Bonvicino C.R., Moreira M.A., Soares M.A. Hepatitis B virus lineages in mammalian hosts: potential for bidirectional cross-species transmission. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20(24): 7665–74. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i24.7665>
- Hu X., Javadian A., Gagneux P., Robertson B.H. Paired chimpanzee hepatitis B virus (ChHBV) and mtDNA sequences suggest different ChHBV genetic variants are found in geographically distinct chimpanzee subspecies. *Virus. Res.* 2001; 79(1-2): 103–8. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(01\)00334-3](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(01)00334-3)
- He B., Fan Q., Yang F., Hu T., Qiu W., Feng Y., et al. Hepatitis virus in long-fingered bats, Myanmar. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(4): 638–40. <https://doi.org/10.3201/eid1904.121655>
- Li W., She R., Liu L., You H., Yin J. Prevalence of a virus similar to human hepatitis B virus in swine. *Virol. J.* 2010; 7: 60. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-60>
- Sa-Nguanmoo P., Rianthavorn P., Amornsawadwattana S., Poovorawan Y. Hepatitis B virus infection in non-human primates. *Acta Virol.* 2009; 53(2): 73–82. https://doi.org/10.4149/av_2009_02_73
- Lanford R.E., Chavez D., Brasky K.M., Burns R.B. III, Rico-Hesse R. Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1998; 95(10): 5757–61. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.10.5757>
- Tian J., Xia K., She R., Li W., Ding Y., Wang J., et al. Detection of Hepatitis B virus in serum and liver of chickens. *Virol. J.* 2012; 9: 2. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-2>
- Summers J., Smolec J.M., Snyder R. A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1978; 75(9): 4533–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.75.9.4533>
- Mason W.S., Seal G., Summers J. Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virol.* 1980; 36(3): 829–36. <https://doi.org/10.1128/JVI.36.3.829-836.1980>
- Sprengel R., Kaleta E.F., Will H. Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons. *J. Virol.* 1988; 62(10): 3832–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.62.10.3832-3839.1988>
- Chang S.F., Netter H.J., Bruns M., Schneider R., Frölich K., Will H. A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA. *Virology.* 1999; 262(1): 39–54. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9844>
- Pult I., Netter H.J., Bruns M., Prassolov A., Sirma H., Hohenberg H., et al. Identification and analysis of a new hepadnavirus in white storks. *Virology.* 2001; 289(1): 114–28. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1115>

37. Prassolov A., Hohenberg H., Kalinina T., Schneider C., Cova L., Krone O., et al. New hepatitis B virus of cranes that has an unexpected broad host range. *J. Virol.* 2003; 77(3): 1964–76. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.3.1964-1976.2003>
38. Lauber C., Seitz S., Mattei S., Suh A., Beck J., Herstein J., et al. Deciphering the origin and evolution of hepatitis B viruses by means of a family of non-enveloped fish viruses. *Cell Host Microbe.* 2017; 22(3): 387–99.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.07.0192>
39. Meier A., Mehrle S., Weiss T.S., Mier W., Urban S. Myristoylated PreS1-domain of the hepatitis B virus L-protein mediates specific binding to differentiated hepatocytes. *Hepatology.* 2013; 58(1): 31–42. <https://doi.org/10.1002/hep.26181>
40. Kumar V., Jayasuryan N., Kumar R. A truncated mutant (residues 58–140) of the hepatitis B virus X protein retains transactivation function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1996; 93(11): 5647–52. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5647>
41. Qadri I., Maguire H.F., Siddiqui A. Hepatitis B virus transactivator protein X interacts with the TATA-binding protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1995; 92(4): 1003–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.1003>
42. Belloni L., Pollicino T., De Nicola F., Guerrieri F., Raffa G., Fanciulli M., et al. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2009; 106(47): 19975–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908365106>
43. Kornyevev D., Ramakrishnan D., Voitenleitner C., Livingston C.M., Xing W., Hung M., et al. Spatiotemporal analysis of hepatitis B virus X protein in primary human hepatocytes. *J. Virol.* 2019; 93(16): e00248-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.00248-19>
44. Ali A., Abdel-Hafiz H., Suhail M., Al-Mars A., Zakaria M.K., Fatima K., et al. Hepatitis B virus, HBx mutants and their role in hepatocellular carcinoma. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20(30): 10238–48. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i30.10238>
45. Taylor E.M., Moghraby J.S., Lees J.H., Smit B., Moens P.B., Lehmann A.R. Characterization of a novel human SMC heterodimer homologous to the *Schizosaccharomyces pombe* Rad18/Spr18 complex. *Mol. Biol. Cell.* 2001; 12(6): 1583–94. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.6.1583>
46. Murphy C.M., Xu Y., Li F., Nio K., Reszka-Blanco N., Li X., et al. Hepatitis B virus X protein promotes degradation of SMC5/6 to enhance HBV replication. *Cell Rep.* 2016; 16(11): 2846–54. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.026>
47. Abdul F., Filleton F., Gerossier L., Paturel A., Hall J., Strubin M., et al. Smc5/6 Antagonism by HBx Is an Evolutionarily Conserved Function of Hepatitis B Virus Infection in Mammals. *J. Virol.* 2018; 92(16): e00769-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00769-18>
48. Rivière L., Gerossier L., Ducroux A., Dion S., Deng Q., Michel M.L., et al. HBx relieves chromatin-mediated transcriptional repression of hepatitis B viral cccDNA involving SETDB1 histone methyltransferase. *J. Hepatol.* 2015; 63(5): 1093–102. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.06.023>
49. Datta S., Banerjee A., Chandra P.K., Biswas A., Panigrahi R., Mahapatra P.K., et al. Analysis of hepatitis B virus X gene phylogeny, genetic variability and its impact on pathogenesis: Implications in Eastern Indian HBV carriers. *Virology.* 2008; 382(2): 190–8. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.09.007>
50. Su F., Schneider R.J. Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptotic killing by tumor necrosis factor alpha. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1997; 94(16): 8744–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8744>
51. Sung W.K. Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma. *Nat. Genet.* 2012; 44(7): 765–9. <https://doi.org/10.1038/ng.2295>
52. Shafritz D.A., Kew M.C. Identification of integrated hepatitis B virus DNA sequences in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology.* 1981; 1(1): 1–8. <https://doi.org/10.1002/hep.1840010102>
53. Chauhan R., Michalak T.I. Earliest hepatitis B virus-hepatocyte genome integration: sites, mechanism, and significance in carcinogenesis. *Hepatology Res.* 2021; 7: 20. <http://doi.org/10.20517/2394-5079.2020.136>
54. Zhang X., You X., Li N., Zhang W., Gagos S., Wang Q. Involvement of hepatitis B virus X gene (HBx) integration in hepatocarcinogenesis via a recombination of HBx/Alu core sequence/subtelomeric DNA. *FEBS Lett.* 2012; 586(19): 3215–21. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.06.039>
55. Wang Y., Wang H., Pan S., Hu T., Shen J., Zheng H., et al. Capable infection of hepatitis B virus in diffuse large B-cell lymphoma. *J. Cancer.* 2018; 9(9): 1575–81. <https://doi.org/10.7150/jca.24384>
56. Baghbanian M., Hoseini Mousa S.A., Doosti M., Moghimi M. Association between gastric pathology and hepatitis B virus infection in patients with or without *Helicobacter pylori*. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2019; 20(7): 2177–80. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.7.2177>
57. Niedzwiedzka-Rystwejt P., Grywalska E., Hryniewicz R., Wołaczewicz M., Becht R., Roliński J. The double-edged sword role of viruses in gastric cancer. *Cancers (Basel).* 2020; 12(6): 1680. <https://doi.org/10.3390/cancers12061680>
58. Tagieva N.E., Gizatullin R.Z., Zakharyev V.M., Kisselev L.L. A genome-integrated hepatitis B virus DNA in human neuroblastoma. *Gene.* 1995; 152(2): 277–8. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)00665-f](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)00665-f)
59. Schulte L.A., López-Gil J.C., Sainz B. Jr., Hermann P.C. The cancer stem cell in hepatocellular carcinoma. *Cancers (Basel).* 2020; 12(3): 684. <https://doi.org/10.3390/cancers12030684>
60. Sukowati C.H.C., Reyes P.A.C., Tell G., Tiribelli C. Oncogenicity of viral hepatitis B and C in the initiation of hepatic cancer stem cells. *Hepatology Res.* 2019; 5: 2. <https://doi.org/10.20517/2394-5079.2018.106>
61. Mani S.K.K., Andrisani O. Hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma and hepatic cancer stem cells. *Genes (Basel).* 2018; 9(3): 137. <https://doi.org/10.3390/genes9030137>
62. Suetsugu A., Nagaki M., Aoki H., Motohashi T., Kunisada T., Moriwaki H. Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006; 351(4): 820–4. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.128>
63. Li Z. CD133: a stem cell biomarker and beyond. *Exp. Hematol. Oncol.* 2013; 2(1): 17. <https://doi.org/10.1186/2162-3619-2-17>
64. Hagiwara S., Nishida N., Park A., Kameda Y., Sakurai T., Watanabe T., et al. Contribution of C1485T mutation in the HBx gene to human and murine hepatocarcinogenesis. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 10440. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10570-0>
65. Hussain Z., Jung H.S., Ryu D.K., Ryu W.S. Genetic dissection of naturally occurring basal core promoter mutations of hepatitis B virus reveals a silent phenotype in the overlapping X gene. *J. Gen. Virol.* 2009; 90(Pt. 9): 2272–81. <https://doi.org/10.1099/vir.0.010421-0>
66. Sánchez-Tapias J.M., Costa J., Mas A., Bruguera M., Rodés J. Influence of hepatitis B virus genotype on the long-term outcome of chronic hepatitis B in western patients. *Gastroenterology.* 2002; 123(6): 184–56. <https://doi.org/10.1053/gast.2002.37041>
67. Kim H., Gong J.R., Lee S.A., Kim B.J. Discovery of a novel mutation (X8Del) resulting in an 8-bp deletion in the hepatitis B virus X gene associated with occult infection in Korean vaccinated individuals. *PLoS One.* 2015; 10(10): e0139551. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139551>
68. Li W., Goto K., Matsubara Y., Ito S., Muroyama R., Li Q., et al. The characteristic changes in hepatitis B virus X region for hepatocellular carcinoma: a comprehensive analysis based on global data. *PLoS One.* 2015; 10(5): e0125555. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125555>
69. Kurbanov F., Tanaka Y., Fujiwara K., Sugauchi F., Mbanya D., Zekeng L., et al. A new subtype (subgenotype) Ac (A3) of hepatitis B virus and recombination between genotypes A and E in Cameroon. *J. Gen. Virol.* 2005; 86(Pt. 7): 2047–56. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80922-0>
70. Wungu C.D.K., Amin M., Ruslan S.E.N., Purwono P.B., Kholili U., Maimunah U., et al. Association between host TNF- α , TGF- β 1, p53 polymorphisms, HBV X gene mutation, HBV viral load and the progression of HBV-associated chronic liver disease in Indonesian patients. *Biomed. Rep.* 2019; 11(4): 145–53. <https://doi.org/10.3892/br.2019.1239>
71. Melegari M., Wolf S.K., Schneider R.J. Hepatitis B virus DNA replication is coordinated by core protein serine phosphorylation and HBx expression. *J. Virol.* 2005; 79(15): 9810–20. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.15.9810-9820.2005>
72. Prieto C., Montecinos J., Jiménez G., Riquelme C., Garrido D., Hernández S., et al. Phosphorylation of phylogenetically conserved amino acid residues confines HBx within different cell compartments of human hepatocarcinoma cells. *Molecules.* 2021; 26(5): 1254. <https://doi.org/10.3390/molecules26051254>
73. Goto T., Kato N., Ono-Nita S.K., Yoshida H., Otsuka M., Shiratori Y., et al. Large isoform of hepatitis delta antigen activates serum response factor-associated transcription. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(48): 37311–6. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002947200>

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-96>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Генетический полиморфизм и распространение пестивирусов (*Flaviviridae: Pestivirus*) крупного рогатого скота в мире и в Российской Федерации

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

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

Род *Pestivirus* семейства *Flaviviridae* включает 11 видов. Пестивирусы крупного рогатого скота (КРС) являются возбудителями вирусной диареи – болезни слизистых (ВД – БС), широко распространённой среди этих животных, и включают 3 генетически различающиеся вида: пестивирус А (bovine viral diarrhoea virus 1, BVDV-1), В (BVDV-2) и Н (BVDV-3, HoBiPeV). Число субтипов BVDV-1 составляет 21, BVDV-2 – 4 и BVDV-3 – 4. Наличие полиморфизма вирусов затрудняет диагностику вызываемых ими заболеваний, снижает эффективность вакцинации и контрольных программ.

Для поиска научных статей использовали базы данных PubMed, MedLine, Web of Science, Scopus, eLIBRARY.RU за 2000–2021 гг.

Пестивирус А (BVDV-1) характеризуется повсеместным распространением, но чаще регистрируется в странах Европы. Наибольшее количество его субтипов выявлено у КРС в Италии и Китайской Народной Республике (КНР). Вирус широко распространён в Центральном регионе РФ (субтипы 1а и 1м). На территории Сибири среди аборигенных и импортированных животных циркулируют 11 субтипов BVDV-1: 1а (5%), 1b (35%), 1с (5%), 1d (10%), 1f (20%), 1g, 1i (по 2,5%), 1j, 1к, 1р и 1г (по 5%). Пестивирус В (BVDV-2) более вирулентный, встречается реже, преимущественно в Соединённых Штатах Америки (США), Канаде, Бразилии, Аргентине, Уругвае, некоторых странах Европы: Федеративной Республике Германия (ФРГ), Словакии, Италии и Азии (Южная Корея, Япония и Монголия). В Сибирском регионе выявлены 3 его субтипа: 2а (25%), 2b (10%) и 2с (5%). Пестивирус Н (BVDV-3) циркулирует на территории Европы, Азии и Южной Америки. Основным путём заноса для этого возбудителя служат контаминированные биологические препараты. В России BVDV-3 итапо-бразильской группы (3а) выявлен в 7 лотах эмбриональной сыворотки.

Установлена роль пестивирусов в возникновении респираторных болезней телят, абортос, системных инфекций и энтеритов как у телят, так и у взрослых животных. Источником инфицирования в подобных случаях является контаминированная живая вакцина.

Ключевые слова: обзор; пестивирусы; крупный рогатый скот (КРС); вирусная диарея; генетический полиморфизм; виды; субтипы; распространение

Для цитирования: Глотов А.Г., Глотова Т.И., Нефедченко А.В., Котенева С.В. Генетический полиморфизм и распространение пестивирусов (*Flaviviridae: Pestivirus*) крупного рогатого скота в мире и в Российской Федерации. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(1): 18-26. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-96>

Для корреспонденции: Глотов Александр Гаврилович, д-р вет. наук, профессор, главный научный сотрудник – заведующий лабораторией биотехнологии, диагностический центр ФГБУН Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий (СФНЦА) РАН, Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, 630501, Новосибирская область, Новосибирский р-н, пос. Краснообск, Россия. E-mail: glotov_vet@mail.ru

Участие авторов: Глотов А.Г. – анализ литературы, написание текста, утверждение окончательного варианта статьи, общее руководство; Глотова Т.И. – анализ литературы, редактирование статьи; Нефедченко А.В. – анализ литературы, утверждение окончательного варианта статьи; Котенева С.В. – анализ литературы.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 02.12.2021
Принята в печать 27.01.2022
Опубликована 28.02.2022

REVIEW ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-96>

Genetic diversity and distribution of bovine pestiviruses (*Flaviviridae: Pestivirus*) in the world and in the Russian Federation

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

FSBIS Siberian Federal Scientific Center for Agrobiotechnologies of the Russian Academy of Sciences, Institute of Experimental Veterinary Medicine of Siberia and the Far East, 630501, Novosibirsk Region, Novosibirsky district, Krasnoobsk vill., Russia

The genus *Pestivirus* of the family *Flaviviridae* includes 11 species. Bovine pestiviruses are the causative agents of viral diarrhea/mucosal disease and include three genetically distinct species: pestivirus A (BVDV-1), B (BVDV-2), and H (BVDV-3). The number of BVDV-1 subtypes is 21, BVDV-2 – 4, and BVDV-3 – 4, which complicates the diagnosis of associated diseases, reduces the effectiveness of vaccination and control programs.

We performed the search in the PubMed, Web of Science, Scopus, eLIBRARY.RU databases for articles published in 2000–2021.

Pestivirus A is distributed everywhere, although the largest number of subtypes was found in cattle in Italy and China. The virus is widespread in the Central region of the Russia (subtypes 1a and 1m). In Siberia, eleven subtypes circulate among native and imported animals: 1a (5%), 1b (35%), 1c (5%), 1d (10%), 1f (20%), 1g, 1i (both 2.5%), 1j, 1k, 1p, and 1r (all for 5%). Pestivirus B subtype is more virulent, found less frequently and mainly in the North and South America, in some European countries, and in Asia. Three subtypes have been identified in Siberia: 2a (25%), 2b (10%), and 2c (5%). Pestivirus H circulates in Europe, Asia and South America. The main route of entry is contaminated biological products. In Russia, BVDV-3 of the Italian-Brazilian group (3a) was detected in 7 lots of fetal bovine serum.

The role of the virus in the occurrence of respiratory diseases in calves, abortion, systemic infection and enteritis in calves and adult animals has been established. The source of the virus in such cases was a contaminated modified live vaccine.

Keywords: *pestiviruses; bovine viral diarrhea/mucosal disease; genetic polymorphism; species; subtypes; spread*

For citation: Glotov A.G., Glotova T.I., Nefedchenko A.V., Koteneva S.V. Genetic diversity and distribution of bovine pestiviruses (*Flaviviridae; Pestivirus*) in the world and in the Russian Federation. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(1): 18-26 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-96>

For correspondence: Alexander G. Glotov, D.Sci. (Vet.), Professor, Chief Researcher – Head of Biotechnology Laboratory, Diagnostic Center, FSBIS Siberian Federal Scientific Center for Agrobiotechnologies of the Russian Academy of Sciences, Institute of Experimental Veterinary Medicine of Siberia and the Far East 630501, Novosibirsk Region, Novosibirsky district, Krasnoobsk vill., Russia. E-mail: glotov_vet@mail.ru

Information about the authors:

Glotov A.G., <http://orcid.org/0000-0002-2006-0196>

Glotova T.I., <http://orcid.org/0000-0003-3538-8749>

Nefedchenko A.V., <http://orcid.org/0000-0002-4181-4268>

Koteneva S.V., <http://orcid.org/0000-0003-2649-7505>

Contribution: Glotov A.G. – literature analysis, writing the text of the article, approval of the final version of the article, general guidance; Glotova T.I. – literature analysis, editing of the article; A.V. Nefedchenko – literature analysis, approval of the final version of the article; Koteneva S.V. – literature analysis.

Funding. The research was funded by the State budget.

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Received 02 December 2021

Accepted 27 January 2022

Published 28 February 2022

Введение

К настоящему времени классификация рода *Pestivirus* семейства *Flaviviridae* претерпела изменения. В 2017 г. Международным комитетом по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) предложено включение 7 новых видов в дополнение к 4 существовавшим ранее. Вне зависимости от принадлежности к основному хозяи-

ну предложены названия с использованием формата *Pestivirus X*, где X – индекс, обозначающий соответствующий вид. При этом изменились наименования видов, однако изоляты по-прежнему означаются по их первоначальным названиям. Прототипный вид вируса переименован в пестивирус А (вирус вирусной диареи крупного рогатого скота (КРС) 1 типа; *bovine viral diarrhea virus 1, BVDV-1*), пестивирус В (вирус вирусной диареи КРС 2 типа; *BVDV-2*), пестивирус С

(вирус классической чумы свиней; classic swine fever virus, CSFV) и пестивирус D (вирус пограничной болезни овец; Border disease virus, BDV). Новые виды включают в себя Pestivirus E (пестивирус вилорога; pronghorn pestivirus), Pestivirus F (вирус Бунгованна; Bungowannah virus), Pestivirus G (пестивирус жирафа; giraffe pestivirus), Pestivirus H (вирус вирусной диареи КРС 3 типа, BVDV-3; HoBi-like pestivirus, HoBiPeV), Pestivirus I (пестивирус овец; Aydin-like (Айдын-подобный) pestivirus, sheep pestivirus), Пестивирус J (пестивирус крыс; rat pestivirus) и пестивирус K (атипичный пестивирус свиней; atypical porcine pestivirus) [1].

Пестивирусы КРС являются возбудителями вирусной диареи – болезни слизистых оболочек (ВД – БС), широко распространённой и экономически значимой инфекции [2–5]. Наибольшее распространение этих патологических агентов выявлено в странах с высокой плотностью расселения животных, где не принимаются систематические меры контроля заболеваний и эпизоотическая ситуация определяется патогенетическими механизмами, посредством которых возбудители могут сохраняться в популяциях КРС.

У восприимчивых животных все виды пестивирусов вызывают сходную патологию, включающую острые инфекции с иммуносупрессией, энтериты, рассасывание эмбрионов, аборт на всех стадиях стельности (вынашивания), врождённые уродства плода, рождение слабых телят, бесплодие, респираторную патологию и ВД – БС [4, 6–12]. Кроме этого, рассматриваемые патогены могут являться контаминантами биологических препаратов (эмбриональная сыворотка; перевиваемые линии клеточных культур; вакцины для медицины и ветеринарии; препараты интерферонов, трипсина, биотехнологические препараты; эмбрионы; стволовые клетки; сперма быков-производителей и др.) [13–20].

На течение болезни оказывают влияние вирулентность инфицирующего штамма, иммунный статус животного, его молочная продуктивность, условия содержания и кормления, а также многие другие хозяйственные факторы [3, 21]. Характер эпизоотической ситуации и стационарность очагов инфекции поддерживаются в основном за счёт циркуляции и постоянной эволюции определённых энзоотических штаммов либо заноса новых. Во втором случае возможно проявление широкого спектра симптомов, описанных в литературе. В подобных ситуациях вирус может рассматриваться как вновь возникающий (re-emerging) [22–24].

Большую роль в распространении возбудителя в популяциях КРС могут играть вакцинные препараты, контаминированные в ходе производства нецитопатогенными штаммами пестивирусов. Последние заносятся в клеточные культуры случайным образом из не прошедшей проверку эмбриональной сыворотки, используемой для размножения вакцинных штаммов [16, 17].

Целями настоящего обзора являются систематизация и актуализация научных данных о генетическом

разнообразии пестивирусов, циркулирующих среди КРС в мире и на территории Российской Федерации.

Характеристика возбудителей

Все пестивирусы имеют сходное строение вириона. Их геном представлен однонитевой РНК положительной полярности размером 12,3 т.п.н. Она имеет одну открытую рамку считывания (open reading frame, ORF) длиной ~4 тыс. кодонов, кодирующую 12 структурных и неструктурных белков (Npro-C-Erns-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B). Этот участок фланкирован с 5'- и 3'-концов нетранслируемыми областями (untranslated region) (5'-UTR и 3'-UTR) [5, 7]. Из всех регионов вирусного генома для дифференциации (сравнительного изучения) и филогенетического анализа широко используются 5'-UTR, Npro и E2 [5, 25].

Изменения в геноме пестивирусов являются результатом 3 процессов, приводящих к образованию различающихся, но близкородственных мутантов (субтипов): 1) накопление точечных мутаций в результате ошибок РНК-зависимой РНК-полимеразы; 2) негомологичная рекомбинация РНК; 3) рекомбинация гомологичной РНК. Частота мутаций аналогична таковой для других РНК-содержащих вирусов; считается, что 1 точечная мутация вводится в геном пестивируса за 1 цикл репликации [26]. Предполагается, что средняя скорость эволюции штаммов для региона 5'-UTR составляет $9,3 \times 10^{-3}$ замен/сайт/год с интервалом достоверности между 4,8 и 14,7 замен/10³ нуклеотидов [20].

Число известных к настоящему времени субтипов BVDV-1 составляет 21, BVDV-2 – 5 и BVDV-3 – 4. Роль их в инфекционной патологии КРС до конца не ясна. Все виды включают цитопатогенные и нецитопатогенные биотипы [7, 23, 26]. Существование подобного полиморфизма затрудняет диагностику вызываемых пестивирусами заболеваний, а также снижает эффективность вакцинации и контрольных программ. До настоящего времени не известно, обладают ли эти виды вируса взаимной перекрёстной защитой [27, 28]. Во всём мире наиболее распространены BVDV-1a и BVDV-1b, которые наряду с BVDV-2a входят в состав большинства коммерческих вакцинных препаратов [4].

В СССР вызываемые пестивирусами инфекции регистрировались с 1970 г.; к этому же времени относится выделение штаммов данных возбудителей, однако в указанный период проведение их полной идентификации не представлялось возможным.

Эпизоотология заболевания

ВД-БС регистрируется во всех странах мира и чаще носит энзоотический характер. Инфицированность КРС составляет 60–85% в зависимости от региональных особенностей. В стадах с наличием персистентно инфицированных животных она может достигать 90–100% [4].

Источники и пути передачи возбудителя

Для выживания в популяции хозяина КРС пестивирусы используют комбинированную стратегию, осно-

ванную на двух принципах: «инфицируй и исчезай» (эстафетная передача) и «инфицируй и персистируй». В первом случае это приводит к возникновению у восприимчивых животных преходящих «транзитных» острых форм инфекции (ТИ) и дальнейшей передаче её другим, а во втором – к пожизненной персистентной инфекции (ПИ) у отдельных особей путём уклонения от их иммунной защиты при помощи уникальных механизмов, не имеющих аналогов у других вирусов [31]. Поэтому транзитно инфицированные животные являются кратковременными и тупиковыми источниками патологического агента, в то время как имеющие ПИ представляют собой его постоянный эндогенный источник в стаде и играют основную роль в поддержании стационарного неблагополучия животноводческих хозяйств [4, 10].

Распространение видов вируса

Пестивирус А (BVDV-1) распространён по всему миру, однако частота его выявления выше в странах Европы. Согласно опубликованным последовательностям, большинство изолятов вируса относится к BVDV-1 (88,2%), что значительно выше, чем доля BVDV-2 (11,8%). При этом чаще всего встречается BVDV-1b, затем 1a и 1c [26]. Наибольшее количество субтипов (до 21) выявлено у КРС в Италии [32] и Китайской Народной Республике (КНР) [33].

В РФ исследования по филогенетическому анализу изолятов вирусов носят фрагментарный характер. Установлено широкое распространение вируса 1 типа среди КРС в Центральном регионе РФ [34] и выявлены 2 антигенно отличающихся штамма вируса (1a и 1m) в популяциях домашнего скота и лесных бизонов (*Bison bison athabascae*) [35].

На территории Сибирского региона при исследовании молочных комплексов среди аборигенных и импортных животных установлена циркуляция 11 субтипов BVDV-1: 1a (5%), 1b (35%), 1c (5%), 1d (10%), 1f (20%), 1g, 1i (по 2,5%), 1j, 1k, 1p и 1r (по 5%) (рисунок)*. Преобладающим оказался BVDV-1b, выявленный у имеющего различного характера патологию местного и импортного скота [36, 37]. BVDV-1c и BVDV-1d детектированы в пробах сыворотки крови телят с респираторными заболеваниями, рождённых от нетелей (не рожавших ранее половозрелых самок КРС) из Голландии и Франции, а также у телёнка местного происхождения. Присутствие BVDV-1f установлено в сыворотке крови телёнка с респираторной патологией, рождённого импортированной из Федеративной Республики Германия (ФРГ) нетелью. Помимо этого, данный субтип выявлен в пробах сыворотки крови коров (в т.ч. нетелей) отечественных пород в 3 регионах Сибири. BVDV-1i обнаружен у телёнка отечественного происхождения, а BVDV-1p – у рождённого нетелью из ФРГ. Вариант BVDV-1a детектирован во внутренних органах абортного плода и сыворотках крови телят австрийского

и голландского происхождения, BVDV-1g – в висцеральных органах телёнка немецкого происхождения. Наличие субтипа BVDV-1k установлено во внутренних органах телёнка от нетели из Франции. Наконец, BVDV-1j явился контаминантом эмбриональных сывороток и клеточных культур.

В литературе имеются сообщения о выявлении варианта BVDV-1f на территории Словении [38] и Австрии с высокой частотой у персистентно инфицированных животных. Спорадически этот субтип вируса обнаруживался в Италии [39] и Турции, однако описания клинических синдромов болезни отсутствовали. BVDV-1g вызвал вспышку пневмонии тяжёлого течения и геморрагического энтерита на западе Турции [40]. В России указанные субтипы детектированы у телят с признаками тяжёлой острой фибринозной бронхопневмонии, рождённых от импортного из Австрии и ФРГ скота, а также у телят из Новосибирской области.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о циркуляции большого количества субтипов пестивируса А среди отечественного и импортного КРС.

Пестивирус В (BVDV-2) встречается с меньшей частотой. Этот агент выделен от КРС в США [41], Канаде [42], Бразилии [43], Аргентине [44], Уругвае [45], некоторых странах Европы (ФРГ [46], Словакия [47], Италия [20]) и Азии: Южной Кореи [48], Японии [49] и Монголии [50]. Считается, что заносу его на европейскую территорию способствовали контаминированная эмбриональная сыворотка и другие биологические продукты, в частности вакцинные препараты [20, 51]. Данный вид вируса, считающийся наиболее вирулентным, подразделяется на 4 субтипа (2a...2d) [51] и преобладает в США и Канаде, достигая 50% от всех выделенных штаммов [4].

В Сибири у животных импортного и отечественного происхождения обнаружены 3 субтипа BVDV-2 – 2a (25%), 2b (10%) и 2c (5%) [29, 36, 37]. Первые 2 из них признаны основными этиологическими агентами патологии воспроизводства и системной инфекции с геморрагическим синдромом [4, 42, 52, 53]. На территории Сибирского региона BVDV-2a изолирован в 2008 г. от абортировавшей коровы местного происхождения, а субтип BVDV-2b выявлен у завезённых из США нетелей при вспышке массовых аборт, а также у рождённых телят в возрасте до 30 дней на фоне энтеритов и пневмоний [29, 36, 37].

BVDV-2c считается редким субтипом и впервые зарегистрирован в 2013–2014 гг. в ФРГ и Голландии у серонегативных животных при массовой энзоотической вспышке. Он вызывал снижение молочной продуктивности у коров, лихорадку, респираторное заболевание и геморрагический энтерит у телят, коров (включая нетелей) [54, 55]. В 2016 г. BVDV-2c обнаружен при вспышке болезни у мелких жвачных животных (*Ruminantia*) в Южной Италии, где он циркулировал начиная с 2004 г. [56]. Нами установлена циркуляция данного субтипа, ранее не выявляемого в нашей стране, среди перманентно и транзиторно инфицированных

*Дополнительные материалы расположены на сайте журнала: <https://virusjour.elpub.ru/jour>

ного скота, импортированного из ФРГ. В связи с этим к факту обнаружения BVDV-2b и BVDV-2c на территории РФ следует относиться с определённой эпидемиологической настороженностью, учитывая их потенциальную эмерджентность и отсутствие в составе коммерческих вакцин.

По нашему мнению, наибольшее распространение вируса в России приходилось на период 2006–2015 гг., будучи связано с интенсификацией молочного скотоводства и массовым завозом высокопродуктивного импортного скота. Однако выявление некоторых «экзотических» субтипов, описанное в единичных странах (например, в ФРГ, Голландии и Италии) среди аборигенного КРС в «закрытых» хозяйствах, куда не осуществлялся ввоз сторонних особей, диктует необходимость критически подходить к данному выводу и предположить, что эти разновидности возбудителя существовали в сибирской популяции животных на протяжении длительного периода времени. Установление источника происхождения указанных субтипов не представляется возможным.

Пестивирус Н (BVDV-3, HoBi-like, HoBiPeV). Распространение этого вируса, возможно, до настоящего времени ограничено несколькими регионами и связано с использованием контаминированных биологических препаратов. Впервые HoBiPeV выделен из партии эмбриональной сыворотки, собранной в Бразилии, но расфасованной на европейской территории, и охарактеризован в ФРГ [57]. Изолят, названный D32/00_HoBi, признан прототипным для бразильской группы вирусов. После этого несколькими авторами идентифицированы генетически различающиеся подтипы, имеющие региональное распространение, в частности тайская [58], индийская [59] и итальянская группы [11]. Таким образом, на сегодняшний день установлено наличие 4 генетических групп данного вируса (BVDV-3a...d).

В зарубежной литературе приводятся сообщения об обнаружении генома BVDV-3 в эмбриональной сыворотке. Так, M. Giannarioli и соавт. [61] в результате исследования методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) 26 архивных партий препарата, полученных на протяжении 1992–2013 гг. и прошедших процессы фильтрования и гамма-облучения, выявили 15 содержащих HoBi-like вирус серий. При этом 7 партий были произведены в Южной Америке и 1 – в Австралии. Страна происхождения для оставшихся 7 серий не была определена. Филогенетический анализ показал, что обнаруженный вирус относится к бразильской группе и был занесён на территорию Италии с эмбриональной сывороткой.

Изучение 90 серий коммерческой сыворотки, произведённой в США, но расфасованной в Европе, привело к отрицательным результатам в отношении BVDV-3, однако в 19 из них присутствовал BVDV-1, а в 1 – BVDV-2 [62]. По данным отечественных исследователей, BVDV-3 обнаружен в составе коммерческой вакцины против чумы мелких жвачных животных на территории Республики Таджикистан [60].

Проведёнными на территории Сибирского региона исследованиями установлено наличие генома вируса в 7 из 18 исследованных образцов использовавшихся в России эмбриональных сывороток 2 производителей. Вирусная РНК присутствовала в 2 лотах сыворотки российского (ООО «Биолот») и 5 сериях импортного производства (PAA Laboratories, Австрия). Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей продемонстрировал их принадлежность к штаммам итальянской подгруппы вируса [15, 37]. Позже Pestivirus Н выделен в клеточной культуре и установлена его этиологическая роль в возникновении респираторной формы болезни у телят [30].

В другой работе получены доказательства роли вируса в снижении коэффициента оплодотворения, а также в этиологии абортот, системной инфекции и энтеритов у телят и взрослых животных. Вспышки инфекции зарегистрированы в естественных условиях на 3 крупных молочно-товарных фермах; высказано предположение о связи этих вспышек с заносом возбудителя в ранее благополучные хозяйства с живой вакциной против нодулярного дерматита КРС. Нуклеотидный сиквенс последовательностей 3 выявленных у животных изолятов вируса установил их идентичность со штаммом BVDV-3, присутствовавшим в вакцине. Филогенетический анализ участка последовательности 5'-UTR генома изолятов отнёс их к штаммам вируса, выделенным в Бразилии и Италии (BVDV-3a) [63].

Согласно итальянским исследователям, низкая частота выявления HoBiPeV в Италии и отсутствие циркуляции его в других европейских странах подтверждают гипотезу о занесении данного варианта с контаминированными биологическими продуктами, а не с инфицированными животными [20]. Наши данные полностью согласуются с подобным утверждением.

Заключение

Анализ литературных данных свидетельствует о распространённости BVDV-1 во всём мире, преимущественно в Европейском регионе. Субтип BVDV-2 по сравнению с ним более вирулентен и чаще встречается на территории Северной Америки, реже – в других странах. Основными источниками этих патогенов являются КРС в процессе осуществления операций по международной торговле и контаминированные биологические препараты. Распространение BVDV-3 в настоящее время ограничено несколькими регионами Южной Америки, Европы и Азии; главным его источником также выступают контаминированные биопрепараты.

По данным отечественных исследователей, на территории Российской Федерации установлено широкое распространение возбудителей ВД – БС, циркулирующих среди КРС отечественного и иностранного происхождения. При этом отмечается достаточно высокая степень гетерогенности этих инфекционных агентов. На основании филогенетического анализа установлена циркуляция 12 субтипов BVDV-1, 3 субтипов BVDV-2 и 1 – BVDV-3. Преобладающими являются BVDV-1b и BVDV-2a.

По нашему мнению, высокий уровень генетической гетерогенности BVDV-1 и территориального распространения пестивирусов в целом объясняются интенсификацией молочного животноводства в РФ, сопровождающейся концентрацией животных на ограниченных территориях, торговлей КРС внутри страны и завозом штаммов вирусов с территории других государств при отсутствии или недостаточности официальных мер контроля.

Впервые установлена циркуляция 2 новых субтипов BVDV-2 (b и c), ранее не регистрировавшихся на территории РФ. К факту обнаружения указанных вариантов необходимо относиться с определённой эпидемиологической настороженностью, учитывая их эмерджентность и отсутствие в составе коммерческих вакцин.

Отсутствие на сегодняшний день вакцин против BVDV-3 создаёт условия для распространения вируса в популяциях КРС и во многом снижает эффективность специфической профилактики ВД – БС. Недостаточность же систематического контроля биопрепаратов в значительной степени способствует распространению возбудителя. Биологические и биотехнологические продукты, контаминированные нецитопатогенными штаммами вирусов, следует рассматривать как возможный источник интродукции эмерджентных видов/субгенотипов пестивирусов КРС в новые регионы и страны, включая Россию. С учётом этого представляется необходимым продолжение исследований в данном направлении с преимущественным акцентом на изучении филодинамики представителей рода *Pestivirus*.

ЛИТЕРАТУРА

- ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Genus: Pestivirus; 2019. Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/361/genus-pestivirus (accessed January 18, 2021).
- Верховская А.Е., Сергеев В.А., Алипер Т.И., Иванов Е.В. Особенности диагностики и профилактики вирусной диареи крупного рогатого скота. *Ветеринария*. 2009; (8): 3–7.
- Evans C.A., Pinior B., Larska M., Graham D., Schweizer M., Guidarini C., et al. Global knowledge gaps in the prevention and control of bovine viral diarrhoea (BVD) virus. *Transbound. Emerg. Dis.* 2019; 66(2): 640–52. <https://doi.org/10.1111/tbed.13068>
- Ridpath J.F. Bovine viral diarrhoea virus: global status. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26(1): 105–21. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.10.007>
- Simmonds P., Becher P., Bukh J., Gould E.A., Meyers G., Monath T., et al. ICTV virus taxonomy profile: *Flaviviridae*. *J. Gen. Virol.* 2017; 98(1): 2–3. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000672>
- Brock K.V. The many faces of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2004; 20(1): 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.12.002>
- Goyal S.M., Ridpath J.F., eds. *Bovine Viral Diarrhoea Virus. Diagnosis, Management, and Control*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.; 2005.
- Gard J.A., Givens M.D., Stringfellow D.A. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV): epidemiologic concerns relative to semen and embryos. *Theriogenology*. 2007; 68(3): 434–42. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.003>
- Grooms D.L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2004; 20(1): 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.006>
- O'Rourke K. BVDV: 40 years of effort and the disease still has a firm hold. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2002; 220(12): 1770–3.
- Decaro N., Lucente M.S., Mari V., Cirone F., Cordioli P., Camedero M., et al. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(8): 1549–52. <https://doi.org/10.3201/eid1708.101447>
- Decaro N. HoBi-like pestivirus and reproductive disorders. *Front. Vet. Sci.* 2020; 7: 622447. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.622447>
- Урываев Л.В., Ионова К.С., Дедова А.В., Дедова Л.В., Селиванова Т.К., Парасюк Н.А., и др. Анализ контаминации клеточных культур пестивирусом BVDV и микоплазмами. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(5): 15–21.
- Глотов А.Г., Глотова Т.И., Котенева С.В. О контаминации импортруемой фетальной сыворотки крови крупного рогатого скота пестивирусами как факторе распространения вирусной диареи в условиях глобализации: мини-обзор. *Сельскохозяйственная биология*. 2018; 53(2): 248–57. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.2.248rus>
- Котенева С.В., Максютов Р.А., Глотова Т.И., Глотов А.Г. Идентификация атипичного пестивируса крупного рогатого скота в биологических образцах. *Сельскохозяйственная биология*. 2017; 52(6): 1259–64. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.6.1259rus>
- Makoschey B., van Gelder P.T., Keijsers V., Goovaerts D. Bovine viral diarrhoea virus antigen in foetal calf serum batches and consequences of such contamination for vaccine production. *Biologicals*. 2003; 31(3): 203–8. [https://doi.org/10.1016/s1045-1056\(03\)00058-7](https://doi.org/10.1016/s1045-1056(03)00058-7)
- Pastoret P.P. Human and animal vaccine contaminations. *Biologicals*. 2010; 38(3): 332–4. <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2010.02.015>
- Giangaspero M. Pestivirus species potential adventitious contaminants of biological products. *Trop. Med. Surg.* 2013; 1(6): 153. <https://doi.org/10.4172/2329-9088.1000153>
- Pecora A., Perez Aguirreburualde M.S., Ridpath J.F., Dus Santos M.J. Molecular characterization of pestiviruses in fetal bovine sera originating from Argentina: evidence of circulation of HoBi-like viruses. *Front. Vet. Sci.* 2019; 6: 359. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00359>
- Luzzago C., Decaro N. Epidemiology of bovine pestiviruses circulating in Italy. *Front. Vet. Sci.* 2021; 8: 669942. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.669942>
- Moennig V., Becher P. Control of bovine viral diarrhoea. *Pathogens*. 2018; 7(1): 29–41. <https://doi.org/10.3390/pathogens7010029>
- Глотов А.Г., Глотова Т.И. Атипичные пестивирусы крупного рогатого скота. *Сельскохозяйственная биология*. 2015; 50(4): 399–408. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.4.399rus>
- Bauermann F.V., Ridpath J.F. HoBi-like viruses – the typical ‘atypical bovine pestivirus’. *Anim. Health Res. Rev.* 2015; 16: 64–9. <https://doi.org/10.1017/S146625231500002X>
- Pinior B., Firth C.L., Richter V., Lebl K., Trauffer M., Dzieciol M., et al. A systematic review of financial and economic assessments of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevention and mitigation activities worldwide. *Prev. Vet. Med.* 2017; 137(Pt. A): 77–92. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.12.014>
- Becher P., Tautz N. RNA recombination in pestiviruses: Cellular RNA sequences in viral genomes highlight the role of host factors for viral persistence and lethal disease. *RNA Biol.* 2011; 8(2): 216–24. <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.14514>
- Yeşilbaş K., Alpaly G., Becher P. Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus. *Viruses*. 2017; 9(6): 128. <https://doi.org/10.3390/v9060128>
- Brock K.V., McCarty K., Chase C.C., Harland R. Protection against fetal infection with either bovine viral diarrhoea virus type 1 or type 2 using a noncytopathic type 1 modified-live virus vaccine. *Vet. Ther.* 2006; 7(1): 27–34.
- Nardelli S., Decaro N., Belfanti I., Lucente M.S., Giammarioli M., Mion M., et al. Do modified live virus vaccines against bovine viral diarrhoea induce fetal cross-protection against HoBi-like Pestivirus? *Vet. Microbiol.* 2021; 260: 109178. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109178>
- Глотов А.Г., Глотова Т.И., Южаков А.Г., Забережный А.Д., Алипер Т.И. Выделение на территории Российской Федерации нецитопатогенного изолята 2-го генотипа вируса диареи – болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота. *Вопросы вирусологии*. 2009; 54(5): 43–7.
- Акимова О.А., Южаков А.Г., Корицкая М.А., Иванов Е.В., Джавадова Г.А., Глотов А.Г., и др. Выделение и идентифи-

- кация вируса вирусной диареи крупного рогатого скота 3-го типа в животноводческом хозяйстве Российской Федерации. *Ветеринария*. 2021; (7): 17–22. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2021.24.7.17-22>
31. Peterhans E., Schweizer M. Pestiviruses: how to outmaneuver your hosts. *Vet. Microbiol.* 2010; 142(1-2):18–25. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.038>
 32. Giammarioli M., Ceglie L., Rossi E., Bazzucchi M., Casciari C., Petrini S., et al. Increased genetic diversity of BVDV-1: recent findings and implications thereof. *Virus Genes*. 2015; 50(1): 147–51. <https://doi.org/10.1007/s11262-014-1132-2>
 33. Deng M., Ji S., Fei W., Raza S., He C., Chen Y., et al. Prevalence study and genetic typing of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in four bovine species in China. *PLoS One*. 2015; 10(7): e0134777. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134777>
 34. Шульпин М.И., Аянот П.К., Мищенко В.А. Индикация вируса диареи крупного рогатого скота, генотипирование и филогенетический анализ изолятов, выявленных на территории Российской Федерации. *Вопросы вирусологии*. 2003; 48(5): 41–6.
 35. Юров Г.К., Алексеенкова С.В., Диас Хименес К.А., Неустров М.П., Юров К.П. Антигенные свойства нецитопатогенных штаммов вируса диареи – болезни слизистых крупного рогатого скота. *Российский ветеринарный журнал*. 2013; (2): 24–6.
 36. Котенева С.В., Нефедченко А.В., Глотова Т.И., Глотов А.Г. Генетический полиморфизм возбудителя вирусной диареи (болезни слизистых оболочек) крупного рогатого скота на молочных комплексах Сибири. *Сельскохозяйственная биология*. 2018; 53(6): 1238–46. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.6.1238rus>
 37. Глотов А.Г., Котенева С.В., Глотова Т.И., Южаков А.Г., Максютов Р.А., Забережный А.Д. Филогенетический анализ пестивирусов крупного рогатого скота, выявленных в Сибири. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(4): 185–91. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-185-191>
 38. Toplak I., Sandvik T., Barlič-Maganja D., Grom J., Paton D. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: most Slovenian isolates are of genotypes 1d and 1f. *Vet. Microbiol.* 2004; 99(3-4): 175–85. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.12.004>
 39. Giammarioli M., Pellegrini C., Casciari C., Rossi E., De Mia G.M. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus 1: Italian isolates clustered in at least seven subgenotypes. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2008; 20(6): 783–8. <https://doi.org/10.1177/104063870802000611>
 40. Yesilbag K., Forster C., Ozyigit M., Alpay G., Tuncer P., Thiel H.J., et al. Characterization of bovine viral diarrhoea virus BVDV isolates from an outbreak with hemorrhagic enteritis and severe pneumonia. *Vet. Microbiol.* 2014; 169(1-2): 42–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.12.005>
 41. Evermann J.F., Ridpath J.F. Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhoea virus in the northwestern United States. *Vet. Microbiol.* 2002; 89(2-3): 129–39. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00178-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00178-5)
 42. Carman S., Van Dreumel T., Ridpath J., Hazlett M., Alves D., Dubovi E., et al. Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993–1995. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1998; 10(1): 27–35. <https://doi.org/10.1177/104063879801000010>
 43. Silveira S., Weber M.N., Mósen A.C., Da Silva M.S., Streck A.F., Pescador C.A., et al. Genetic Diversity of Brazilian Bovine Pestiviruses Detected Between 1995 and 2014. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64(2): 613–23. <https://doi.org/10.1111/tbed.12427>
 44. Pecora A., Malacari D.A., Ridpath J.F., Perez Aguirreburualde M.S., Combessies G., Odeón A.C., et al. First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Res. Vet. Sci.* 2014; 96(1): 204–12. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.11.004>
 45. Maya L., Puentes R., Reolón E., Acuña P., Riet F., Rivero R., et al. Molecular diversity of bovine viral diarrhoea virus in Uruguay. *Arch. Virol.* 2016; 161(3): 529–35. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2688-4>
 46. Tajima M., Frey H.R., Yamato O., Maeda Y., Moennig V., Scholz H., et al. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Res.* 2001; 76(1): 31–42. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(01\)00244-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(01)00244-1)
 47. Novácková M., Jacková A., Kolesárová M., Vilček S. Genetic analysis of a bovine viral diarrhoea virus 2 isolate from Slovakia. *Acta Virol.* 2008; 52(3): 161–6.
 48. Oem J.K., Hyun B.H., Cha S.H., Lee K.K., Kim S.H., Kim H.R., et al. Phylogenetic analysis and characterization of Korean bovine viral diarrhoea viruses. *Vet. Microbiol.* 2009; 139(3-4): 356–60. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.06.017>
 49. Yamamoto T., Kozasa T., Aoki H., Sekiguchi H., Morino S., Nakamura S. Genomic analyses of bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle imported into Japan between 1991 and 2005. *Vet. Microbiol.* 2008; 127(3-4): 386–91. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.08.020>
 50. Ochirkhuu N., Konnai S., Odbileg R., Odzaya B., Gansukh S., Murata S., et al. Molecular detection and characterization of bovine viral diarrhoea virus in Mongolian cattle and yaks. *Arch. Virol.* 2016; 161(8): 2279–83. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2890-z>
 51. Giangaspero M., Apicellab S., Harasawa R. Numerical taxonomy of the genus *Pestivirus*: New software for genotyping based on the palindromic nucleotide substitutions method. *J. Virol. Methods*. 2013; 192(1-2): 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.04.023>
 52. Munoz-Zanzi C.A., Thurmond M.C., Hietala S.K. Effect of bovine viral diarrhoea virus infection on fertility of dairy heifers. *Theriogenology*. 2004; 61(6): 1085–99. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.06.003>
 53. Walz P.H., Chamorro M.F., Falkenberg M.S., Passler T., van der Meer F., Woolums A.R. Bovine viral diarrhoea virus: An updated American College of Veterinary Internal Medicine consensus statement with focus on virus biology, hosts, immunosuppression, and vaccination. *J. Vet. Intern. Med.* 2020; 34(5): 1690–706. <https://doi.org/10.1111/jvim.15816>
 54. Jenckel M., Höper D., Schirrmeyer H., Reimann I., Goller K.V., Hoffmann B., et al. Mixed triple: allied viruses in unique recent isolates of highly virulent type 2 bovine viral diarrhoea virus detected by deep sequencing. *J. Virol.* 2014; 88(12): 6983–92. <https://doi.org/10.1128/JVI.00620-14>
 55. Gethmann J., Homeier T., Holsteg M., Schirrmeyer H., Saßerath M., Hoffmann B., et al. BVD-2 outbreak leads to high losses in cattle farms in Western Germany. *Heliyon*. 2015; 1(1): e00019. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2015.e00019>
 56. Decaro N., Lucente M.S., Lanave G., Gargano P., Larocca V., Lo-surdo M., et al. Evidence for circulation of Bovine viral diarrhoea virus type 2c in ruminants in Southern Italy. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64(6): 1935–44. <https://doi.org/10.1111/tbed.12592>
 57. Schirrmeyer H., Strebelow G., Depner K., Hoffmann B., Beer M. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(Pt. 12): 3647–52. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80238-0>
 58. Weber M.N., Mósen A.C., Simões S.V., Almeida L.L., Pessoa C.R., Budaszewski R.F., et al. Clinical presentation resembling mucosal disease associated with ‘HoBi’-like pestivirus in a field outbreak. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016; 63(1): 92–100. <https://doi.org/10.1111/tbed.12223>
 59. Mishra N., Rajukumar K., Pateriya A., Kumar M., Dubey P., Behera S.P., et al. Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India. *Vet. Microbiol.* 2014; 174(1-2): 239–46. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.09.017>
 60. Юров К.П., Аноятбекова А.М., Алексеенкова С.В. Новый пестивирус – Хоби вирус – контаминант вакцины против чумы мелких жвачных животных. *Ветеринария*. 2016; (10): 8–10.
 61. Giammarioli M., Ridpath J.F., Rossi E., Bazzucchi M., Casciari C., De Mia G.M. Genetic detection and characterization of emerging HoBi-like viruses in archival foetal bovine serum batches. *Biologicals*. 2015; 43(4): 220–4. <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2015.05.009>
 62. Bauermann F.V., Flores E.F., Falkenberg S.M., Weiblen R., Ridpath J.F. Lack of evidence for the presence of emerging HoBi-like viruses in North American fetal bovine serum lots. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2014; 26(1): 10–7. <https://doi.org/10.1177/1040638713518208>
 63. Глотов А.Г., Нефедченко А.В., Котенева С.В., Глотова Т.И. Инфекция крупного рогатого скота, вызванная пестивирусом Н в молочных хозяйствах. *Ветеринария*. 2021; (8): 17–23. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2021.24.8.17-23>

REFERENCES

1. ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Genus: Pestivirus; 2019. Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/361/genus-pestivirus (accessed January 18, 2021).
2. Verkhovskaya A.E., Sergeev V.A., Aliper T.I., Ivanov E.V. Features of diagnosis and prevention of viral diarrhea in cattle [Osobennosti diagnostiki i profilaktiki virusnoy diarei krupnogo rogatogo skota]. *Veterinariya*. 2009; (8): 3–7. (in Russian)
3. Evans C.A., Piniar B., Larska M., Graham D., Schweizer M., Guidarini C., et al. Global knowledge gaps in the prevention and control of bovine viral diarrhoea (BVD) virus. *Transbound. Emerg. Dis.* 2019; 66(2): 640–52. <https://doi.org/10.1111/tbed.13068>
4. Ridpath J.F. Bovine viral diarrhoea virus: global status. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26(1): 105–21. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2009.10.007>
5. Simmonds P., Becher P., Bukh J., Gould E.A., Meyers G., Monath T., et al. ICTV virus taxonomy profile: *Flaviviridae*. *J. Gen. Virol.* 2017; 98(1): 2–3. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000672>
6. Brock K.V. The many faces of bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2004; 20(1): 1–3. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.12.002>
7. Goyal S.M., Ridpath J.F., eds. *Bovine Viral Diarrhoea Virus. Diagnosis, Management, and Control*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.; 2005.
8. Gard J.A., Givens M.D., Stringfellow D.A. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV): epidemiologic concerns relative to semen and embryos. *Theriogenology*. 2007; 68(3): 434–42. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.003>
9. Grooms D.L. Reproductive consequences of infection with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2004; 20(1): 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2003.11.006>
10. O'Rourke K. BVDV: 40 years of effort and the disease still has a firm hold. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2002; 220(12): 1770–3.
11. Decaro N., Lucente M.S., Mari V., Cirone F., Cordioli P., Caimero M., et al. Atypical pestivirus and severe respiratory disease in calves, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(8): 1549–52. <https://doi.org/10.3201/eid1708.101447>
12. Decaro N. HoBi-like pestivirus and reproductive disorders. *Front. Vet. Sci.* 2020; 7: 622447. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.622447>
13. Uryvaev L.V., Ionova K.S., Dedova A.V., Dedova L.V., Selivanova T.K., Parasyuk N.A., et al. Analysis of the cell tissue cultures' contamination with the BVDV virus and mycoplasmas [Analiz kontaminatsii kletochnykh kul'tur pestivirusom BVDV i mikoplazmami]. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(5): 15–21. (in Russian)
14. Glotov A.G., Glotova T.I., Koteneva S.V. On contamination of imported bovine fetal serum with pestiviruses as a factor in the spread of viral diarrhoea under conditions of globalization: a mini-review [O kontaminatsii importiruemykh fetal'noy syvorotki krovi krupnogo rogatogo skota pestivirusami kak faktore rasprostraneniya virusnoy diarei v usloviyakh globalizatsii: mini-obzor]. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2018; 53(2): 248–57. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.2.248rus> (in Russian)
15. Koteneva S.V., Maksyutov R.A., Glotova T.I., Glotov A.G. Identification of the cattle atypical pestivirus in biological samples [Identifikatsiya atipichnogo pestivirusa krupnogo rogatogo skota v biologicheskikh obratzakh]. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2017; 52(6): 1259–64. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.6.1259rus> (in Russian)
16. Makoschey B., van Gelder P.T., Keijsers V., Goovaerts D. Bovine viral diarrhoea virus antigen in foetal calf serum batches and consequences of such contamination for vaccine production. *Biologicals*. 2003; 31(3): 203–8. [https://doi.org/10.1016/s1045-1056\(03\)00058-7](https://doi.org/10.1016/s1045-1056(03)00058-7)
17. Pastoret P.P. Human and animal vaccine contaminations. *Biologicals*. 2010; 38(3): 332–4. <https://doi.org/10.1016/j.biologics.2010.02.015>
18. Giangaspero M. Pestivirus species potential adventitious contaminants of biological products. *Trop. Med. Surg.* 2013; 1(6): 153. <https://doi.org/10.4172/2329-9088.1000153>
19. Pecora A., Perez Aguirreburualde M.S., Ridpath J.F., Dus Santos M.J. Molecular characterization of pestiviruses in fetal bovine sera originating from Argentina: evidence of circulation of HoBi-like viruses. *Front. Vet. Sci.* 2019; 6: 359. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00359>
20. Luzzago C., Decaro N. Epidemiology of bovine pestiviruses circulating in Italy. *Front. Vet. Sci.* 2021; 8: 669942. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.669942>
21. Moennig V., Becher P. Control of bovine viral diarrhoea. *Pathogens*. 2018; 7(1): 29–41. <https://doi.org/10.3390/pathogens7010029>
22. Glotov A.G., Glotova T.I. Atypical cattle pestiviruses [Atipichnyye pestivirusy krupnogo rogatogo skota]. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2015; 50(4): 399–408. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2015.4.399rus> (in Russian)
23. Bauermann F.V., Ridpath J.F. HoBi-like viruses – the typical 'atypical bovine pestivirus'. *Anim. Health Res. Rev.* 2015; 16: 64–9. <https://doi.org/10.1017/S146625231500002X>
24. Piniar B., Firth C.L., Richter V., Lebl K., Trauffer M., Dzieciol M., et al. A systematic review of financial and economic assessments of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) prevention and mitigation activities worldwide. *Prev. Vet. Med.* 2017; 137(Pt. A): 77–92. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.12.014>
25. Becher P., Tautz N. RNA recombination in pestiviruses: Cellular RNA sequences in viral genomes highlight the role of host factors for viral persistence and lethal disease. *RNA Biol.* 2011; 8(2): 216–24. <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.14514>
26. Yeşilbaş K., Alpaya G., Becher P. Variability and global distribution of subgenotypes of bovine viral diarrhoea virus. *Viruses*. 2017; 9(6): 128. <https://doi.org/10.3390/v9060128>
27. Brock K.V., McCarty K., Chase C.C., Harland R. Protection against fetal infection with either bovine viral diarrhoea virus type 1 or type 2 using a noncytopathic type 1 modified-live virus vaccine. *Vet. Ther.* 2006; 7(1): 27–34.
28. Nardelli S., Decaro N., Belfanti I., Lucente M.S., Giammarioli M., Mion M., et al. Do modified live virus vaccines against bovine viral diarrhoea induce fetal cross-protection against HoBi-like Pestivirus? *Vet. Microbiol.* 2021; 260: 109178. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109178>
29. Glotov A.G., Glotova T.I., Yuzhakov A.G., Zaberezhnyy A.D., Aliper T.I. Isolation of noncytopathogenic genotype 2 bovine viral diarrhoea/mucosal disease virus from the cattle mucosa in the Russian Federation [Vydelenie na territorii Rossiyskoy Federatsii netsitopatogenno izolyata 2-go genotipa virusa diarei – bolezni slizistykh obolochek krupnogo rogatogo skota]. *Voprosy virusologii*. 2009; 54(5): 43–7. (in Russian)
30. Akimova O.A., Yuzhakov A.G., Koritskaya M.A., Ivanov E.V., Dzhavadova G.A., Glotov A.G., et al. Isolation and identification of bovine viral diarrhoea virus type 3 at a farm in Russian Federation [Vydelenie i identifikatsiya virusa virusnoy diarei krupnogo rogatogo skota 3-go tipa v zhivotnovodcheskom khozyaystve Rossiyskoy Federatsii]. *Veterinariya*. 2021; (7): 17–22. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2021.24.7.17-22> (in Russian)
31. Peterhans E., Schweizer M. Pestiviruses: how to outmaneuver your hosts. *Vet. Microbiol.* 2010; 142(1-2):18–25. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.038>
32. Giammarioli M., Ceglie L., Rossi E., Bazzucchi M., Casciari C., Petri S., et al. Increased genetic diversity of BVDV-1: recent findings and implications thereof. *Virus Genes*. 2015; 50(1): 147–51. <https://doi.org/10.1007/s11262-014-1132-2>
33. Deng M., Ji S., Fei W., Raza S., He C., Chen Y., et al. Prevalence study and genetic typing of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in four bovine species in China. *PLoS One*. 2015; 10(7): e0134777. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134777>
34. Shul'pin M.I., Ayanot P.K., Mishchenko V.A. Indication of bovine diarrhoea virus, genotyping and phylogenetic analysis of isolates identified in the territory of the Russian Federation [Indikatsiya virusa diarei krupnogo rogatogo skota, genotipirovanie i filogeneticheskiy analiz izolyatov, vyyavlenykh na territorii Rossiyskoy Federatsii]. *Voprosy virusologii*. 2003; 48(5): 41–6. (in Russian)
35. Yurov G.K., Alekseenkova S.V., Dias Jimenez K.A., Neustroev M.P., Yurov K.P. Antigenicity of noncytopathogenic strains of bovine diarrhoea/mucosal disease virus [Antigennyye svoystva netsitopatogennykh shtammov virusa diarei – bolezni slizistykh obolochek krupnogo rogatogo skota]. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal*. 2013; (2): 24–6. (in Russian)
36. Koteneva S.V., Nefedchenko A.V., Glotova T.I., Glotov A.G. Genetic polymorphism of the bovine viral diarrhoea/mucosal disease viruses in big dairy farms in Siberia [Geneticheskiy polimorfizm vzbuditeley virusnoy diarei (bolezni slizistykh obolochek) krupnogo rogatogo skota na molochnykh kompleksakh Sibiri]. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. 2017; 52(6): 1259–64. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2017.6.1259rus> (in Russian)

- hozyaystvennaya biologiya*. 2018; 53(6): 1238–46. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2018.6.1238rus> (in Russian)
37. Glotov A.G., Koteneva S.V., Glotova T.I., Yuzhakov A.G., Maksyutov R.A., Zaberezhnyy A.D. Phylogenetic analysis of bovine pestiviruses detected in Siberia [*Filogeneticheskiy analiz pestivirusov krupnogo rogatogo skota, vyvavlennykh v Sibiri*]. *Voprosy virusologii*. 2018; 63(4): 185–91. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-4-185-191> (in Russian)
 38. Toplak I., Sandvik T., Barlič-Maganja D., Grom J., Paton D. Genetic typing of bovine viral diarrhoea virus: most Slovenian isolates are of genotypes 1d and 1f. *Vet. Microbiol.* 2004; 99(3-4): 175–85. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.12.004>
 39. Giammarioli M., Pellegrini C., Casciari C., Rossi E., De Mia G.M. Genetic diversity of bovine viral diarrhoea virus 1: Italian isolates clustered in at least seven subgenotypes. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2008; 20(6): 783–8. <https://doi.org/10.1177/104063870802000611>
 40. Yesilbag K., Forster C., Ozyigit M., Alpaly G., Tuncer P., Thiel H.J., et al. Characterization of bovine viral diarrhoea virus BVDV isolates from an outbreak with hemorrhagic enteritis and severe pneumonia. *Vet. Microbiol.* 2014; 169(1-2): 42–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.12.005>
 41. Evermann J.F., Ridpath J.F. Clinical and epidemiologic observations of bovine viral diarrhoea virus in the northwestern United States. *Vet. Microbiol.* 2002; 89(2-3): 129–39. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(02\)00178-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(02)00178-5)
 42. Carman S., Van Dreumel T., Ridpath J., Hazlett M., Alves D., Dubovi E., et al. Severe acute bovine viral diarrhoea in Ontario, 1993–1995. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1998; 10(1): 27–35. <https://doi.org/10.1177/104063879801000010>
 43. Silveira S., Weber M.N., Mósen A.C., Da Silva M.S., Streck A.F., Pescador C.A., et al. Genetic Diversity of Brazilian Bovine Pestiviruses Detected Between 1995 and 2014. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64(2): 613–23. <https://doi.org/10.1111/tbed.12427>
 44. Pecora A., Malacari D.A., Ridpath J.F., Perez Aguirreburualde M.S., Combessies G., Odeón A.C., et al. First finding of genetic and antigenic diversity in 1b-BVDV isolates from Argentina. *Res. Vet. Sci.* 2014; 96(1): 204–12. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.11.004>
 45. Maya L., Puentes R., Reolón E., Acuña P., Riet F., Rivero R., et al. Molecular diversity of bovine viral diarrhoea virus in Uruguay. *Arch. Virol.* 2016; 161(3): 529–35. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2688-4>
 46. Tajima M., Frey H.R., Yamato O., Maede Y., Moennig V., Scholz H., et al. Prevalence of genotypes 1 and 2 of bovine viral diarrhoea virus in Lower Saxony, Germany. *Virus Res.* 2001; 76(1): 31–42. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(01\)00244-1](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(01)00244-1)
 47. Novácková M., Jacková A., Kolesárová M., Vilček S. Genetic analysis of a bovine viral diarrhoea virus 2 isolate from Slovakia. *Acta Virol.* 2008; 52(3): 161–6.
 48. Oem J.K., Hyun B.H., Cha S.H., Lee K.K., Kim S.H., Kim H.R., et al. Phylogenetic analysis and characterization of Korean bovine viral diarrhoea viruses. *Vet. Microbiol.* 2009; 139(3-4): 356–60. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.06.017>
 49. Yamamoto T., Kozasa T., Aoki H., Sekiguchi H., Morino S., Nakamura S. Genomic analyses of bovine viral diarrhoea viruses isolated from cattle imported into Japan between 1991 and 2005. *Vet. Microbiol.* 2008; 127(3-4): 386–91. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.08.020>
 50. Ochirkhuu N., Konnai S., Odbileg R., Odzaya B., Gansukh S., Murata S., et al. Molecular detection and characterization of bovine viral diarrhoea virus in Mongolian cattle and yaks. *Arch. Virol.* 2016; 161(8): 2279–83. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2890-z>
 51. Giangaspero M., Apicellab S., Harasawa R. Numerical taxonomy of the genus *Pestivirus*: New software for genotyping based on the palindromic nucleotide substitutions method. *J. Virol. Methods.* 2013; 192(1-2): 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.04.023>
 52. Munoz-Zanzi C.A., Thurmond M.C., Hietala S.K. Effect of bovine viral diarrhoea virus infection on fertility of dairy heifers. *Theriogenology.* 2004; 61(6): 1085–99. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.06.003>
 53. Walz P.H., Chamorro M.F., Falkenberg M.S., Passler T., van der Meer F., Woolums A.R. Bovine viral diarrhoea virus: An updated American College of Veterinary Internal Medicine consensus statement with focus on virus biology, hosts, immunosuppression, and vaccination. *J. Vet. Intern. Med.* 2020; 34(5): 1690–706. <https://doi.org/10.1111/jvim.15816>
 54. Jenckel M., Höper D., Schirrmeyer H., Reimann I., Goller K.V., Hoffmann B., et al. Mixed triple: allied viruses in unique recent isolates of highly virulent type 2 bovine viral diarrhoea virus detected by deep sequencing. *J. Virol.* 2014; 88(12): 6983–92. <https://doi.org/10.1128/JVI.00620-14>
 55. Gethmann J., Homeier T., Holsteg M., Schirrmeyer H., Saferath M., Hoffmann B., et al. BVD-2 outbreak leads to high losses in cattle farms in Western Germany. *Heliyon.* 2015; 1(1): e00019. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2015.e00019>
 56. Decaro N., Lucente M.S., Lanave G., Gargano P., Larocca V., Lo-surdo M., et al. Evidence for circulation of Bovine viral diarrhoea virus type 2c in ruminants in Southern Italy. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64(6): 1935–44. <https://doi.org/10.1111/tbed.12592>
 57. Schirrmeyer H., Strebellow G., Depner K., Hoffmann B., Beer M. Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(Pt. 12): 3647–52. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80238-0>
 58. Weber M.N., Mósen A.C., Simões S.V., Almeida L.L., Pessoa C.R., Budaszewski R.F., et al. Clinical presentation resembling mucosal disease associated with ‘HoBi’-like pestivirus in a field outbreak. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016; 63(1): 92–100. <https://doi.org/10.1111/tbed.12223>
 59. Mishra N., Rajukumar K., Pateriya A., Kumar M., Dubey P., Behera S.P., et al. Identification and molecular characterization of novel and divergent HoBi-like pestiviruses from naturally infected cattle in India. *Vet. Microbiol.* 2014; 174(1-2): 239–46. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.09.017>
 60. Yurov K.P., Anoyatbekova A.M., Alekseenkova S.V. New pestivirus – HoBi-virus – contaminant of small ruminant plague vaccine [*Novyy pestivirus – Khobi virus – kontaminant vaktstiny protiv chumy melkikh zhvachnykh zhivotnykh*]. *Veterinariya.* 2016; (10): 8–10. (in Russian)
 61. Giammarioli M., Ridpath J.F., Rossi E., Bazzucchi M., Casciari C., De Mia G.M. Genetic detection and characterization of emerging HoBi-like viruses in archival foetal bovine serum batches. *Biologicals.* 2015; 43(4): 220–4. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2015.05.009>
 62. Bauermann F.V., Flores E.F., Falkenberg S.M., Weiblen R., Ridpath J.F. Lack of evidence for the presence of emerging HoBi-like viruses in North American fetal bovine serum lots. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2014; 26(1): 10–7. <https://doi.org/10.1177/1040638713518208>
 63. Glotov A.G., Nefedchenko A.V., Koteneva S.V., Glotova T.I. The cattle infection caused by Pestivirus H in dairy farms [*Infektsiya krupnogo rogatogo skota, vyzvannaya pestivirusom H v molochnykh khozyaystvakh*]. *Veterinariya.* 2021; (8): 17–23. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2021.24.8.17-23> (in Russian)

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-85>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Сопоставление напряжённости гуморального иммунитета к кори с заболеваемостью в различных возрастных группах из числа медицинских работников г. Москвы

Костинов М.П.^{1,2}, Журавлев П.И.³, Локтионова М.Н.², Шмитько А.Д.¹, Полищук В.Б.¹, Татаринчик А.А.³, Смирнова О.А.³, Фурсов И.С.³¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия;²ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия;³ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 129626, Москва, Россия

Введение. Изучение напряжённости гуморального иммунитета к вирусу кори (*Paramyxoviridae: Morbillivirus*) (ВК) до настоящего времени сохраняет свою актуальность в связи с продолжающейся регистрацией эпизодов групповой заболеваемости этой инфекцией (в том числе в медицинских организациях).

Цель исследования – изучение связи напряжённости гуморального иммунитета к кори с заболеваемостью этой инфекцией в различных возрастных группах жителей г. Москвы из числа медицинских работников.

Материал и методы. Простое аналитическое исследование осуществлялось в рамках программы совершенствования работы по профилактике кори в субъектах Российской Федерации с анализом причины роста доли серонегативных лиц и сопоставления результатов серомониторинга с данными по возрастной заболеваемости. На протяжении 2018 г. в 1855 образцах сывороток крови, взятых у ранее привитых против данного заболевания сотрудников крупного больничного комплекса г. Москвы, выполнено определение содержания антител (АТ) класса IgG к ВК. Исследуемые распределены на 11 групп в соответствии с возрастом. Статистический анализ полученных данных проводился с использованием непараметрических критериев.

Результаты и обсуждение. Установлено, что по мере увеличения возраста доля серонегативных лиц из числа персонала медицинского учреждения снижалась с 38,5% в группе 19–23 лет до 0% в группе 64 и более лет (64+). Исследуемые в возрасте от 19 до 43 лет оказались наиболее восприимчивыми к коревой инфекции, что подтверждается не только наибольшим количеством серонегативных результатов в данных группах (от 22,2 до 38,5%), но и наивысшим показателем заболеваемости среди них (от 6,93 до 14,03 на 100 тыс. населения). Самая защищённая от кори возрастная группа – лица старше 64 лет, у которых не получено серонегативных результатов на фоне наименьших показателей заболеваемости корью. Это, вероятно, обусловлено тем, что в указанном возрасте большинство из них перенесли коревую инфекцию и сформировали достаточный иммунный ответ. В то же время более молодые лица, живущие в постэпидемическую эру, имеют только поствакцинальные АТ к ВК, уровень которых при отсутствии бустеризации диким штаммом возбудителя быстро снижается до непротективных значений.

Заключение. У сотрудников медицинских организаций в возрасте до 35 лет представляется целесообразным проводить мониторинг уровня IgG-АТ к ВК. Серонегативным к данному инфекционному агенту показано однократное введение живой коревой вакцины.

Ключевые слова: коллективный иммунитет; корь; антитела (АТ) к вирусу кори (ВК); заболеваемость

Для цитирования: Костинов М.П., Журавлев П.И., Локтионова М.Н., Шмитько А.Д., Полищук В.Б., Татаринчик А.А., Смирнова О.А., Фурсов И.С. Сопоставление напряжённости гуморального иммунитета к кори с заболеваемостью в различных возрастных группах из числа медицинских работников г. Москвы. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(1): 27-36. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-85>

Для корреспонденции: Журавлев Павел Иванович, врач-эпидемиолог, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (ЦГиЭ), 129626, Москва, Россия. E-mail: pvazhurik@gmail.com

Участие авторов: Костинов М.П. – концепция и дизайн исследования; Журавлев П.И. – проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи; Локтионова М.Н. – анализ и интерпретация данных; Шмитько А.Д. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, подготовка текста статьи; Полищук В.Б. – проведение экспериментов; Татаринчик А.А. – анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи, статистическая обработка результатов; Смирнова О.А. – сбор, анализ и интерпретация данных; Фурсов И.С. – сбор, анализ и интерпретация данных.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Благодарности. Авторы выражают признательность всем сотрудникам лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (НИИ ВС), эпидемиологического отдела ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве» (ЦГиЭ), а также сотрудникам кафедры эпидемиологии и современных технологий вакцинации Института профессионального образования ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен локальным Этическим комитетом ФГБНУ НИИ ВС имени И.И. Мечникова (Протокол № 2 от 01.10.2018 г.).

Поступила 15.10.2021

Принята в печать 03.02.2022

Опубликована 28.02.2022

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-85>

Comparison of measles incidence in different age groups with the intensity of specific humoral immunity in healthcare workers in Moscow

Mikhail P. Kostinov^{1,2}, Pavel I. Zhuravlev³, Marina N. Loktionova², Anna D. Shmitko¹, Valentina B. Polishchuk¹, Andrei A. Tatarinchik³, Ol'ga A. Smirnova³, Ilya S. Fursov³

¹FSBRI «I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 105064, Moscow, Russia;

²FSAEI HE I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) of the Ministry of the Health of Russia, 119991, Moscow, Russia;

³FBIH «The Center of Hygiene and Epidemiology in Moscow» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), 129626, Moscow, Russia

Introduction. The study of the intensity of humoral immunity to the measles virus (*Paramyxoviridae: Morbillivirus*) (MV) remains relevant due to the ongoing registration of the cluster cases of measles (including nosocomial cases). The **aim** of the study was to analyze correlation between the intensity of the humoral immunity to measles virus and the measles incidence in different age groups of the Moscow residents.

Material and methods. A simple analytic study was carried out under the framework of measles prevention improvement program conducted in the subjects of the Russian Federation. The study included the analysis of the reasons for the increase in the proportion of seronegative individuals and the comparison of the results of sero-monitoring with the data of age-related measles incidence. Throughout 2018, total 1,855 blood serum samples obtained from employees of a large hospital center in Moscow who were previously vaccinated against measles were tested for IgG antibodies (ABs) to MV. The subjects were divided into 11 groups according to their age. Statistical analysis of the obtained data was performed using nonparametric criteria.

Results and discussion. The proportion of seronegative individuals among the staff of the medical facility decreased with age, from 38.5% in persons aged 19–23 to 0% among employees aged 64 and over. Persons aged 19–43 years were the most susceptible to measles infection, which was confirmed also by the highest incidence rate at these age groups (from 6.93 to 14.03 per 100,000 population). The age group most protected against measles was those over 64 years of age, who were all seropositive and had the lowest rates of incidence. This is probably due to the fact that by this age most of them have had a measles infection and have formed a sufficient immune response. At the same time, younger individuals living in the post-elimination era have only vaccine-induced ABs to MV, the level of which declines rapidly to non-protective values in the absence of boosterization due to the exposure to the wild-type strain of the pathogen.

Conclusion. The monitoring of the MV-specific IgG- AB levels is required for employees in the medical institutions under the age of 35. Administration of the single dose of the appropriate vaccine is recommended for seronegative individuals.

Key words: *collective immunity, measles, antibodies (ABs) to measles virus (MV), incidence*

For citation: Kostinov M.P., Zhuravlev P.I., Loktionova M.N., Shmitko A.D., Polishchuk V.B., Tatarinchik A.A., Smirnova O.A., Fursov I.S. Comparison of measles incidence in different age groups with the intensity of specific humoral immunity in healthcare workers in Moscow. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(1): 27-36 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-85>

For correspondence: Pavel I. Zhuravlev, Medical Epidemiologist, FBIH «The Center of Hygiene and Epidemiology in Moscow» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), 129626, Moscow, Russia. E-mail: pvazhurik@gmail.com

Information about the authors:

Kostinov M.P., <http://orcid.org/0000-0002-1382-9403>
Zhuravlev P.I., <https://orcid.org/0000-0002-0331-5580>
Loktionova M.N., <https://orcid.org/0000-0003-1332-519X>
Shmitko A.D., <https://orcid.org/0000-0002-7280-6877>
Polishchuk V.B., <https://orcid.org/0000-0003-0533-0909>
Tatarinchik A.A., <https://orcid.org/0000-0002-9254-2880>
Smirnova O.A., <http://orcid.org/0000-0002-3058-6538>
Fursov I.S., <http://orcid.org/0000-0001-9725-8013>

Contribution: Kostinov M.P. – study concept and design; Zhuravlev P.I. – experiments conducting, data collecting, analyzing and interpretation, preparing of the text; Loktionova M.N. – data analysis and interpretation; Shmitko A.D. – study concept and design, experiments conducting, preparing of the text; Polishchuk V.B. – experiments conducting; Tatarinchik A.A. – data analysis and interpretation, preparing of the text, statistical processing of research results; Smirnova O.A. – data collecting, analyzing and interpretation; Fursov I.S. – data collecting, analyzing and interpretation.

Funding. The research was funded by the State budget.

Acknowledgement. The authors express their gratitude to all employees of the Vaccine Prevention and Immunotherapy Laboratory of Allergic Diseases, FSBRI «I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera»; of the Epidemiological Department, FBIH «The Center of Hygiene and Epidemiology in Moscow»; and of the Epidemiology and Modern Vaccination Technologies Department, FSAEI HE I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University).

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Local Ethics Committee of the FSBRI «I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera» (Protocol No. 2 dated October 01, 2018).

Received 15 October 2021
Accepted 03 February 2022
Published 28 February 2022

Введение

До начала активной всеобщей иммунизации показатели заболеваемости корью (*Paramyxoviridae: Morbillivirus*) и летальности от этой инфекции среди детей раннего возраста были весьма высоки. Массовая вакцинация привела к резкому снижению заболеваемости, изменению её сезонности и периодичности [1]. В СССР массовая вакцинация населения с введением только одной дозы препарата против вируса кори (ВК) начата в 1968 г. и затем продолжена в Российской Федерации, а с 1987 г. осуществляется также ревакцинация – введение бустер-дозы. В настоящее время согласно Национальному календарю профилактических прививок России вакцинация против кори проводится детям в возрасте 12–15 мес. с обязательной ревакцинацией в 6–6,5 лет. Иммунизации подлежат все лица в возрасте до 35 лет, а также лица из групп риска в возрасте до 55 лет, ранее не болевшие корью, невакцинированные или привитые однократно, не имеющие сведений о прививках против этого заболевания.

В настоящее время корь перестаёт быть «детской» инфекцией, и среди пациентов преобладают старшие школьники, подростки и взрослые. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в РФ наивысшие показатели заболеваемости регистрируются в возрастной группе детей до 1 года, а наибольшую долю в возрастной структуре заболеваемости составляют лица 25–39 лет [1–5]. Особенности течения кори во взрослом возрасте являются резко выраженная гипертермия и интоксикация при относительно незначительном катаральном синдроме,

преобладание тяжёлых и среднетяжёлых клинических форм заболевания [2, 6]. В настоящее время в государствах Европы противокоревой вакцинации подвергается большее количество детей, чем когда-либо ранее. Вместе с тем эти высокие в среднем показатели вакцинации неравномерно распределяются как между странами, так и в пределах каждой из них, в результате чего всё более многочисленные группы населения оказываются уязвимыми перед этой инфекцией. Так, резкому росту заболеваемости корью в 2018 г. предшествовало достижение в Европейском регионе рекордно высокого показателя иммунизации второй дозой противокоревой вакцины [7]. Несмотря на значительный охват вакцинацией и ревакцинацией детей в декретированных возрастных категориях, данные официальной статистики относительно декретированных групп населения не всегда отражают реальную картину и часто завышены [8].

В России начиная с 2017 г. начался очередной эпидемический подъем заболеваемости корью. В 2019 г. зарегистрирован 4491 случай болезни, а показатель заболеваемости составил 3,06 на 100 тыс. населения, превысив таковой 2018 г. почти в 2 раза. В общей структуре заболеваемости большая часть случаев инфекции приходится на непривитых и лиц без прививочного анамнеза. Однако ежегодно 15–20% заболевших составляют вакцинированные и ревакцинированные, а в отдельные годы их доля достигает 30% [9–11].

Причиной заболеваемости среди привитых взрослых являются первичные или вторичные вакцинальные неудачи, когда 5–10% вакцинированных остаются серонегативными либо ответивший на вакцинацию

человек с возрастом теряет защитный уровень антител (АТ) класса IgG [12]. Многочисленные работы как отечественных, так и зарубежных авторов показывают, что несмотря на различие тактик вакцинации в разных странах (отличия в календарях прививок, разные годы начала массовой иммунизации), отчетливо прослеживается тенденция к уменьшению средних уровней АТ и возрастанию доли серонегативных лиц через 15–20 лет после ревакцинации [13, 14]. Исследования Н.А. Gans в Соединённых Штатах Америки (США) [15] и W. Janaszek в Польше [16], М.П. Костинова [17] в России продемонстрировали, что потеря пассивно полученных материнских АТ против кори у детей первого года жизни в постэлиминационную эру происходит значительно раньше, чем в годы до начала массовой иммунизации. [15–17]. Возможно, в условиях отсутствия бустеризации привитых лиц диким штаммом ВК уровень специфических IgG-АТ падает. Известно, что поствакцинальные уровни их хотя и достигают значения защитного порога у большинства привитых, всё же остаются значительно более низкими, чем после перенесённой инфекции [18]. В литературных источниках встречаются сообщения о вспышках кори среди привитого населения. В 2017 г. отмечено 9 случаев заболевания среди военнослужащих армии Израиля, при этом все они имели записи о пройденной вакцинации. Авторы отмечают, что ослабление иммунитета, вызванного вакцинацией, – это явление, требующее внимания, особенно в регионах, где уровень циркуляции дикого ВК низкий [19]. В исследовании, проведённом в Южной Корее (Республика Корея), с увеличением возраста испытуемых отмечалось снижение содержания специфических противокоревых IgG-АТ несмотря на высокий уровень вакцинации среди населения страны [20].

Одним из важнейших путей заражения, ведущим к увеличению риска возникновения вспышек кори, служит её внутрибольничная передача. Это заболевание контагиозно уже с конца инкубационного периода, а источником инфекции является человек, ещё не имеющий клинических симптомов, что значительно увеличивает риск занесения и распространения инфекции в стационаре [21–24].

Таким образом, в числе основных причин возникновения внутрибольничных вспышек кори следует назвать высокое репродуктивное число вируса, способность вирусного аэрозоля находиться в воздухе продолжительное время, неспецифический характер клинических симптомов в раннем периоде болезни, не позволяющий своевременно принимать адекватные меры. Среди особенностей внутрибольничных вспышек – более высокие показатели летальности и риска осложнений у пациентов, особенно у иммунокомпрометированных лиц [25–30]. Другой характерной чертой этих вспышек является быстрота распространения инфекции на фоне широкого круга контактных лиц [27, 31].

Регистрация эпизодов групповой заболеваемости на фоне высоких уровней охвата населения вакцина-

цией (95% и более) в медицинских организациях, где, как предполагается, медицинский персонал и поступающие в плановом порядке пациенты должны быть привиты против кори, свидетельствует о возможном недоучёте доли непривитого населения, неполной достоверности представляемых отчётных данных и большого количества серонегативных лиц в популяции.

Целью настоящего исследования явилось изучение связи напряжённости гуморального иммунитета к кори с заболеваемостью этой инфекцией среди различных возрастных групп жителей г. Москвы из числа медицинских работников.

Материал и методы

Простое аналитическое исследование осуществлялось в рамках программы совершенствования работы по профилактике кори в субъектах Российской Федерации с анализом причины роста доли серонегативных лиц и сопоставления результатов серомониторинга с данными по возрастной заболеваемости корью.

Контингент. С целью изучения возрастных особенностей противокорьевого гуморального иммунитета в 2018 г. у 1899 работников крупного больничного комплекса г. Москвы в возрасте от 19 до 93 лет определены сывороточные уровни АТ класса IgG к ВК. В анализ по возрасту распределения сывороточных уровней АТ класса IgG к ВК вошли 1855 образцов сывороток крови, так как данные о возрасте 44 сотрудников больницы указаны не были. Обследуемые были распределены по 11 группам с интервалом в 5 лет: 19–23, 24–28, 29–33, 34–38, 39–43, 44–48, 49–53, 54–58, 59–63, 64–68, 69 лет и старше (69+). Забор проб крови осуществлялся в утренние часы с соблюдением правил асептики и этических норм. У сотрудников на момент обследования не регистрировалось острых респираторных инфекций или обострений сопутствующих заболеваний.

В медицинской карте каждого работника имелись сведения, подтверждающие наличие вакцинации против кори, поскольку это является обязательным условием для работы в медицинском учреждении.

Критерии включения:

- 1) известный прививочный анамнез;
- 2) наличие документального подтверждения вакцинации и ревакцинации против кори;
- 3) исследуемый является сотрудником медицинской организации.

Поскольку на продукцию поствакцинальных АТ и длительность их сохранения могут оказывать влияние различные факторы, отражающие состояние здоровья респондентов, были определены *критерии невключения:*

- 1) присоединение острых респираторных инфекций в течение 5 дней после вакцинации;
- 2) имеющиеся противопоказания к введению вакцины против кори (согласно инструкции к препарату);
- 3) проводимое лечение иммуносупрессивными препаратами, системное введение или ингаляции вы-

соких доз кортикостероидов (свыше 800 мг в сутки беклометазона или беклометазонового эквивалента), лучевая терапия, приём цитотоксических препаратов или нестероидных противовоспалительных средств;

4) наличие ВИЧ-инфекции (положительный серологический тест), вирусного гепатита В (острая форма) и/или С (острая форма);

5) терапия иммуноглобулинами и другими продуктами переработки донорской крови в течение 90 дней до включения в исследование;

6) введение вакцинных препаратов в течение 30 дней до включения в исследование.

Заболеваемость в релевантных возрастных группах в соответствии с задачами исследования рассчитывалась исходя из зарегистрированных в АИС ОРУИБ (автоматизированная информационная система Отдела регистрации и учёта инфекционных болезней ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве») подтверждённых случаев кори и демографических показателей Управления Федеральной службы государственной статистики по г. Москве и Московской области за 2018 г.

Лабораторные методы. Организация работы по забору и транспортировке материала осуществлялась госпитальными эпидемиологами медицинской организации, исследование сывороток – сотрудниками лаборатории вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» (НИИ ВС).

Уровень АТ класса IgG к ВК в сыворотках крови определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-системы «Вектор-Корь-IgG» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Согласно прилагаемой нормативно-технической документации по расчёту количественного определения противокоревых IgG-АТ результат считали отрицательным, если концентрация АТ в исследуемом образце была $<0,12$ МЕ/мл, положительным при содержании АТ $\geq 0,18$ МЕ/мл и сомнительным – при $0,12-0,18$ МЕ/мл. Сыворотки с сомнительными значениями определяемого параметра были отнесены в группу негативных результатов, поскольку данный уровень АТ не может считаться достоверно протективным.

Статистический анализ. Статистическую обработку полученных данных выполняли при помощи пакетов прикладных программ Microsoft Excel 2010, STATISTICA for Windows v.10, AtteStat v.12.0.5. Нормальность распределения признаков определяли с использованием критерия Колмогорова–Смирнова, а также критерия χ^2 . Учитывая, что выборка не подчинялась закону нормального распределения, статистический анализ осуществляли с применением непараметрических критериев. Сравнение качественных признаков несвязанных выборок проводили с использованием критерия χ^2 для таблиц сопряжённости с поправкой Йейтса на непрерывность; при значениях ожидаемых чисел <5 пользовались двусторонним вариантом точного критерия Фишера.

В ходе корреляционного анализа связь между показателями оценивали как слабую при абсолютном значении коэффициента корреляции Спирмена $r \leq 0,25$, умеренную при $r = 0,25-0,75$ и сильную – при $r \geq 0,75$. Кроме того, выполняли анализ ROC-кривой (кривая рабочей характеристики приёмника, receiver operating characteristic curve) для модели прогноза наличия или отсутствия защитных уровней IgG-АТ к ВК в зависимости от возраста. Для описания среднего использовали критерий медианы и интерквартильный размах (Me [Q1; Q3]), стандартную ошибку среднего (m) и 95% доверительный интервал (ДИ); результаты считали достоверными при величине $p < 0,05$.

Исследование проводилось при информированном согласии его участников. Протокол исследования одобрен локальным Этическим комитетом ФГБНУ НИИ ВС им. И.И. Мечникова (Протокол № 2 от 01.10.2018).

Результаты

Первый этап исследования заключался в изучении особенностей повозрастного распределения уровней IgG-АТ к ВК и доли серонегативных лиц в каждой возрастной группе. Из общего количества исследованных 1899 образцов сывороток крови 278 (14,6%) были серонегативными к возбудителю, 1621 (85,4%) – серопозитивными (содержание антител класса IgG $\geq 0,18$ МЕ/мл). Средний уровень концентрации IgG-АТ к ВК составил $1,23 [0,36; 3,21]$ МЕ/мл.

При анализе долей серонегативных лиц в каждой возрастной группе установлено, что по мере увеличения возраста работников медучреждения доля серонегативных лиц снижалась с 38,5% для 19–23-летних до 0% среди сотрудников в возрастных группах 64–68 и старше 69 лет. При этом обращает на себя внимание тот факт, что самые молодые участники исследования (19–23 лет), получившие ревакцинацию в 6–7-летнем возрасте, спустя 13–17 лет составили группу с наибольшей долей (38,5%) серонегативных к вирусу. Группа работников в возрасте 24–48 лет также характеризовалась наличием большого количества серонегативных лиц – от 16,8 до 27,5%. Относительно респондентов старше 49 лет исследование показало, что доля серонегативных среди них значимо отличалась от таковой для 24–48-летних и была меньше в 2–3 раза ($p < 0,05$). Так, если среди лиц 49–58 лет она составляла 8,3–8,6%, то в группах более молодого возраста – от 16,8 до 27,5%. В число сотрудников 59–63 лет входили единичные лица без защитных уровней IgG-АТ (4,9%), а в группах старше 64 лет серонегативных не зарегистрировано. Таким образом, у работников больничного комплекса выявлены достоверные возрастные различия в долях имеющих защиту либо не защищённых от ВК, что может отражаться на заболеваемости коревой инфекцией в различных возрастных группах (**рис. 1, таблица**).

Установлено, что за 2018 год в г. Москве зарегистрирован 481 случай коревой инфекции у лиц старше 19 лет, 81 случай кори среди привитых, 71 случай, подозрительный на внутрибольничную заболеваемость (в т.ч. среди работников медицинских

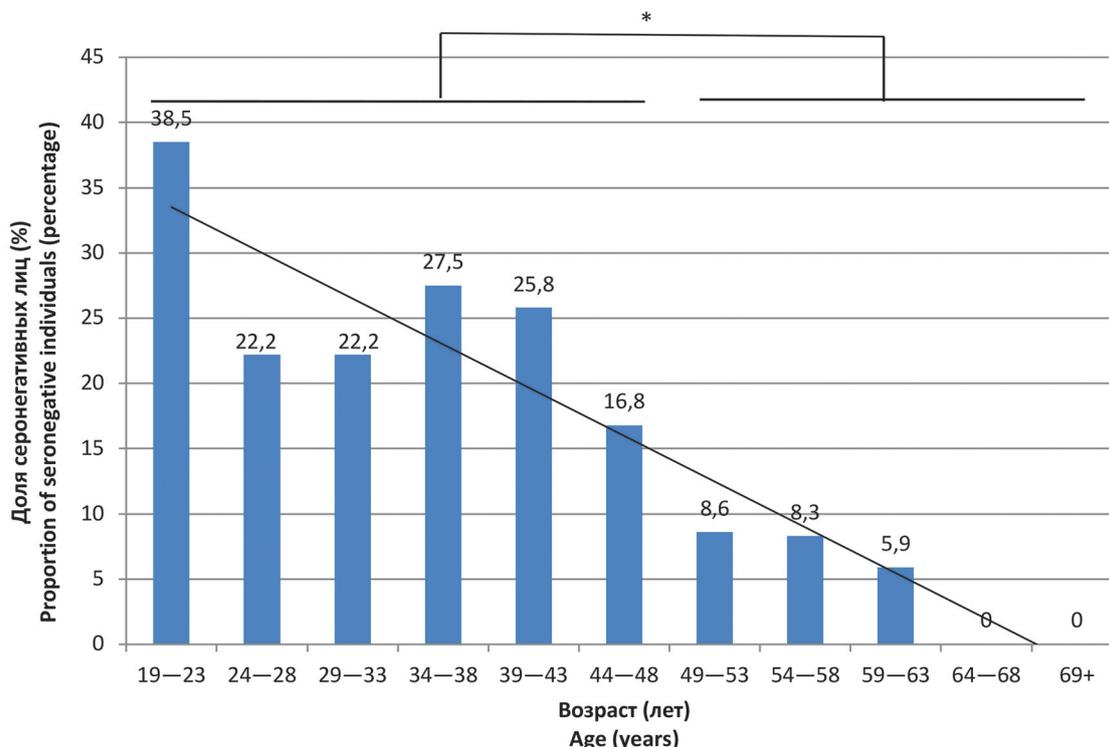


Рис. 1. Распределение доли серонегативных лиц (в процентах) к вирусу кори среди различных возрастных групп работников лечебного учреждения.

Примечание. По оси абсцисс размещены возрастные группы, по оси ординат – доля серонегативных лиц (в процентах);

* – достоверные различия по доле серонегативных лиц ($p < 0,05$) между возрастными группами 19–23...44–48 лет и 49–53...69+ лет.

Fig. 1. Distribution of the proportion (percentage) of individuals seronegative to the measles virus among different age groups of employees of the medical institution.

Note. Age groups are shown on the X-axis, and the percentage of seronegative individuals is shown on the Y-axis;

*, significant differences in the proportion of seronegative individuals ($p < 0.05$) between the age groups of 19–23...44–48 and 49–53...69+ years.

организаций), 27 случаев заболевания медработников корью. Наибольшее количество случаев кори среди взрослого населения приходилось на возрастную группу 39–43 года – 98 случаев (20,4% общей заболеваемости), при этом доля 19–23-летних составила 14,6%. Удельный вес той или иной группы в структуре заболеваемости возрастает с увеличением возраста вплоть до 39–43 лет. После 44–48 лет доля более старших возрастных групп не превышает 6,2%, снижаясь до 0% в интервале 64–68 лет (рис. 2, таблица).

В ходе анализа заболеваемости в различных возрастных группах выявлена следующая закономерность: наивысшие показатели установлены среди лиц наиболее молодого возраста – 19–23 лет (14,03 на 100 тыс. населения), а также 39–43-летних (10,19 на 100 тыс. населения). В возрастных группах от 24 до 38 лет также регистрируется достаточно высокая заболеваемость – от 6,93 до 8,28 на 100 тыс. населения. Начиная с группы 44–48 лет значение этого параметра резко снижается (более чем в 3 раза) – до 3,32 на 100 тыс. населения, постепенно достигая до 0 у лиц старше 63 лет. При сравнении удельного веса серонегативных лиц и заболеваемости в выделенных возрастных группах (рис. 2, таблица) видно, как показатель заболеваемо-

сти повторяет рост и падение значения количества серонегативных результатов.

При анализе корреляционной зависимости заболеваемости корью и доли серонегативных к ВК лиц среди различных возрастных групп работников лечебного учреждения г. Москвы на протяжении 2018 г. установлена сильная прямая корреляционная зависимость (коэффициент корреляции 0,97) ($p < 0,001$).

Обращают на себя внимание результаты построения ROC-кривой анализа чувствительности/специфичности возраста для прогноза наличия/отсутствия АТ к ВК. Площадь под ROC-кривой, соответствующей взаимосвязи прогноза наличия АТ и возраста, была равной 0,015 (95% ДИ: 0,681–0,740). Полученная модель была статистически значимой ($p < 0,001$). Пороговое значение возраста в точке отсечения (cut-off) составило 34,5 года. В случае если возраст человека равен данной величине или превышает её, прогнозируется наличие уровня IgG-АТ к ВК выше пороговых значений. Чувствительность и специфичность метода составили 86,4 и 73,6% соответственно (рис. 3).

Обсуждение

Учащение случаев возникновения очагов коревой инфекции (в т.ч. в медицинских учреждениях), при кото-

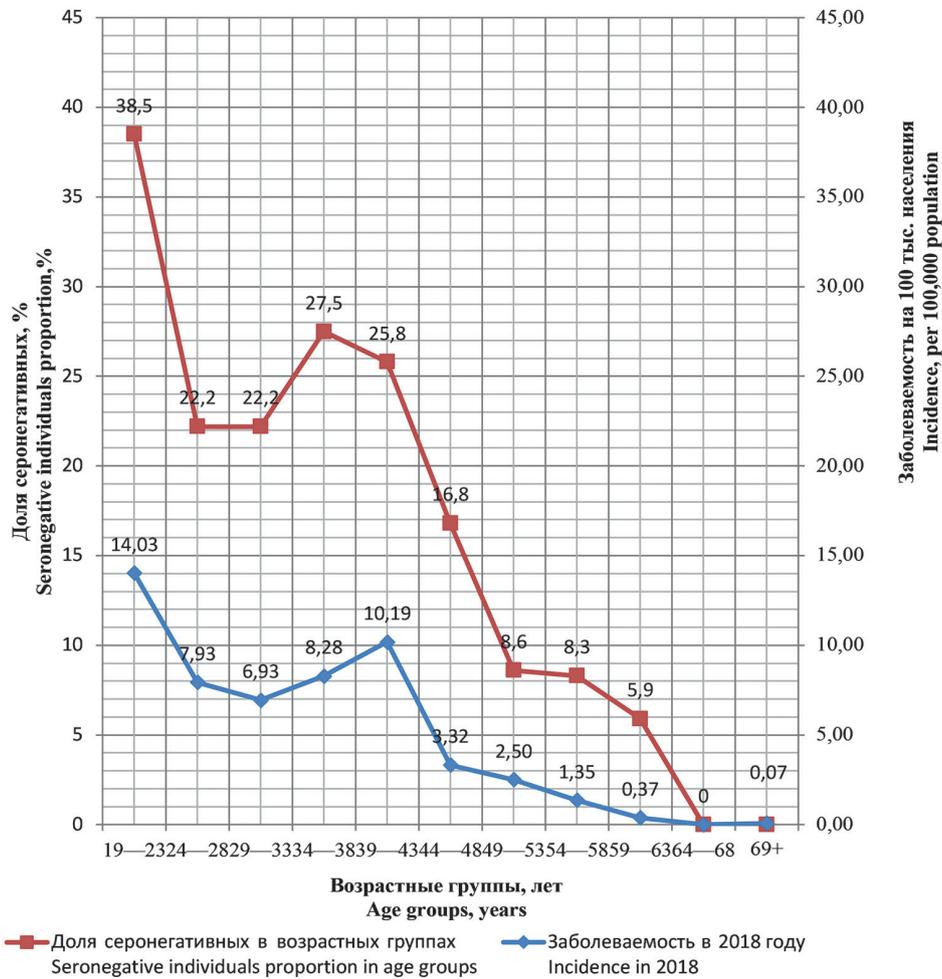


Рис. 2. Сравнение долей (в процентах) серонегативных лиц с заболеваемостью (1 на 100 тыс. населения) в различных возрастных группах среди жителей г. Москвы.

Примечание. По оси абсцисс размещены возрастные группы, по оси ординат (слева) – доля (в процентах) серонегативных лиц, по дополнительной оси ординат (справа) – заболеваемость на 100 тыс. населения.

Fig. 2. Comparison of the proportion (percentage) of seronegative individuals with incidence (per 100,000 population) in various age groups among Moscow residents.

Note. The age groups are shown on the X-axis, the percentage of seronegative individuals is shown on the Y-axis (on the left), and the incidence rate per 100,000 population is shown on the additional Y-axis (on the right).

Таблица. Сравнение доли серонегативных лиц с заболеваемостью в различных возрастных группах среди жителей города Москвы (в процентах)

Table. Comparison of the proportion of seronegative individuals with incidence in different age groups of the Moscow residents (percentage)

Возраст (лет) / Age (years)	Число случаев заболевания за 2018 г. / Number of cases in 2018	Заболеемость в 2018 г. на 100 тыс. населения / Incidence in 2018, per 100,000 population	Доля от всех случаев кори в 2018 г. (%) / Proportion among all measles cases in 2018 (percentage)	Доля серонегативных в возрастных группах (%) / Proportion of seronegative individuals in age groups (percentage)
19–23	70	14,03	14,6	38,5
24–28	74	7,93	15,4	22,2
29–33	80	6,93	16,6	22,2
34–38	91	8,28	18,9	27,5
39–43	98	10,19	20,4	25,8
44–48	30	3,32	6,2	16,8
49–53	21	2,50	4,4	8,6
54–58	13	1,35	2,7	8,3
59–63	3	0,37	0,6	5,9
64–68	0	0,00	0,0	0,0
69+	1	0,07	0,2	0,0

рых всегда обращается внимание на наличие вакцинации против данного заболевания, послужило главным мотивирующим фактором при проведении настоящего исследования. Продемонстрировано, что среди работников больничного комплекса г. Москвы в возрасте от 19 до 43 лет имеется высокая доля серонегативности: от 38,5 до 25,8% респондентов не имеют защитных уровней IgG-АТ. Относительно большое количество таких лиц не укладывается в условно безопасный диапазон (около 7% серонегативных) по созданию благоприятной эпидемиологической обстановки, в связи с чем сохраняется риск по возникновению очаговой заболеваемости, включая внутрибольничное распространение.

Люди молодого возраста (от 19 до 43 лет) оказались самыми восприимчивыми к коревой инфекции, о чём свидетельствуют не только наибольшая доля серонегативных результатов (от 22,2 до 38,5%), но и наивысший показатель заболеваемости в данных возрастных группах (от 6,93 до 14,03 на 100 тыс. населения). Вероятно, это связано с потерей защитного уровня поствакцинальных IgG-АТ к ВК с возрастом либо с первичными вакцинальными неудачами.

Большой удельный вес серонегативных среди молодых участников исследования соответствует более

высоким показателям заболеваемости в этом возрасте, что дополнительно подтверждает целесообразность отнесения лиц до 45 лет в группу риска по инфицированию корью.

Самая защищённая от кори возрастная группа – это люди от 64 лет и старше, среди которых не выявлено серонегативных и заболеваемость была наименьшей, что может быть обусловлено перенесённой большинством из них коревой инфекцией с формированием достаточного иммунного ответа. В то же время лица более молодого возраста, живущие в постэлиминационную эру, имеют лишь поствакцинальные противокоревые АТ, уровень которых при отсутствии бустеризации диким штаммом вируса быстро снижается до низких и непротективных концентраций. В ходе исследования нами выделена группа риска по инфицированию ВК, в которой до 38,5% лиц не имеют защитных уровней АТ к возбудителю.

В настоящей работе подтверждена сильная положительная корреляционная связь заболеваемости корью с напряжённостью гуморального иммунитета. Таким образом, серологический мониторинг в отношении этой нозологической формы на современном этапе

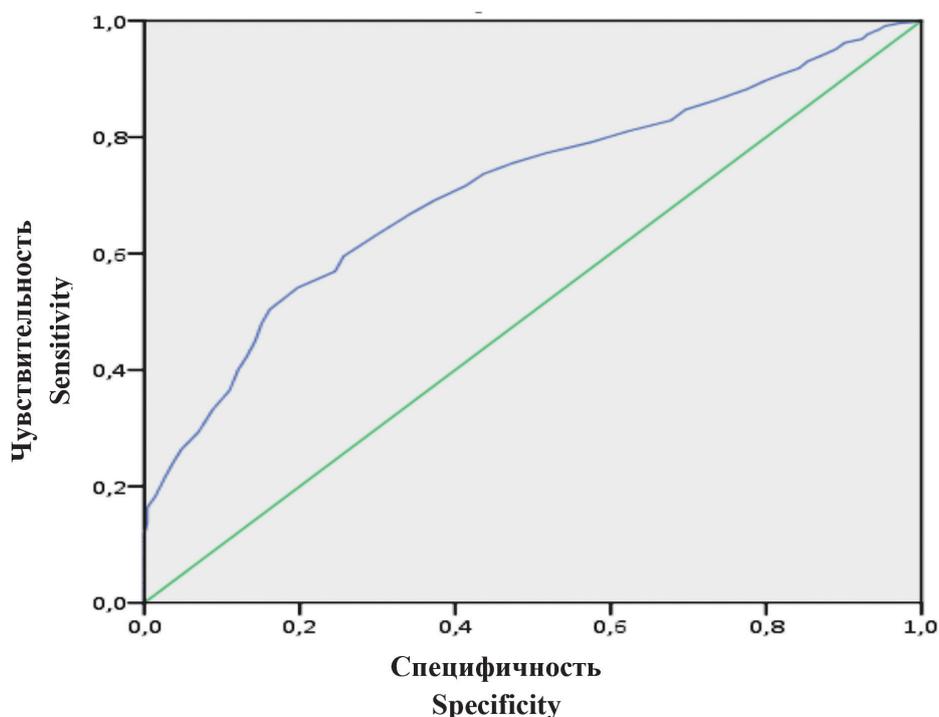


Рис. 3. ROC-кривая анализа чувствительности и специфичности возраста для прогноза наличия или отсутствия защитных уровней антител класса IgG к вирусу кори.

Примечание. По оси абсцисс размещена чувствительность доли объектов от общего количества носителей признака, верно классифицированных как несущие признак; по оси ординат – специфичность доли объектов от общего количества носителей признака, верно классифицированных как несущие признак.

Fig. 3. ROC curve of the age-related sensitivity and specificity analysis for predicting the presence or absence of protective levels of IgG antibodies to measles virus.

Note. The X-axis shows the sensitivity of the proportion of objects from the total number of carriers of the attribute that were correctly classified as carriers of the attribute, and the Y-axis shows the specificity of the proportion of objects from the total number of carriers of the attribute that were correctly classified as carriers of the attribute.

адекватно отражает тенденции и динамику заболеваемости корью и позволяет своевременно и оперативно принимать необходимые управленческие решения с целью профилактики коревой инфекции в популяции. Кроме того, определение напряжённости гуморального иммунитета с целью изучения состояния популяционного иммунитета является наиболее предпочтительным ввиду низких трудозатрат на проведение исследований, доступности метода и возможности его унификации.

Нами также определено пороговое значение возраста (34,5 лет), для которого прогнозируется наличие уровня IgG-АТ к ВК выше пороговых значений, что также может иметь значение при планировании мероприятий по вакцинации определённых групп населения (в т.ч. с учётом профессиональной принадлежности).

Заключение

Таким образом, обобщая полученные результаты, представляется целесообразным проводить сотрудникам медицинских организаций в возрасте до 35 лет мониторинг уровня IgG-АТ к ВК. Серонегативным к данному инфекционному агенту показано однократное введение соответствующего вакцинного препарата. В перспективе необходимо продолжить изучение структуры и уровня гуморального иммунитета к кори у населения (включая детей и подростков) с целью определения групп повышенного риска и принятия своевременных управленческих решений на основании данных серологического мониторинга.

ЛИТЕРАТУРА

- Зверев В.В., Юминова Н.В. Вакцинопрофилактика вирусных инфекций от Э. Дженнера до настоящего времени. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(S1): 33–42.
- ВОЗ. Корь: Информационный бюллетень. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/measles> (accessed December 14, 2021).
- Цвиркун О.В., Тихонова Н.Т., Ющенко Г.В., Герасимова А.Г. Эпидемический процесс кори в разные периоды её вакцинопрофилактики. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2015; 14(2): 80–7.
- Цвиркун О.В., Герасимова А.Г., Тихонова Н.Т., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Дубовицкая Е.Л., и др. Заболеваемость корью в разных возрастных группах в период элиминации инфекции. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2017; 16(3): 18–25.
- Семенов Т.А., Ежлова Е.Б., Ноздрачёва А.В., Русакова Е.В. Особенности проявлений эпидемического процесса кори в Москве в 1992–2014 годах. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2015; 14(6): 16–22.
- ВОЗ. В результате всплеска заболеваемости корью в мире умерло 140 000 человек. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/detail/05-12-2019-more-than-140-000-die-from-measles-as-cases-surge-worldwide> (accessed December 14, 2021).
- WHO. Country slides (measles). Available at: https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/Country_slides_measles.pptx?ua=1 (accessed December 14, 2021).
- Ноздрачёва А.В., Семенов Т.А., Асатрян М.Н., Шмыр И.С., Ершов И.Ф., Соловьёв Д.В., и др. Иммунологическая восприимчивость населения мегаполиса к кори на этапе её элиминации. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2019; 18(2): 18–26. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-2-18-26>
- Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2017 году». Москва; 2018.
- Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году». Москва; 2019.
- Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году». Москва; 2020.
- Топтыгина А.П., Андреев Ю.Ю., Смердова М.А., Наврузова Л.Н., Малеев В.В. Сопоставление гуморального иммунного ответа у взрослых, больных корью, и привитых от этой инфекции. *Инфекция и иммунитет*. 2021; 11(3): 517–22. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-СНИ-1396>
- Костинов М.П., Филатов Н.Н., Журавлев П.И., Гладкова Л.С., Полищук В.Б., Шмитько А.Д., и др. Уровень коллективного иммунитета к вирусу кори у сотрудников отдельной больницы в рамках государственной программы элиминации кори. *Инфекция и иммунитет*. 2020; 10(1): 129–36. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-ЛОМ-690>
- Костинов М.П., Шмитько А.Д., Соловьёва И.Л., Сависько А.А., Полищук В.Б., Рыжов А.А., и др. Необходима ли третья доза вакцины против кори – взгляд иммунолога. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; (5): 88–94. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2016-5-88-94>
- Gans H.A., Yasukawa L.L., Alderson A., Rinki M., DeHovitz R., Beeler J., et al. Humoral and cell-mediated immune responses to an early 2-dose measles vaccination regimen in the United States. *J. Infect. Dis.* 2004; 190(1): 83–90. <https://doi.org/10.1086/421032>
- Janaszek W., Gut W., Gay N.J. The epidemiology of measles in Poland: prevalence of measles virus antibodies in the population. *Epidemiol. Infect.* 2000; 125(2): 385–92. <https://doi.org/10.1017/S0950268899004616>
- Костинов М.П., Шмитько А.Д., Бочарова И.И., Черданцев А.П., Сависько А.А., Полищук В.Б. Уровень IgG-антител к вирусу кори в пуповинной крови новорождённых с учётом возраста матерей. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2014; 19(3): 30–4.
- Топтыгина А.П., Мамаева Т.А., Алёшкин В.А. Особенности специфического гуморального иммунного ответа против вируса кори. *Инфекция и иммунитет*. 2013; 3(3): 243–50.
- Avramovich E., Indenbaum V., Haber M., Amitai Z., Tsifanski E., Farjun S., et al. Measles outbreak in a highly vaccinated population – Israel, July–August 2017. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2018; 67(42): 1186–8. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6742a4>
- Kang H.J., Han Y.W., Kim S.J., Kim Y.J., Kim A.R., Kim J.A., et al. An increasing, potentially measles-susceptible population over time after vaccination in Korea. *Vaccine*. 2017; 35(33): 4126–32. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.06.058>
- Biellik R.J., Clements C.J. Strategies for minimizing nosocomial measles transmission. *Bull. World Health Organ.* 1997; 75(4): 367–75.
- Mossong J., Muller C.P. Estimation of the basic reproduction number of measles during an outbreak in a partially vaccinated population. *Epidemiol. Infect.* 2000; 124(2): 273–8. <https://doi.org/10.1017/S0950268899003672>
- Mossong J., O’Callaghan C.J., Ratnam S. Modelling antibody response to measles vaccine and subsequent waning of immunity in a low exposure population. *Vaccine*. 2000; 19(4-5): 523–9. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00175-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00175-4)
- Perry R.T., Halsey N.A. The clinical significance of measles: a review. *J. Infect. Dis.* 2004; 189(Suppl. 1): 4–16. <https://doi.org/10.1086/377712>
- Bloch A.B., Orenstein W.A., Ewing W.M., Spain W.H., Mallison G.F., Herrmann K.L., et al. Measles outbreak in a pediatric practice: airborne transmission in an office setting. *Pediatrics*. 1985; 75(4): 676–83.
- Chen S.Y., Anderson S., Kutty P.K., Lugo F., McDonald M., Rota P.A., et al. Health care-associated measles outbreak in the United States after an importation: challenges and economic impact. *J. Infect. Dis.* 2011; 203(11): 1517–25. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir115>
- Choi W.S., Sniadack D.H., Jee Y., Go U.Y., So J.S., Cho H., et al. Outbreak of measles in the Republic of Korea, 2007: importance of nosocomial transmission. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(Suppl. 1): S483–90. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir087>
- Davidson N., Andrews R., Riddell M., Leydon J., Lynch P. Outbreak investigation team. A measles outbreak among young adults in Victoria, February 2001. *Commun. Dis. Intell. Q. Rep.* 2002; 26(2): 273–8.
- Marshall T.M., Hlatswayo D., Schoub B. Nosocomial outbreaks – a potential threat to the elimination of measles. *J. Infect. Dis.* 2003; 187(Suppl. 1): S97–101. <https://doi.org/10.1086/368041>

30. Remington P.L., Hall W.N., Davis I.H., Herald A., Gunn R.A. Airborne transmission of measles in a physician's office. *JAMA*. 1985; 253(11): 1574–7.
31. Weston K.M., Dwyer D.E., Ratnamohan M., McPhie K., Chan S.W., Branley J.M., et al. Nosocomial and community transmission of measles virus genotype D8 imported by a returning traveller from Nepal. *Commun. Dis. Intell. Q. Rep.* 2006; 30(3): 358–65.

REFERENCES

1. Zverev V.V., Yuminova N.V. Vaccines. Prevention of viral infections from E. Jenner to date [*Vaksinoprofilaktika virusnykh infektsiy ot E. Dzhennera do nastoyashchego vremeni*]. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(S1): 33–42. (in Russian)
2. WHO. Measles: Fact sheet. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/measles> (accessed December 14, 2021).
3. Tsvirkun O.V., Tikhonova N.T., Yushchenko G.V., Gerasimova A.G. Measles epidemic process in various vaccinal periods [*Epidemicheskii protsess kori v raznye periody ee vaksinoprofilaktiki*]. *Epidemiologiya i Vaksino-profilaktika*. 2015; 14(2): 80–7. (in Russian)
4. Tsvirkun O.V., Gerasimova A.G., Tikhonova N.T., Ezhlova E.B., Mel'nikova A.A., Dubovitskaya E.L., et al. Measles cases by age group during the elimination of infection [*Zabolevaemost' kor'yu v raznykh vozrastnykh gruppakh v period eliminatsii infektsii*]. *Epidemiologiya i Vaksino-profilaktika*. 2017; 16(3): 18–25. (in Russian)
5. Semenenko T.A., Ezhlova E.B., Nozdracheva A.V., Rusakova E.V. Manifestation features of the measles epidemic process in Moscow in 1992–2014 [*Osobennosti proyavleniy epidemicheskogo protsesa kori v Moskve v 1992–2014 godakh*]. *Epidemiologiya i Vaksino-profilaktika*. 2015; 14(6): 16–22. (in Russian)
6. WHO. More than 140,000 die from measles as cases surge worldwide. Available at: <https://www.who.int/news/item/05-12-2019-more-than-140-000-die-from-measles-as-cases-surge-worldwide> (accessed December 14, 2021).
7. WHO. Country slides (measles). Available at: https://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/burden/vpd/surveillance_type/Country_slides_measles.pptx?ua=1 (accessed December 14, 2021).
8. Nozdracheva A.V., Semenenko T.A., Asatryan M.N., Shmyr I.S., Ershov I.F., Solov'ev D.V., et al. Immunological susceptibility of metropolis population to measles in its elimination stage [*Immunologicheskaya vosprimchivost' naseleniya megapolisa k kori na etape ee eliminatsii*]. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika*. 2019; 18(2): 18–26. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-2-18-26> (in Russian)
9. State report «On the state sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2017». Moscow; 2018. (in Russian)
10. State report «On the state sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2018». Moscow; 2019. (in Russian)
11. State report «On the state sanitary and epidemiological welfare of the population in the Russian Federation in 2019». Moscow; 2020. (in Russian)
12. Toptygina A.P., Andreev Yu. Yu., Smerdova M.A., Navruzova L.N., Maleev V.V. Comparison of humoral immune response in adults with measles and vaccinated against this infection [*Sopostavlenie gumoral'nogo immunnogo otveta u vzroslykh, bol'nykh kor'yu, i privitykh ot etoy infektsii*]. *Infektsiya i immunitet*. 2021; 11(3): 517–22. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-CHI-1396> (in Russian)
13. Kostinov M.P., Filatov N.N., Zhuravlev P.I., Gladkova L.S., Polishchuk V.B., Shmit'ko A.D., et al. Level of measles herd immunity assessed in hospital medical workers within a framework of the state measles elimination program [*Uroven'kollektivnogo immuniteta k virusu kori u sotrudnikov otdel'noy bol'nitsy v ramkakh gosudarstvennoy programmy eliminatsii kori*]. *Infektsiya i immunitet*. 2020; 10(1): 129–36. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-LOM-690> (in Russian)
14. Kostinov M.P., Shmit'ko A.D., Solov'eva I.L., Savis'ko A.A., Polishchuk V.B., Ryzhov A.A., et al. Is a third dose of measles vaccine necessary – an immunologist's view [*Neobkhodima li tret'ya doza vaksiny protiv kori – vzglyad immunologa*]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2016; (5): 88–94. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2016-5-88-94> (in Russian)
15. Gans H.A., Yasukawa L.L., Alderson A., Rinki M., DeHovitz R., Beeler J., et al. Humoral and cell-mediated immune responses to an early 2-dose measles vaccination regimen in the United States. *J. Infect. Dis.* 2004; 190(1): 83–90. <https://doi.org/10.1086/421032>
16. Janaszek W., Gut W., Gay N.J. The epidemiology of measles in Poland: prevalence of measles virus antibodies in the population. *Epidemiol. Infect.* 2000; 125(2): 385–92. <https://doi.org/10.1017/S0950268899004616>
17. Kostinov M.P., Shmit'ko A.D., Bocharova I.I., Cherdantsev A.P., Savis'ko A.A., Polishchuk V.B. Measles virus-specific igg-antibodies level in umbilical cord blood according to the maternal age [*Uroven' IgG-antitel k virusu kori v pupovinnoy krovi novorozhdennykh s uchedom vozrasta matery*]. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2014; 19(3): 30–4. (in Russian)
18. Toptygina A.P., Mamaeva T.A., Aleshkin V.A. Peculiarities of specific humoral measles immune response [*Osobennosti spetsificheskogo gumoral'nogo immunnogo otveta protiv virusa kori*]. *Infektsiya i immunitet*. 2013; 3(3): 243–50. (in Russian)
19. Avramovich E., Indenbaum V., Haber M., Amitai Z., Tsifanski E., Farjun S., et al. Measles outbreak in a highly vaccinated population – Israel, July–August 2017. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2018; 67(42): 1186–8. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6742a4>
20. Kang H.J., Han Y.W., Kim S.J., Kim Y.J., Kim A.R., Kim J.A., et al. An increasing, potentially measles-susceptible population over time after vaccination in Korea. *Vaccine*. 2017; 35(33): 4126–32. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.06.058>
21. Biellik R.J., Clements C.J. Strategies for minimizing nosocomial measles transmission. *Bull. World Health Organ.* 1997; 75(4): 367–75.
22. Mossong J., Muller C.P. Estimation of the basic reproduction number of measles during an outbreak in a partially vaccinated population. *Epidemiol. Infect.* 2000; 124(2): 273–8. <https://doi.org/10.1017/S0950268899003672>
23. Mossong J., O'Callaghan C.J., Ratnam S. Modelling antibody response to measles vaccine and subsequent waning of immunity in a low exposure population. *Vaccine*. 2000; 19(4-5): 523–9. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(00\)00175-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(00)00175-4)
24. Perry R.T., Halsey N.A. The clinical significance of measles: a review. *J. Infect. Dis.* 2004; 189(Suppl. 1): 4–16. <https://doi.org/10.1086/377712>
25. Bloch A.B., Orenstein W.A., Ewing W.M., Spain W.H., Mallison G.F., Herrmann K.L., et al. Measles outbreak in a pediatric practice: airborne transmission in an office setting. *Pediatrics*. 1985; 75(4): 676–83.
26. Chen S.Y., Anderson S., Kutty P.K., Lugo F., McDonald M., Rota P.A., et al. Health care-associated measles outbreak in the United States after an importation: challenges and economic impact. *J. Infect. Dis.* 2011; 203(11): 1517–25. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir115>
27. Choi W.S., Sniadack D.H., Jee Y., Go U.Y., So J.S., Cho H., et al. Outbreak of measles in the Republic of Korea, 2007: importance of nosocomial transmission. *J. Infect. Dis.* 2011; 204(Suppl. 1): S483–90. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir087>
28. Davidson N., Andrews R., Riddell M., Leydon J., Lynch P. Outbreak investigation team. A measles outbreak among young adults in Victoria, February 2001. *Commun. Dis. Intell. Q. Rep.* 2002; 26(2): 273–8.
29. Marshall T.M., Hlatswayo D., Schoub B. Nosocomial outbreaks – a potential threat to the elimination of measles. *J. Infect. Dis.* 2003; 187(Suppl. 1): S97–101. <https://doi.org/10.1086/368041>
30. Remington P.L., Hall W.N., Davis I.H., Herald A., Gunn R.A. Airborne transmission of measles in a physician's office. *JAMA*. 1985; 253(11): 1574–7.
31. Weston K.M., Dwyer D.E., Ratnamohan M., McPhie K., Chan S.W., Branley J.M., et al. Nosocomial and community transmission of measles virus genotype D8 imported by a returning traveller from Nepal. *Commun. Dis. Intell. Q. Rep.* 2006; 30(3): 358–65.

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-90>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Мутации в гене *UL97* цитомегаловируса (*Herpesvirales: Herpesviridae: Cytomegalovirus: Human betaherpesvirus 5*), ассоциированные с устойчивостью к ганцикловиру, у реципиентов аллогенных стволовых гемопоэтических клеток

Демин М.В.¹, Тихомиров Д.С.¹, Бидерман Б.В.¹, Дроков М.Ю.¹, Судариков А.Б.¹, Туполева Т.А.¹, Филатов Ф.П.^{2,3}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, 125167, Москва, Россия;²

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

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

Введение. Инфекция, вызываемая цитомегаловирусом (*Herpesvirales: Herpesviridae: Cytomegalovirus: Human betaherpesvirus 5*) (ЦМВ), является серьезной проблемой для пациентов с ослабленной системой иммунной защиты, в число которых входят лица с депрессиями кроветворения. В случае возникновения ЦМВ-ассоциированных осложнений возникает необходимость в проведении противовирусной терапии. Однако в ходе естественного мутационного процесса, особенно при длительном использовании препаратов в субоптимальных дозах, могут возникнуть штаммы ЦМВ, устойчивые к действию противовирусных препаратов (таких, как ганцикловир, валганцикловир). Гипотетически возникновение устойчивости у вируса может являться причиной более агрессивного течения инфекции, неэффективности противовирусной терапии и, как следствие, увеличения количества смертельных исходов. В связи с этим своевременное выявление мутаций, которые потенциально могут привести к устойчивости вируса к противовирусным препаратам при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), а также при трансплантации органов и тканей, может оказаться важным при принятии терапевтического решения. Мы приводим описание трех клинических случаев, для которых проанализирована динамика появления мутантного штамма ЦМВ по гену *UL97*, коррелирующая с вирусной нагрузкой и клинической картиной.

Цель исследования – определение периода возникновения в гене *UL97* фосфотрансферазы ЦМВ мутаций, ассоциированных с устойчивостью к действию противовирусных препаратов, у пациентов с гемобластозами после трансплантации аллогенных стволовых гемопоэтических клеток (алло-ГСК).

Материал и методы. В исследование вошли 48 образцов ДНК ЦМВ, выделенной из периферической крови 3 реципиентов алло-ГСК с ЦМВ-инфекцией, находившихся на лечении в клиниках ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» («НМИЦ гематологии») Минздрава России с онкогематологическими заболеваниями в 2015–2017 гг. Пациенты получили условные коды (ПР, ПД и ФС). У всех исследуемых выявлены мутации, ассоциированные с резистентностью к противовирусной терапии (ПВТ). Для поиска мутаций применялся метод секвенирования по Сэнгеру. Полученные последовательности ДНК подвергались анализу с помощью программного обеспечения Nucleotide BLAST и Genome compiler. Поиск мутаций осуществлялся в программе MRA mutation resistance analyzer. При помощи данного программной среды нуклеотидные последовательности сравнивались с референсной последовательностью *UL97* штамма ЦМВ Merlin.

Результаты и обсуждение. Для всех пациентов, у которых обнаружены штаммы вируса, содержащие мутации С592G (ПР), С607F (ПД) и С603W (ФС), определены моменты возникновения мутационных изменений – на 187, 124 и 1184 день после трансплантации соответственно. Показано, что появление мутаций с высоким фактором резистентности сопровождается ростом вирусной нагрузки (ВН), появлением характерной клинической картины и отсутствием адекватного ответа на лечение ганцикловиром и его производными.

Заключение. С использованием полученных результатов предполагается разработка тест-системы на основе полимеразной цепной реакции (рПЦР; random polymerase chain reaction, rPCR) для детекции мутаций в наиболее часто встречающихся кодонах: М460I/V, С592G, А591V, А594T/V, L595F/S, С603W. Учитывая, что данные по распространенности мутационных изменений получены из зарубежных источников, целесообразно проведение аналогичных исследований о частоте встречаемости мутаций в гене *UL97* среди популяции РФ с целью повышения качества и точности тест-систем.

Ключевые слова: цитомегаловирус (ЦМВ) человека; трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ГСК); вирусная хемотрезистентность; ганцикловир; противовирусная терапия (ПВТ)

Для цитирования: Демин М.В., Тихомиров Д.С., Бидерман Б.В., Дроков М.Ю., Судариков А.Б., Туполева Т.А., Филатов Ф.П. Мутации в гене *UL97* цитомегаловируса (*Herpesvirales; Herpesviridae; Cytomegalovirus: Human betaherpesvirus 5*), ассоциированные с устойчивостью к ганцикловиру, у реципиентов аллогенных стволовых гемопоэтических клеток. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(1): 37–47.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-90>

Для корреспонденции: Демин Михаил Валерьевич, биолог, научный сотрудник лаборатории вирусологической безопасности, ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, 125167, Москва, Россия. E-mail: memindisha@gmail.com

Участие авторов: Демин М.В. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи; Тихомиров Д.С. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи; Бидерман Б.В. – сбор, анализ и интерпретация данных; Дроков М.Ю. – интерпретация данных, подготовка текста статьи; Судариков А.Б. – одобрение окончательного варианта статьи для публикации; Туполева Т.А. – одобрение окончательного варианта статьи для публикации; Филатов Ф.П. – одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

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 локальным Этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России (Протокол № 160 от 23.12.2021).

Поступила 17.12.2021

Принята в печать 14.01.2022

Опубликована 28.02.2022

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-90>

Mutations in the *UL97* gene of cytomegalovirus (*Herpesvirales: Herpesviridae: Cytomegalovirus: Human betaherpesvirus 5*) associated with ganciclovir resistance in recipients of allogeneic hematopoietic stem cells

Mikhail V. Demin¹, Dmitry S. Tikhomirov¹, Bella V. Biderman¹, Mikhail Yu. Drovkov¹, Andrey B. Sudarikov¹, Tatiana A. Tupoleva¹, Felix P. Filatov^{2,3}

¹FSBI «National Medical Research Center for Hematology» of the Ministry of Health of Russia, 125167, Moscow, Russia;

²FSBRI «I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 105064, Moscow, Russia;

³FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia

Introduction. Infection caused by cytomegalovirus (CMV) is a serious problem for patients with weakened immunity, including patients with hematopoietic depression. The cases of complications associated with cytomegalovirus require antiviral therapy. However, during the natural mutation process, especially with prolonged use of drugs in suboptimal doses, CMV strains resistant to the action of antiviral drugs (such as ganciclovir, valganciclovir) may occur. Hypothetically, the emergence of resistance in the virus may cause a more aggressive course of infection, the ineffectiveness of antiviral therapy and, as a result, an increase in the number of deaths. In this regard, timely detection of mutations that can potentially lead to the resistance of the virus to antiviral drugs during hematopoietic stem cell transplantation (HSCT), as well as during organ and tissue transplantation, may be important when making a therapeutic decision. We describe three clinical cases for which the dynamics of the appearance of a mutant strain of CMV by the *UL97* gene, which correlates with the viral load and clinical picture, is analyzed. The **aim** of the study was to determine the timing of the occurrence of mutations in CMV phosphotransferase *UL97* gene associated with resistance to antiviral drugs in patients with hemoblastoses after allogeneic hematopoietic stem cell (allo-HSCs) transplantation.

Material and methods. The study included 48 samples of CMV DNA isolated from the peripheral blood of three allo-HSCs recipients with CMV infection who were treated in the clinics of the FSBI «National Medical Research Center for Hematology» of the Ministry of Health of Russia with oncohematological diseases during 2015–2017. Patients received conditional codes (PR, PD, and FS). Mutations associated with antiviral therapy (AVT) resistance were identified in all patients. Sanger sequencing was used for mutation detection. The obtained DNA sequences were analyzed using Nucleotide BLAST and Genome compiler software. Mutations were searched in MRA mutation resistance analyzer software. The nucleotide sequences were compared with the *UL97* reference sequence of the Merlin CMV strain using this software environment.

Results and discussion. For all patients in whom the virus strains containing C592G (PR), C607F (PD) and C603W (FS) mutations were detected, the timing of the mutation occurrence was determined at days 187, 124 and 1184, respectively. The emergence of mutations with a high resistance factor was shown to be accompanied by an increase in viral load (VL), the appearance of a clinical picture characteristic of CMV infection and a lack of an adequate response to therapy with ganciclovir and its derivatives.

Conclusion. Using these results, it is proposed to develop the test system based on random polymerase chain reaction (rPCR) to detect mutations in the most frequently encountered codons: M460I/V, C592G, A591V, A594T/V, L595F/S, C603W. Given that the data on the prevalence of these mutations were obtained from foreign sources, it is advisable to conduct similar studies on the frequency of mutations in the *UL97* gene among the population of the Russian Federation in order to improve the quality and accuracy of test systems.

Keywords: *human cytomegalovirus (CMV), hematopoietic stem cells (HSCs) transplantation, viral chemoresistance, ganciclovir; antiviral therapy*

For citation: Demin M.V., Tikhomirov D.S., Biderman B.V., Drovkov M.Yu., Sudarikov A.B., Tupoleva T.A., Filatov F.P. Mutations in the *UL97* gene of cytomegalovirus (*Herpesvirales: Herpesviridae: Cytomegalovirus: Human betaherpesvirus 5*) associated with ganciclovir resistance in recipients of allogeneic stem hematopoietic cells. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(1): 37–47 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-90>

For correspondence: Mikhail V. Demin, Biologist, Researcher of the Virological Safety Laboratory, FSBI «National Medical Research Center of Hematology» of the Ministry of Health of Russia, 125167, Moscow, Russia. E-mail: memindisha@gmail.com

Information about the authors:

Demin M.V., <https://orcid.org/0000-0002-7579-3442>

Tikhomirov D.S., <https://orcid.org/0000-0002-2553-6579>

Biderman B.V., <https://orcid.org/0000-0002-6253-3334>

Drovkov M.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-9431-8316>

Sudarikov A.B., <https://orcid.org/0000-0001-9463-9187>

Tupoleva T.A., <https://orcid.org/0000-0003-4668-9379>

Filatov F.P., <https://orcid.org/0000-0002-2385-9251>

Contribution: Demin M.V. – research concept and design, conducting experiments, data collection, analysis and interpretation, text preparation; Tikhomirov D.S. – research concept and design, data analysis and interpretation, text preparation; Biderman B.V. – data collection, analysis and interpretation; Drovkov M.Yu. – data interpretation, text preparation; Sudarikov A.B. – approval of the final version of the article for publication; Tupoleva T.A. – approval of the final version of the article for publication; Filatov F.P. – approval of the final version of the article for publication.

Funding. The research was funded by the State budget.

Conflict of interest. The authors declare that there is no conflict of interest.

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the local Ethics Committee of the FSBI «National Medical Research Center for Hematology» of the Ministry of Health of Russia (Protocol No. 160 dated December 23, 2021).

Received 17 December 2021

Accepted 14 January 2022

Published 28 February 2022

Введение

Инфекция, вызываемая цитомегаловирусом (*Herpesvirales: Herpesviridae: Cytomegalovirus: Human betaherpesvirus 5*) (ЦМВ), является серьёзной проблемой для пациентов с ослабленной системой иммунной защиты, в число которых входят инфицированные вирусом иммунодефицита человека (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus 1*) (ВИЧ) на стадии синдрома приобретённого иммунодефицита (СПИД) [1], пациенты с опухолевыми заболеваниями, депрессиями кроветворения, а также реципиенты органов и тканей. При возникновении ЦМВ-ассоциированных осложнений возникает необходимость в проведении противовирусной терапии (ПВТ). Наиболее часто рассматриваются препараты, действующими веществами которых являются ганцикловир, фоскарнет либо цидофовир [2]. На территории Российской Федерации из препаратов прямого действия для кли-

нического применения зарегистрированы только ганцикловир и его аналоги, модифицированные для повышения биодоступности. Среди последних можно выделить валиновый эфир – валганцикловир, который широко используется в медицинской практике в связи с лучшими адсорбционной способностью и биодоступностью в сравнении с ганцикловиром. Его применяют перорально; в ситуациях, когда пациенты не способны принимать препараты внутрь, вводится ганцикловир. Тем не менее действующим веществом во всех случаях выступает ганцикловир, и основной механизм противовирусного действия этих препаратов заключается в ингибировании вирусной ДНК-полимеразы, что в свою очередь прекращает репликацию возбудителя [3]. Фосфорилированный ганцикловир (ганцикловир трифосфат), являющийся аналогом дезоксигуанозина, накапливается в инфицированной клетке и встраивается в растущую цепь реплицирующейся вирусной ДНК. После этого становится невозможным присоеди-

ние следующих нуклеотидов, в результате чего вирусная репликация ингибируется [4].

Однако в ходе естественного мутационного процесса на фоне длительного применения ганцикловира или валганцикловира, особенно при использовании препаратов в субоптимальных дозах [5], могут возникнуть штаммы ЦМВ, устойчивые к их действию. В основе молекулярных механизмов устойчивости лежит возникновение мутационных изменений в генах, кодирующих вирусную фосфотрансферазу (*UL97*) и ДНК-полимеразу (*UL54*) [6]. В случае длительной ПБТ может произойти отбор штамма с несколькими мутациями, обеспечивающими резистентность. Мутации, понижающие сродство того или иного фермента к препаратам, обладают разными показателями фактора устойчивости (резистентности) (resistance factor, RF), который вычисляется следующим образом:

$$RF = \frac{IC_{50 \text{ мутанта}}}{IC_{50 \text{ дикого типа}}}, \quad (1)$$

где IC_{50} – концентрация, снижающая на 50% число вирусных бляшек в культуре клеток человека [3].

Большинство случаев формирования резистентных штаммов обусловлены мутационными изменениями в вирусном гене *UL97*. Мутации, вызывающие устойчивость к действию фоскарнета и цидофовира, локализованы в гене *UL54* [7], однако указанные препараты не зарегистрированы для клинического применения на территории РФ. Мутации, ответственные за резистентность к терапии ганцикловиром/валганцикловиром, представляют собой однонуклеотидные замены или короткие (от 1 до 17 аминокислот) делеции [8], которые затрагивают АТФ-связывающий регион или сайты переноса фосфата, изменяющие способность фермента к фосфорилированию действующего вещества препарата. При этом не возникает значительных препятствий для вирусной репликации [2]. Примерно 95% ганцикловир-устойчивых штаммов ЦМВ содержат 1 или более мутаций в гене *UL97*. Обычно они локализованы в специфических кодонах – 460, 520 и 590–607; в 70% случаев – в кодонах 450, 594 и 595 [9]. Мутации в кодонах 460 и 520 расположены в консервативных киназных доменах и с большей вероятностью оказывают влияние на киназную функцию белка, что объясняет незначительную степень разнообразия таких изменений [10]. Сегмент гена 590–607 не играет большой роли в репликации патогена, однако мутации в нём нарушают способность к связыванию с ганцикловиром, не затрагивая естественные биологические функции фермента. Поэтому именно в этом регионе наблюдается большое количество аминокислотных замен и делеций, ответственных за резистентность [10].

У иммунокомпрометированных пациентов (реципиенты органов и тканей, ВИЧ-инфицированные) наиболее частыми являются следующие мутации: M460I/V, C592G, A591V, A594T/V, L595F/S, C603W.

Все они ведут к увеличению показателя RF в пределах от 5 до 16 [11].

Формирование у возбудителя устойчивости может служить причиной более агрессивного течения инфекции, неэффективности ПБТ и, как следствие, увеличения количества смертельных исходов. Показано, что частота возникновения резистентности вируса к ганцикловиру у реципиентов трансплантата стволовых клеток довольно высока и оценивается как ~3,8% [12]. Описаны случаи, когда появление мутантного штамма сопровождалось повышением вирусной нагрузки (ВН) и приводило к летальному исходу [13].

С учётом изложенного своевременное выявление мутационных изменений, потенциально способных вызвать устойчивость вируса к ганцикловиру при трансплантации стволовых гемопоэтических клеток (СГК), а также органов и тканей может иметь существенное значение при принятии терапевтического решения. В статье приведено описание 3 клинических случаев, для которых проанализирована динамика появления мутантного штамма ЦМВ по гену *UL97*.

Цель настоящей работы – определение времени возникновения штамма ЦМВ с мутацией в гене фосфотрансферазы *UL97*, ассоциированной с устойчивостью к действию противовирусных препаратов, у пациентов с гемобластомами после трансплантации аллогенных стволовых гемопоэтических клеток (алло-СГК).

Материал и методы

В результате ранее выполненного исследования обнаружены мутации в гене *UL97* ЦМВ у 3 реципиентов алло-ГСК, находившихся на лечении в клиниках ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России с онкогематологическими заболеваниями (острые лейкозы; неходжкинская лимфома) в период с 2016 по 2017 гг. [14]. С целью анализа времени возникновения мутантного штамма изучали архивные образцы ДНК ЦМВ, выделенного от данных пациентов как до, так и после обнаружения мутационных изменений. Пациенты получили условные коды (ПР, ФС, ПД). В работу были взяты 47 образцов вирусной ДНК, выделенной из периферической крови (ПР – 17 проб, ФС – 20 и ПД – 10 проб). Данные пациентов представлены в **табл. 1**. Наличие ЦМВ в крови и показатели ВН определяли с помощью набора «АмплиСенс EBV/ЦМВ/HHV6-скрин-FL» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия).

Для всех пациентов была известна дата первичной регистрации мутантного штамма. В поиск были включены образцы ДНК, выделенной из периферической крови пациентов за 2 мес. до указанной даты и 2 мес. спустя. Оценены показатели ВН и объём полученной пациентами ПБТ. Характеристики исследованного материала представлены в **табл. 2**.

Амплификацию и секвенирование участка гена *UL97* проводили согласно описанной ранее методике [14]. Полученную последовательность ДНК анализировали с помощью программного обеспечения Nucleotide BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih>).

gov/Blast.cgi) и Genome compiler (<https://designer.genomecompiler.com>). Поиск мутаций осуществляли в программе MRA mutation resistance analyzer (<http://www.informatik.uni-ulm.de/ni/mitarbeiter/HKestler/mra/app/index.php?plugin=form>). При помощи данной программной среды сравнивали нуклеотидные последовательности с референсной последовательностью гена UL97 штамма Merlin (GenBank № AY446894.2).

Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен локальным Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (Протокол № 160 от 23.12.2021).

Результаты

У всех исследуемых в крови до проведения трансплантации обнаружены анamnестические антитела класса к ЦМВ класса IgG. Таким образом, все эпизоды развития инфекционного процесса не могут быть классифицированы как первичное инфицирование.

Анализ последовательностей участка гена *U97*, полученной из образцов, включённых в исследование, показал, что обладающие потенциалом резистентности мутационные изменения обнаруживались не во всех доступных образцах, а регистрировались лишь в определённый момент времени после трансплантации. Далее отдельно рассмотрен каждый клинический случай.

1. Пациент ПР

Клинический диагноз: лимфома из клеток мантийной зоны. Трансплантация аллогенных стволовых гемопоэтических клеток от 18.03.2016 г.

У пациента зафиксирована описанная ранее в литературе мутация, обладающая потенциалом резистентности, – С592G. Она впервые выявлена спустя 187 дней после трансплантации и сохранялась в вирусной ДНК на протяжении всего последующего периода наблюдения. Исследование архивных образцов показало присутствие дополнительной ранее не описанной мутации А628Е неясного значения также в течение всего срока наблюдения. После появления С592G мутация А628Е не элиминировалась, что видно на **рис. 1**. Это свидетельствует о том, что с наибольшей долей вероятности речь идёт об одном вирусном штамме, в котором на фоне уже имеющейся мутации появилась дополнительная.

Из графика на **рис. 2** видно, что появление мутации С592G зафиксировано на фоне роста ВН >10 000 копий геном-эквивалент на 100 000 ядродержащих клеток. Для оценки влияния мутации на резистентность вируса к действию противовирусных препаратов проанализирована ПВТ, проводимая пациенту за время наблюдения. Полученные данные представлены на **рис. 2**.

Из **рис. 2** видно, что эффективного снижения значения ВН удалось добиться только на фоне приме-

Таблица 1. Клинико-лабораторная характеристика включённых в исследование реципиентов аллогенных стволовых гемопоэтических клеток

Table 1. Clinical and laboratory characteristics of allogenic hematopoietic stem cells recipients included in the study

Код пациента Patient code	Пол Gender	Возраст Age	Основной диагноз Main diagnosis	Источник трансплантата Transplant source
ПР PR	Мужской Male	51	Лимфома из клеток мантийной зоны Mantle cell lymphoma	Неродственный полностью совместимый донор, стволовые кроветворные клетки Unrelated fully compatible donor, hematopoietic stem cells
ФС FS	Женский Female	64	Острый миелоидный лейкоз Acute myeloid leukemia	Неродственный частично совместимый донор, стволовые кроветворные клетки Unrelated partially compatible donor, hematopoietic stem cells
ПД PD	Женский Female	37	Острый лимфобластный лейкоз Acute lymphoblastic leukemia	Неродственный полностью совместимый донор, стволовые кроветворные клетки Unrelated fully compatible donor, hematopoietic stem cells

Таблица 2. Условия проведения эксперимента

Table 2. Conditions of the study conducting

Код пациента Patient code	Количество образцов до обнаружения мутации Number of samples before mutation detection	Количество образцов после обнаружения мутации Number of samples after mutation detection	Количество дней от трансплантации до обнаружения мутации Days number from transplantation to mutation detection	Период наблюдения за динамикой возникновения мутации (количество дней до/после мутации) Period of observation of the dynamics of mutation occurrence (days number before/after mutation)
ПР PR	9	14	187	306 (184/122)
ФС FS	17	5	1184	243 (157/86)
ПД PD	15	6	124	150 (124/26)

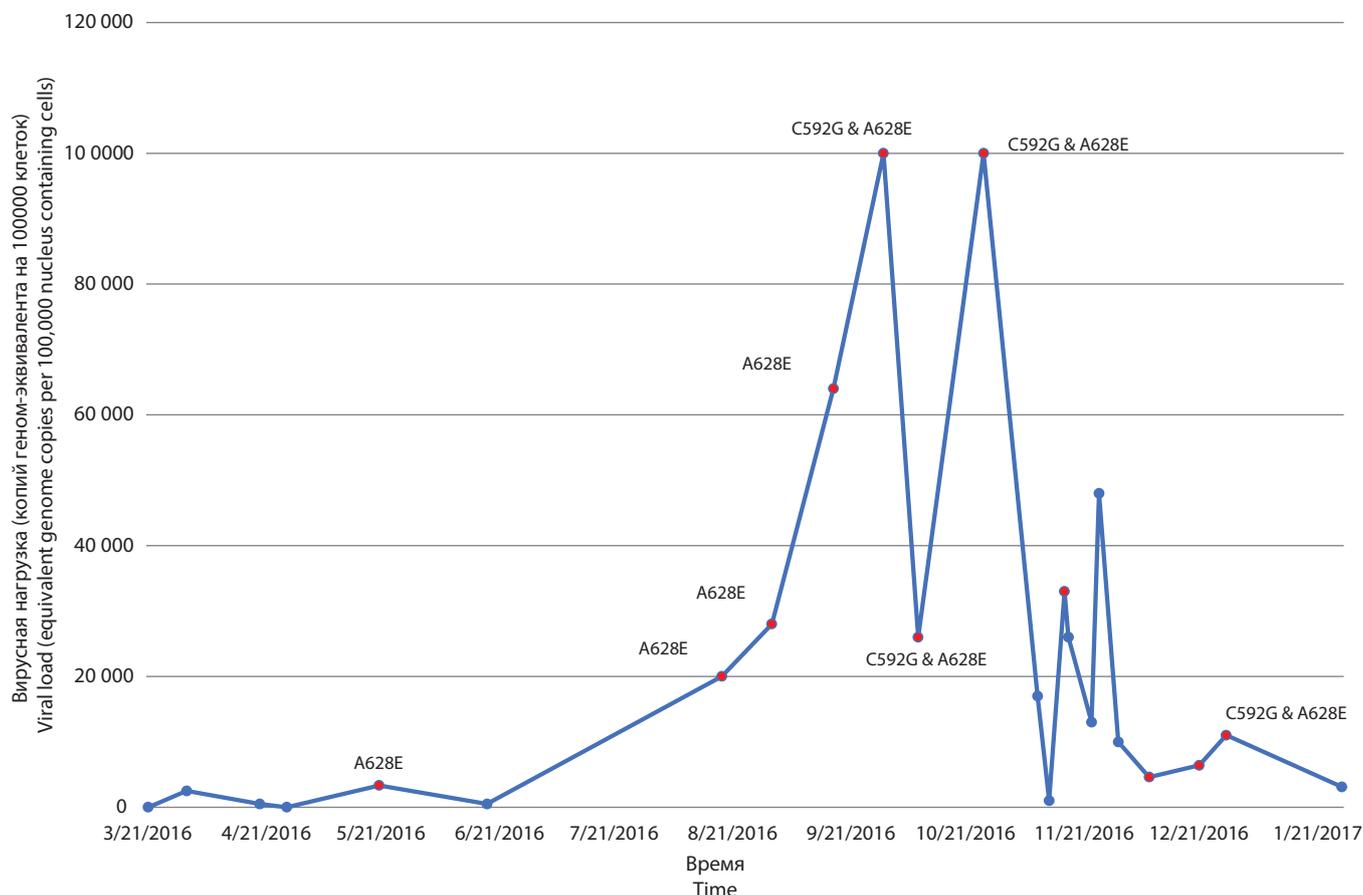


Рис. 1. Динамика вирусной нагрузки до и после появления мутантного штамма у пациента ПР.
Fig. 1. Dynamics of viral load before and after the appearance of the mutant strain in the patient PR.

нения фоскарнета, что дополнительно подтверждает наличие проявлений резистентности (отсутствие динамики этого показателя в течение 2 нед на фоне адекватной ПВТ). Данный препарат является структурным имитатором пирофосфат-аниона, который избирательно ингибирует место связывания пирофосфата в вирусных ДНК-полимеразах в концентрациях, не влияющих на активность ДНК-полимеразы человека. Таким образом, наличие мутации в гене *U97* не изменяет степень его активности.

2. Пациентка ФС

Клинический диагноз: острый миелоидный лейкоз. Трансплантация аллогенных стволовых гемопоэтических клеток от 21.12.2013 г.

У этой пациентки обнаружены 2 ранее описанные в литературе мутации: C592G и C603W. При этом более агрессивная C603W впервые выявлена спустя 1184 дня после трансплантации. На основании изучения архивных образцов установлено, что мутация C592G возникла ещё до начала исследования (см. рис. 3). В указанной временной точке одновременно детектировались обе мутации. Однако позднее мутация C592G элиминировалась, что может указывать на смену мажорного вирусного штамма в ходе наблюдения и проведения ПВТ (в т.ч. фоскар-

нетом). Приведённые факты с высокой степенью вероятности позволяют предполагать имевший место процесс селекции штамма под давлением препаратов, что видно на рис. 4.

3. Пациент ПД

Клинический диагноз: острый лимфобластный лейкоз. Аллогенная трансплантация стволовых гемопоэтических клеток от 28.06.2017 г.

В данном случае обнаружена 1 ранее описанная в литературе мутация – C607F. Исследование архивных образцов показало, что моментом её возникновения можно считать 124 день после трансплантации (см. рис. 5).

Анализ проводимой ПВТ в зависимости от ВН и выявления мутационных изменений представлен на рис. 6.

Обсуждение

Ограниченность выбора противовирусных препаратов прямого действия, зарегистрированных в Российской Федерации, накладывает ограничения на выбор терапевтической тактики. Проблема усугубляется вероятностью возникновения в вирусном геноме мутаций, ассоциированных с устойчивостью к ПВТ.

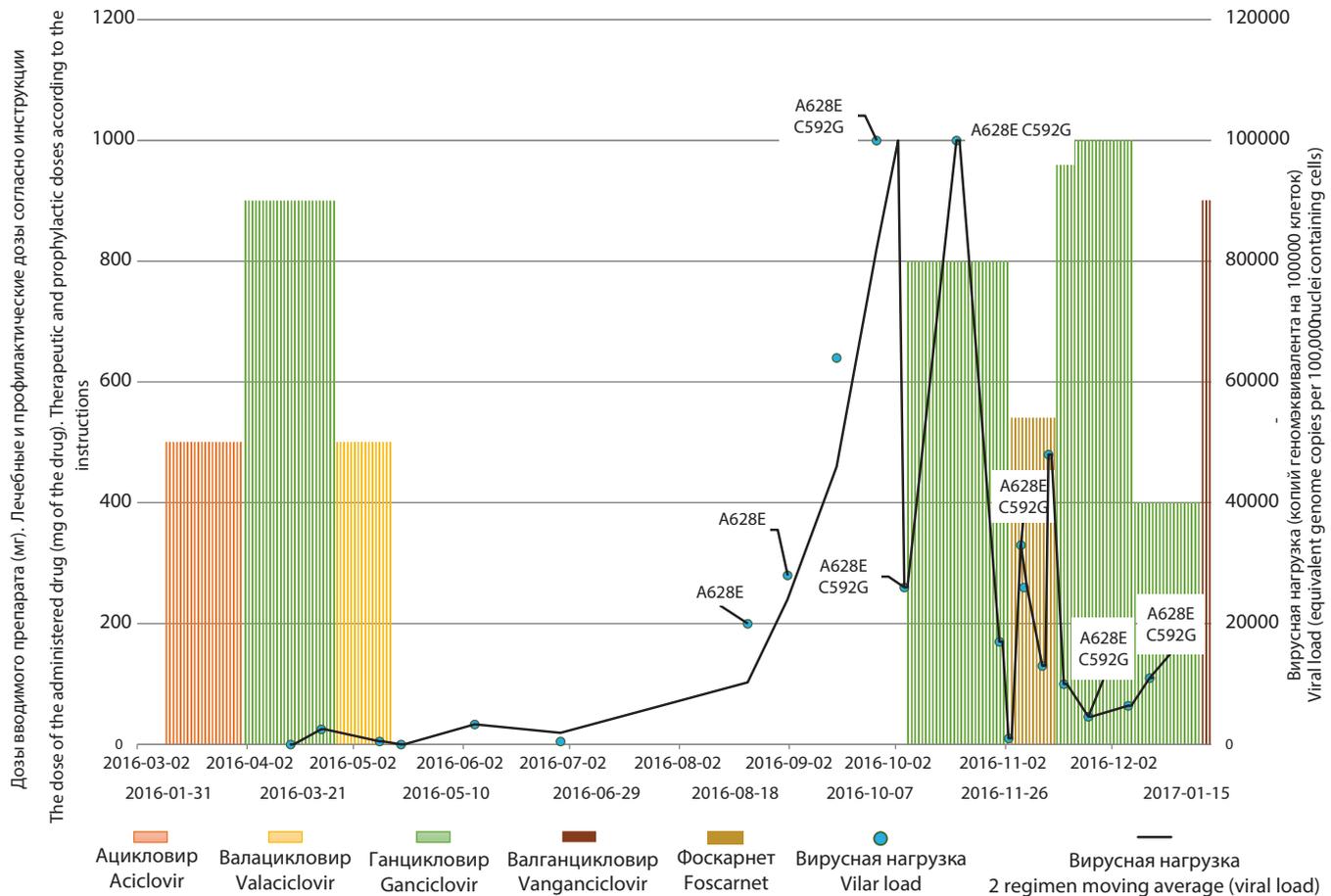


Рис. 2. Динамика введения противовирусных препаратов на фоне вирусной нагрузки у пациента ПР. Ганцикловир, ацикловир и фоскарнет вводились внутривенно; валацикловир и валганцикловир – перорально.

Fig. 2. Dynamics of antiviral drugs administration against the background of viral load in a patient PR. Ganciclovir, acyclovir, and foscarnet were administered intravenously; and valaciclovir, valganciclovir were given orally.

Особое значение подобный сценарий имеет для реципиентов алло-СГК. В ранний посттрансплантационный период в организме одновременно функционируют две иммунные системы – донора и пациента, что, в свою очередь, способствует установлению перекрёстных взаимодействий между вирусом и двумя этими системами. Данная ситуация может влиять на возможность образования или селекции штаммов, резистентных к проводимому лечению.

Принимая во внимание, что все включённые в исследование реципиенты были инфицированы ЦМВ ещё до трансплантации (на что указывает наличие анамнестических антител в крови), можно предполагать несколько путей появления в организме реципиента устойчивого штамма. В первую очередь мутация может возникнуть как результат естественной эволюции патологического агента. Вторая возможность заключается в попадании подобного штамма при трансплантации от донора-носителя. Однако реализация данного пути представляется маловероятной, поскольку все доноры были обследованы на наличие в крови ДНК ЦМВ до сбора и заготовки СГК. Другим фактором, свидетельствующим против этой теории, является преобладание в крови здорового не предле-

ченного человека дикого типа возбудителя (в связи с отсутствием давления со стороны противовирусных препаратов). Процесс отбора штаммов с мутациями резистентности возможен также на фоне длительной терапии ганцикловиром в субоптимальных дозах, о чём имеются сообщения в литературе [15].

Следует также отметить, что обнаруженные мутационные изменения в подавляющем большинстве описаны в зарубежных источниках и, вероятно, действительно наиболее распространены. Однако в настоящем исследовании, несмотря на малый объём выборки, зафиксированы ранее не описанные мутации с неопределённым фактором резистентности. Это может свидетельствовать о наличии популяционных различий в разных географических зонах и требует дальнейшего изучения.

Изучение динамики появления мутантных штаммов показало, что все эпизоды возникновения мутации с высоким показателем фактора резистентности ассоциировались с ростом ВН в крови. При этом её существенное повышение либо предшествует моменту регистрации новой мутации, либо совпадает с этой временной точкой. Пик ВН детектировался у пациентов в разные периоды: у пациентов ФС и ПД он имел

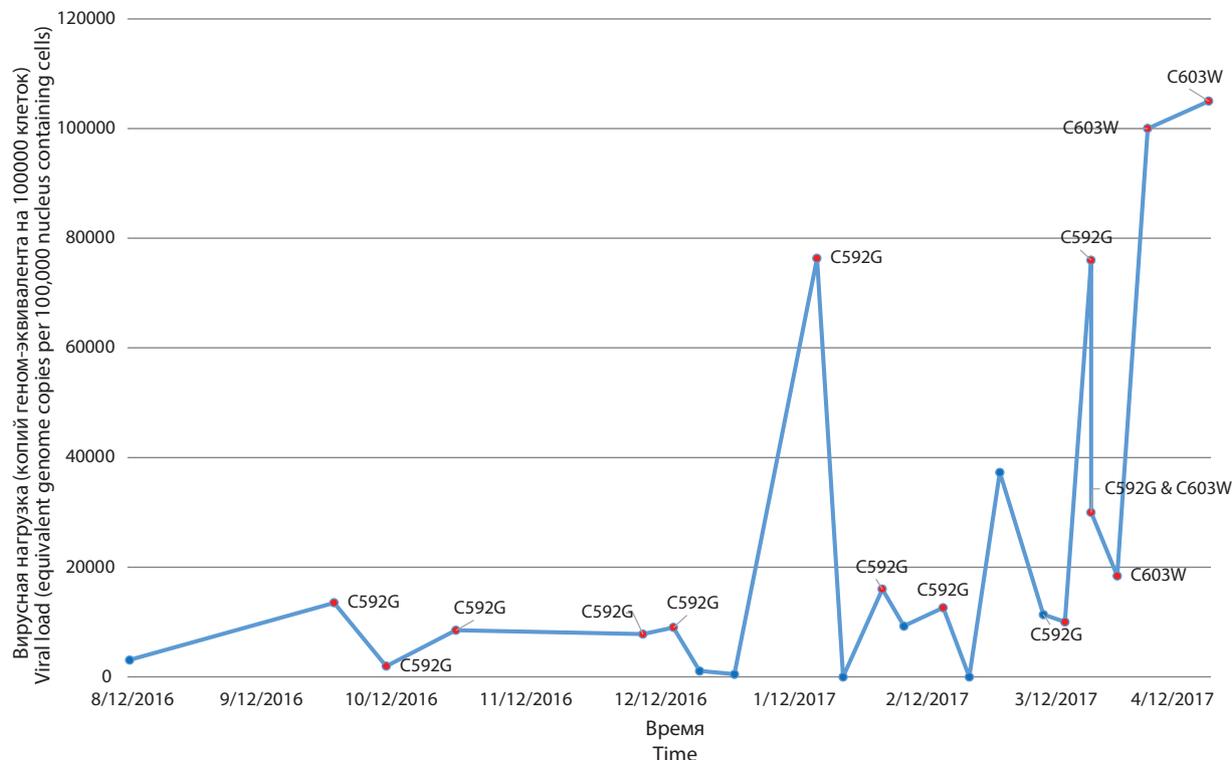


Рис. 3. Динамика вирусной нагрузки до и после появления мутантного штамма у пациентки ФС. Показатель вирусной нагрузки представлен в виде количества копий геном-эквивалента на 100 000 клеток в крови.

Fig. 3. Dynamics of viral load before and after the appearance of a mutant strain in the patient FS. The viral load index is presented as the number of copies of the genome equivalent per 100,000 nucleus containing cells in the blood.

место после появления новой мутации, а в случае пациента ПР совпал с моментом её непосредственного обнаружения. В целом наблюдаемые феномены на данном этапе могут быть объяснены как недостаточной чувствительностью выбранного метода, так и взаимовлиянием штаммов в плане репликации каждого из них. В литературе встречается информация о том, что в организме одновременно может присутствовать более 1 штамма ЦМВ [13]. При этом используемая для идентификации методика (секвенирование по Сэнгеру), несмотря на точность обнаружения однонуклеотидных замен, предоставляет информацию лишь о преобладающем на момент взятия материала геноме.

Возможная причина указанного явления заключается в том, что мутантный штамм образуется в организме до того, как его удаётся зарегистрировать выбранным методом, поскольку секвенирование по Сэнгеру позволяет получать последовательность мажорного штамма. Тем не менее, появляясь раньше момента регистрации, мутантный штамм начинает вносить свой вклад в ВН, из-за чего наблюдается её рост. В ходе естественного отбора на фоне проводимой ПВТ мажорным становится штамм, обладающий репликативным преимуществом, а не обладающий устойчивостью элиминируется. После элиминации чувствительного к ганцикловиру штамма резистентный штамм начинает активно реплицироваться, что приводит к наблюдаемым пикам ВН. Подобная тен-

денция особенно ярко наблюдается у пациентки ФС. В её случае на протяжении длительного времени регистрировался штамм с мутацией C592G, а в марте 2017 г. в одной из контрольных точек одновременно детектированы 2 мутации – C592G и C603W. После этого наблюдалась постепенная смена с C592G на C603W. Данная последовательность событий, наиболее вероятно, свидетельствует об одновременном присутствии 2 штаммов, несущих по 1 мутации. На рис. 6 видно, что имели место отдельные эпизоды повышения ВН до появления C603W, однако непосредственно перед обнаружением новой мутации зарегистрировано перманентное увеличение показателя наблюдаемой ВН.

У пациента ПР пик значения ВН совпал с моментом регистрации дополнительной мутации, после чего стали одновременно детектироваться 2 мутации. Данный феномен, вероятно имеет в своей основе не появление нового штамма, становящегося в результате мажорным, а возникновением новой мутации в рамках одного штамма. Таким образом, совпадение пика ВН с временной точкой регистрации вновь возникшей мутации может быть объяснено отсутствием антагонистических взаимодействий между разными вирусными штаммами.

Показаны статистически значимые различия в показателях ВН до и после возникновения мутации на фоне проводимой ПВТ ганцикловиrom у исследуемых ПД и ПР. Для пациентки ФС такая зависимость

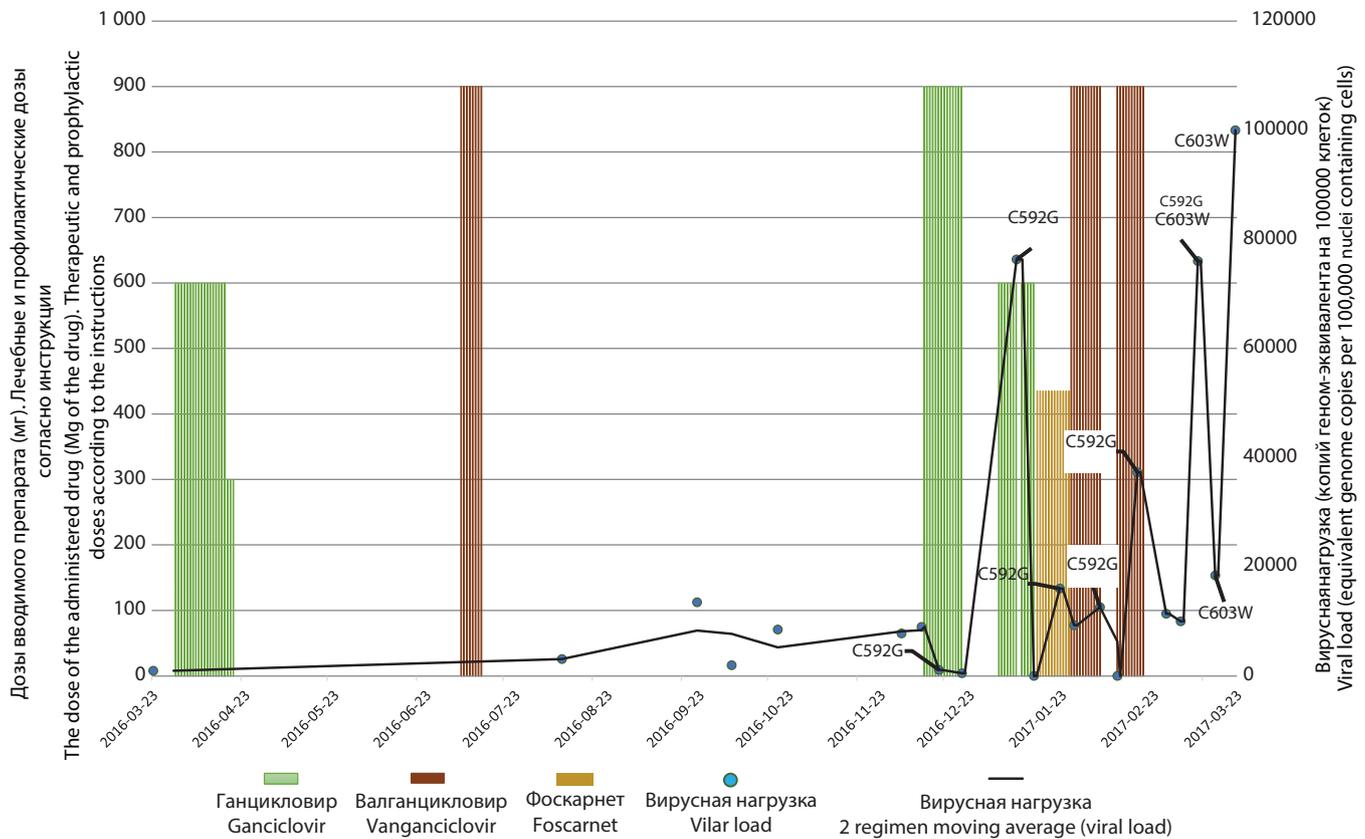


Рис. 4. Динамика введения противовирусных препаратов на фоне вирусной нагрузки у пациентки ФС. Ганцикловир и фоскарнет вводились внутривенно, валганцикловир – перорально. Дозы препарата (лечебные и профилактические согласно инструкции) приведены в миллиграммах.

Fig. 4. Dynamics of administration of antiviral drugs against the background of viral load in the patient FS. Ganciclovir and foscarnet were administered intravenously, and valganciclovir was given orally. Doses (therapeutic and prophylactic according to the instructions) are given in milligrams.

не была доказана. Однако этот факт может обусловлен недостаточной выборкой образцов, взятых после появления мутации С603W, поскольку вскоре после её обнаружения пациентка скончалась от септического шока. Среди выявленных мутаций С603W обладает наибольшим фактором резистентности и ассоциируется (согласно литературным данным) с высокой летальностью. Пациенты ПР и ПД на период наблюдения были живы, что, возможно, связано как с меньшим фактором устойчивости выявленных мутационных изменений, так и с различиями в течении основного заболевания и проводимой ПВТ.

В случае с ПР клинически значимое появление ЦМВ-ассоциированных инфекционных осложнений совпало с временем возникновения мутации. Впоследствии удалось достичь снижения показателя ВН, применяя комплексную ПВТ: препараты иммуноглобулинов, ганцикловир и фоскарнет, что привело к стабилизации состояния и уменьшению ВН в крови.

У пациента ПД развитие острой ЦМВ-инфекции с гипертермией также имело место на фоне возрастания ВН и появления мутации. Резистентное течение инфекционного процесса констатировано лечащим врачом спустя несколько месяцев после возникновения мутационных изменений. На протяжении всего

этого периода осуществлялось лечение валганцикловиром и препаратами иммуноглобулинов. Тем не менее показатели ВН на фоне терапии не достигали столь высоких значений, как у остальных исследуемых. Это может быть объяснено тем, что мутация С607F обладает наиболее низким фактором устойчивости, что действительно оказывает влияние на характер течения заболевания *in vivo*.

У больной ФС после возникновения второй мутации показатели ВН не снижались на фоне назначения ганцикловира, не был отмечен и клинический эффект. Присоединение к терапии препаратов иммуноглобулинов, согласно клиническим данным, способствовало достижению эффекта и нормализации состояния, но влияния на ВН при этом не отмечено. Несмотря на проводимые лечебные мероприятия, вскоре после обнаружения дополнительной мутации наступила смерть пациентки.

Оценивая в целом данные о состоянии исследуемых на протяжении периода наблюдения, дозы вводимых лекарственных средств и показатели ВН, можно утверждать, что при наличии мутаций с высоким фактором резистентности в геноме ЦМВ применение ганцикловира и его производных не приводит к желаемому эффекту: время ответа на терапию либо оказы-

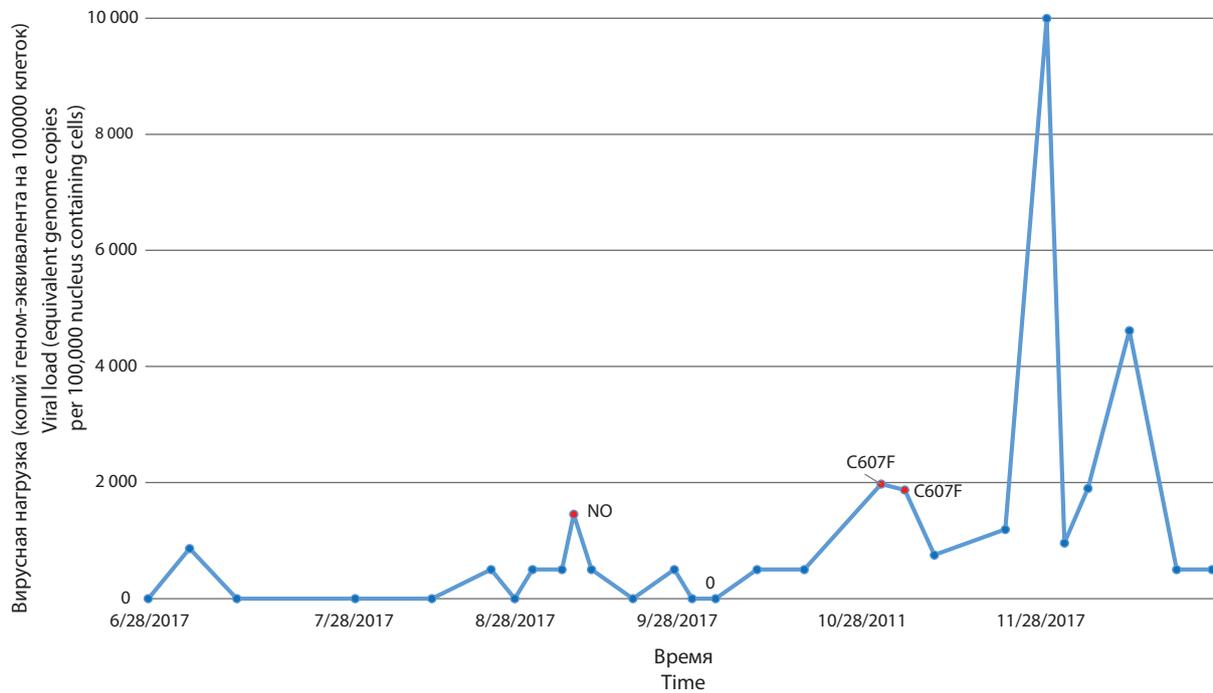


Рис. 5. Динамика вирусной нагрузки до и после появления мутантного штамма у пациента ПД. Показатель вирусной нагрузки представлен в виде количества копий геном-эквивалента на 100 000 ядросодержащих клеток в крови.

Fig. 5. Dynamics of viral load before and after the appearance of a mutant strain in the patient PD. The viral load index is presented as the number of copies of the genome equivalent per 100,000 nucleus containing cells in the blood.

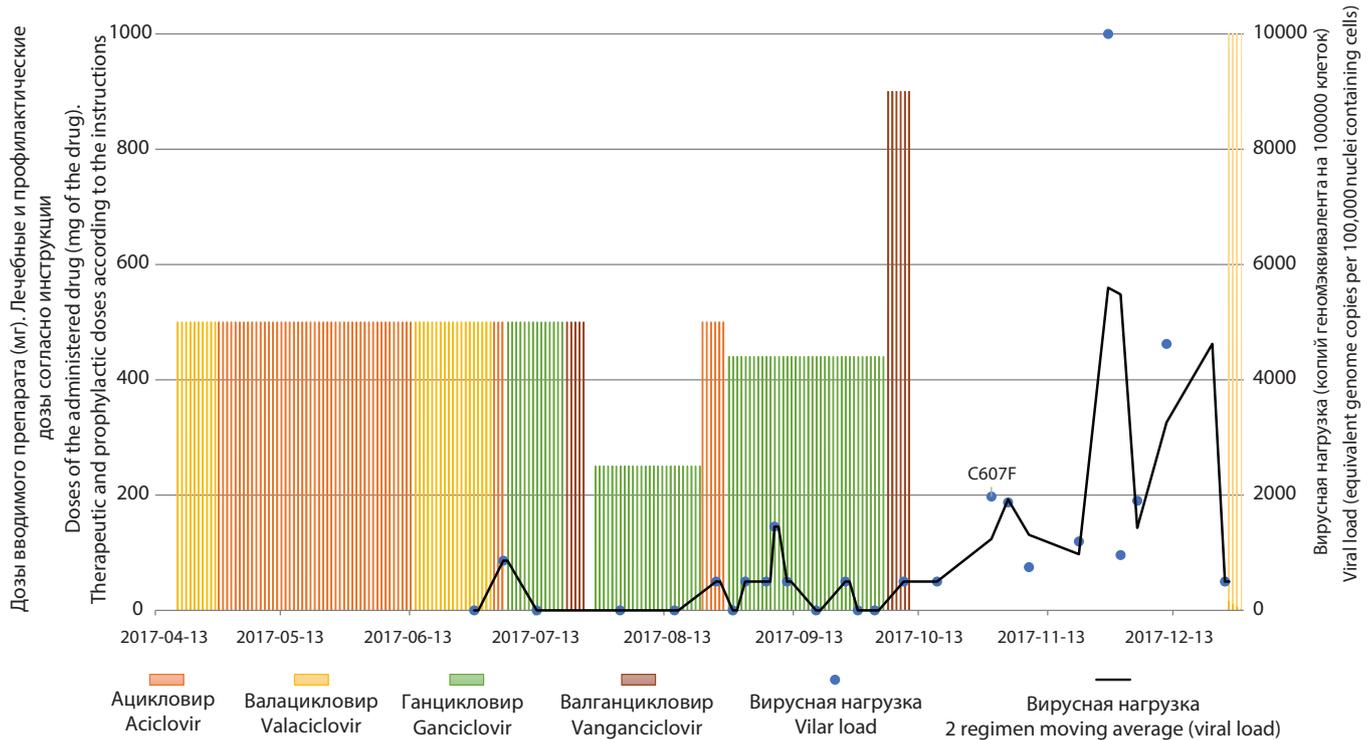


Рис. 6. Динамика введения противовирусных препаратов на фоне вирусной нагрузки у пациента ПД. Ганцикловир и ацикловир вводились внутривенно, валацикловир, валганцикловир – перорально. Дозы препарата (лечебные и профилактические согласно инструкции) приведены в миллиграммах.

Fig. 6. Dynamics of administration of antiviral drugs against the background of viral load in the patient PD. Ganciclovir and aciclovir were administered intravenously; and valaciclovir, valganciclovir were given orally. Doses (therapeutic and prophylactic according to the instructions) are given in milligrams.

ваются отложенным, либо он не наступает, в то время как ВН растёт вместе с ухудшением состояния пациента. Показательно, что чем больше был фактор резистентности обнаруженной мутации, тем хуже были результаты проводимой противовирусной терапии.

Таким образом, продемонстрировано, что выявление мутационных изменений, потенциально приводящих к устойчивости, возможно до непосредственного возникновения клинических проявлений острой ЦМВ-инфекции. Это свидетельствует в пользу необходимости проведения скрининга реципиентов алло-ГСК на наличие мутаций в геноме ЦМВ с целью выявления субпопуляции, в которой терапия ганцикловиром может оказаться малоэффективной. Учитывая высокую нефротоксичность этого препарата, а также его миелосупрессивное действие, своевременная идентификация мутаций может существенно повлиять на выбор терапевтической тактики.

Заключение

С использованием полученных результатов предполагается разработка тест-системы на основе полимеразной цепной реакции (рПЦР; random polymerase chain reaction, rPCR), способной идентифицировать наиболее часто встречающиеся мутации с высоким фактором резистентности: M460I/V, C592G, A591V, A594T/V, L595F/S, C603W. Учитывая, что данные о распространённости мутаций получены из зарубежных источников, целесообразно также изучение частоты мутаций в гене *UL97* среди популяции РФ, что могло бы способствовать повышению качества и точности тест-систем.

Возможен алгоритм лечения, который может быть введён в ближайшее время. Он заключается в том, что в случае отсутствия ответа на ПВТ осуществляются генотипирование и определение наличия мутаций. При обнаружении мутационных изменений и после установления их характера врач принимает решение об увеличении дозы ганцикловира/валганцикловира или назначении другого препарата.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Gerna G., Zavattoni M., Baldanti F., Furione M., Chezzi L., Revello M.G., et al. Circulating cFytomegalic endothelial cells are associated with high human cytomegalovirus (HCMV) load in AIDS patients with late-stage disseminated HCMV disease. *J. Med. Virol.* 1998; 55(1): 64–74.
- Göhrling K., Hamprecht K., Jahn G. Antiviral drug- and multidrug resistance in cytomegalovirus infected SCT patients. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2015; 13: 153–9. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.01.003>
- Piret J., Boivin G. Clinical development of letermovir and maribavir: Overview of human cytomegalovirus drug resistance. *Antiviral Res.* 2019; 163: 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.011>
- Schaeffer H.J., Beauchamp L., de Miranda P., Elion G.B., Bauer D.J., Collins P. 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature.* 1978; 272(5654): 583–5. <https://doi.org/10.1038/272583a0>
- Chou S. Cytomegalovirus UL97 mutations in the era of ganciclovir and maribavir. *Rev. Med. Virol.* 2008; 18(4): 233–46. <https://doi.org/10.1002/rmv.574>
- Göhrling K., Wolf D., Bethge W., Mikeler E., Faul C., Vogel W., et al. Dynamics of coexisting HCMV-UL97 and UL54 drug-resistance associated mutations in patients after haematopoietic cell transplantation. *J. Clin. Virol.* 2013; 57(1): 43–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.01.003>
- Britt W. Cytomegalovirus. In: Remington J.S., ed. *Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant*. Elsevier; 2011: 706–55.
- Komatsu T.E., Pikis A., Naeger L.K., Harrington P.R. Resistance of human cytomegalovirus to ganciclovir/valganciclovir: A comprehensive review of putative resistance pathways. *Antiviral Res.* 2014; 101: 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.10.011>
- Biron K.K. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res.* 2006; 71(2–3): 154–63. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.05.002>
- Fischer L., Imrich E., Sampaio K.L., Hofmann J., Jahn G., Hamprecht K., et al. Identification of resistance-associated HCMV UL97- and UL54-mutations and a UL97-polymorphism with impact on phenotypic drug-resistance. *Antiviral Res.* 2016; 131: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.04.002>
- Volfova P., Lengerova M., Lochmanova J., Dvorakova D., Ricna D., Palackova M., et al. Detecting human cytomegalovirus drug resistant mutations and monitoring the emergence of resistant strains using real-time PCR. *J. Clin. Virol.* 2014; 61(2): 270–4. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.07.008>
- Eckle T., Jahn G., Hamprecht K. The influence of mixed HCMV UL97 wildtype and mutant strains on ganciclovir susceptibility in a cell associated plaque reduction assay. *J. Clin. Virol.* 2004; 30(1): 50–6. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2003.08.010>
- Göhrling K., Feuchtinger T., Mikeler E., Lang P., Jahn G., Handgretinger R., et al. Dynamics of the emergence of a human cytomegalovirus UL97 mutant strain conferring ganciclovir resistance in a pediatric stem-cell transplant recipient. *J. Mol. Diagnostics.* 2009; 11(4): 364–8. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2009.080153>
- Demin M.V., Biderman B.V., Glinshchikova O.A., Sudarikov A.B., Filatov F.P., Tikhomirov D.S., et al. Mutations in the cytomegalovirus UL97 gene associated with ganciclovir resistance in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Clin. Microbiol. Antimicrob. Chemother.* 2019; 21(4): 352–7. <https://doi.org/10.36488/cmacc.2019.4.352-357>
- Chou S., Waldemer R.H., Senters A.E., Michels K.S., Kemble G.W., Miner R.C., et al. Cytomegalovirus UL97 phosphotransferase mutations that affect susceptibility to ganciclovir. *J. Infect. Dis.* 2002; 185(2): 162–9. <https://doi.org/10.1086/338362>

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-91>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Иммуноферментная идентификация escape-мутантов S143L и G145R вируса гепатита В (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*)

Коноплева М.В.¹, Фельдшерова А.А.¹, Эльгорт Д.А.¹, Туполева Т.А.², Кохановская Н.А.¹, Панкратова В.Н.¹, Семенов Т.А.¹, Суслов А.П.¹

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

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, 125167, Москва, Россия

Введение. Достижение цели Всемирной организации здравоохранения по ликвидации вирусного гепатита В к 2030 г. представляется проблематичным, отчасти из-за наличия мутантов ускользания (*англ.* escape) у возбудителя этого заболевания, вируса гепатита В (ВГВ) (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*), распространяющихся преимущественно в группах риска. Специфической рутинной диагностики, направленной на идентификацию escape-мутантов, не существует.

Цель исследования – оценка метода серологического портретирования, адаптированного для рутинного выявления escape-мутаций в 143 и 145 аминокислотных остатках (а.о.) поверхностного антигена (HBsAg) ВГВ.

Материал и методы. ДНК ВГВ из 56 образцов HBsAg-положительных сывороток крови, полученных от доноров, хронических носителей HBsAg, а также страдающих злокачественными заболеваниями крови лиц, секвенировали. После выявления мутаций в HBsAg образцы тестировали в иммуноферментной тест-системе «Гепастрип-мутант-3К».

Результаты и обсуждение. Escape-мутации выявлялись преимущественно у больных со злокачественными заболеваниями крови: замены в 143 и 145 а.о. обнаружены в 10,81 и 8,11% случаев соответственно. С помощью иммуноферментного анализа мутация G145R распознана почти во всех случаях. Тест-система специфично распознавала замену S143L в отличие от варианта S143T. Присутствие соседней мутации D144E может предполагаться благодаря ее особому серологическому портрету.

Заключение. Иммуноферментная детекция escape-мутаций S143L, D144E и G145R может применяться для рутинной диагностики, особенно в группах риска. Диагностические параметры тест-системы могут быть уточнены при дополнительных исследованиях. Данная иммуноферментная тест-система и методика применимы для разработки и контроля качества вакцин против escape-мутантов.

Ключевые слова: вирус гепатита В (ВГВ); вирусный гепатит В; ускользание; мутант; HBsAg; G145R; S143L; S-ген; иммуноферментный анализ (ИФА); моноклональное антитело (АТ); секвенирование нового поколения (NGS); онкогематология; злокачественные заболевания крови; серологический портрет

Для цитирования: Коноплева М.В., Фельдшерова А.А., Эльгорт Д.А., Туполева Т.А., Кохановская Н.А., Панкратова В.Н., Семенов Т.А., Суслов А.П. Иммуноферментная идентификация escape-мутантов S143L и G145R вируса гепатита В (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*). *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(1): 48-58. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-91>

Для корреспонденции: Коноплева Мария Вениаминовна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории медиаторов и эффекторов иммунитета отдела иммунологии, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия. E-mail: maria-konopleva@rambler.ru

Участие авторов: Коноплева М.В. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста, администрирование проекта; Фельдшерова А.А. – методология исследования, проведение экспериментов; Эльгорт Д.А. – проведение экспериментов, анализ данных; Туполева Т.А. – администрирование проекта, сбор образцов; Кохановская Н.А. – сбор и обработка образцов, проведение экспериментов; Панкратова В.Н. – сбор и обработка образцов, проведение экспериментов; Семенов Т.А. – рецензирование и редактирование статьи; Суслов А.П. – общее руководство, обеспечение финансирования.

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 локальным Этическим комитетом при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России (Протокол № 104 от 28.01.2015).

Поступила 18.11.2021

Принята в печать 02.02.2022

Опубликована 28.02.2022

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-91>

Identification by enzyme immunoassay of escape mutants S143L and G145R of hepatitis B virus (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*)

Maria V. Konopleva¹, Asya A. Feldsherova¹, Dina A. Elgort¹, Tatiana A. Tupoleva², Nataliya A. Kokhanovskaya¹, Valentina N. Pankratova¹, Tatiana A. Semenenko¹, Anatoly P. Suslov¹

¹FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia;

²FSBI «National Medical Research Center for Hematology» of the Ministry of Health of Russia, 125167, Moscow, Russia

Introduction. The achievement of the goal of the World Health Organization to eliminate viral hepatitis B by 2030 seems to be problematic partly due to the presence of escape mutants of its etiological agent, hepatitis B virus (HBV) (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*), that are spreading mainly in the risk groups. Specific routine diagnostic assays aimed at identification of HBV escape mutants do not exist.

The study aimed the evaluation of the serological fingerprinting method adapted for routine detection of escape mutations in 143 and 145 aa positions of HBV surface antigen (HBsAg).

Material and methods. HBV DNA from 56 samples of HBsAg-positive blood sera obtained from donors, chronic HBsAg carriers and oncohematology patients has been sequenced. After the identification of mutations in HBsAg, the samples were tested in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit «Hepastrip-mutant-3K».

Results and discussion. Escape mutations were detected mainly in patients with hematologic malignancies. Substitutions in 143 and 145 aa were found in 10.81% and in 8.11% of such patients, respectively. The G145R mutation was recognized using ELISA kit in almost all cases. The kit specifically recognized the S143L substitution in contrast to the S143T variant. The presence of neighbor mutation D144E can be assumed due to its special serological fingerprint.

Conclusion. ELISA-based detection of escape mutations S143L, D144E and G145R can be used for routine diagnostics, especially in the risk groups. The diagnostic parameters of the kit can be refined in additional studies. This immunoassay and methodology are applicable for the development and quality control of vaccines against escape mutants.

Key words: hepatitis B virus (HBV); viral hepatitis B; escape; mutant; HBsAg; G145R; S143L; S gene; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); monoclonal antibody (AB); next generation sequencing (NGS); oncohematology; hematologic malignancies; serological fingerprint

For citation: Konopleva M.V., Feldsherova A.A., Elgort D.A., Tupoleva T.A., Kokhanovskaya N.A., Pankratova V.N., Semenenko T.A., Suslov A.P. Identification by enzyme immunoassay of escape mutants S143L and G145R of hepatitis B virus (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(1): 48-58. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-91>

For correspondence: Maria V. Konopleva, Ph.D (Biol.), Senior Researcher of the Immunity Mediators and Effectors Laboratory, Immunology Department, FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia. E-mail: maria-konopleva@rambler.ru

Information about the authors:

Konopleva M.V., <https://orcid.org/0000-0002-9724-695X>

Feldsherova A.A., <https://orcid.org/0000-0001-7216-4301>

Elgort D.A., <https://orcid.org/0000-0002-2197-4184>

Tupoleva T.A., <https://orcid.org/0000-0003-4668-9379>

Kokhanovskaya N.A., <https://orcid.org/0000-0001-5142-846X>

Pankratova V.N., <https://orcid.org/0000-0003-4427-1809>

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

Suslov A.P., <https://orcid.org/0000-0001-5731-3284>

Contribution: Konopleva M.V. – study concept and design, data analysis and interpretation, original draft preparation, project administration; Feldsherova A.A. – study methodology, investigation; Elgort D.A. – investigation, data analysis; Tupoleva T.A. – project administration, specimens collection; Kokhanovskaya N.A. – specimens collection and processing, investigation; Pankratova V.N. – specimens collection and processing, investigation; Semenenko T.A. – review and editing of the article; Suslov A.P. – supervision, funding acquisition.

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 the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Local Ethics Committee of the FSBI «National Medical Research Center for Hematology» of the Ministry of Health of Russia (Protocol No. 104 dated January 28, 2015).

Received 19 November 2021

Accepted 02 February 2022

Published 28 February 2022

Введение

Среди множества заболеваний, вызываемых вирусами у человека, лишь немногие обладают столь глобальной общественной значимостью, как вирусный гепатит В. Вирусом гепатита В (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*) (ВГВ) инфицирована примерно 1/3 населения планеты, при этом хроническая форма инфекции зарегистрирована не менее чем у 360 млн человек. Из-за клинических осложнений болезни, таких как цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома, в мире происходит около 1 млн смертей в год [1]. В 2016 г. 69-я Всемирная ассамблея здравоохранения одобрила Глобальную стратегию сектора здравоохранения по вирусному гепатиту, целью которой определена ликвидация инфекционного гепатита как угрозы общественному здоровью к 2030 г. Установлены следующие рекомендуемые целевые показатели: снижение распространённости ВГВ среди детей в возрасте 1 года до $\leq 0,1\%$; снижение смертности от гепатита В до ≤ 5 на 100 тыс. населения; ежегодное снижение числа новых случаев коинфекции ВГВ и вируса гепатита С (*Flaviviridae: Hepacivirus: Hepatitis C virus*) [2].

Тем не менее распространение ВГВ продолжается, несмотря на проводимую во многих странах широко-масштабную вакцинацию против гепатита В, а также осуществление других противоэпидемических мероприятий. Такая ситуация во многом обусловлена разнообразными механизмами, сформировавшимися в ходе эволюции вируса и способствующими его выживанию в условиях иммунологического прессинга [3]. Существенное значение в этом отношении имеет возникновение мутантов диагностического, иммунологического и вакцинального ускользания (*англ. escape*) (escape-мутантов), которые выявляются во всём мире [4]. Вакцины, созданные на основе поверхностного антигена (HBsAg) вируса дикого типа, защищают не от всех escape-мутантов [5].

Процесс распространения подобных мутантов, по-видимому, происходит неравномерно, что зависит, прежде всего, от генотипа возбудителя [4, 6]. Кроме того, escape-мутации преимущественно накапливаются у лиц определённых категорий, то есть в особых группах риска. В частности, наибольшая встречаемость мутантов продемонстрирована у онкогематологических больных [7, 8], вакцинированных детей [7], а также у получивших иммунопрофилактику детей, рождённых от матерей – носителей вируса [10].

Проникновение escape-мутантов в популяции (в т.ч. охарактеризованные выше) напрямую связано также с ошибками обнаружения этих видоизменённых вариантов вируса [11]. Аналитическая чувствительность тестирования на HBsAg зависит от генотипа или субтипа ВГВ, но в случае escape-мутаций ситуация гораздо более сложная и неоднозначная. Исследования показали, что мутации в S-гене ВГВ, расположенные вблизи а-детерминанты HBsAg или в регуляторных элементах, могут существенным образом влиять на антигенные профили HBsAg, при-

водя иногда к полному нарушению распознавания последнего моноклональными антителами (АТ) диагностических тест-систем [11, 12]. Даже наиболее чувствительная на сегодняшний день количественная хемилюминесцентная тест-система «Lumipulse HBsAg-HQ» (Fujirebio Inc., Япония), которая имеет по отношению к ВГВ дикого типа диагностическую чувствительность 0,005 МЕ/мл (с нижним порогом детекции $\sim 0,0011$ МЕ/мл), обеспечивает существенно худшее качество выявления рекомбинантных HBsAg с escape-мутациями по сравнению с диким типом этого антигена [12]. В то же время в целях адекватной оценки чувствительности подобных тест-систем в отношении escape-мутантов желательнее использовать сывороточные панели с природными мутантами, так как серологический портрет мутантного HBsAg естественного происхождения может не совпадать с таковым его рекомбинантного варианта [13]. Помимо этого, возможно снижение чувствительности диагностической тест-системы на фоне присутствия множественных escape-мутаций в HBsAg. В итоге недостаточно тщательная оценка способности тест-системы к обнаружению escape-мутантов может иметь результатом их недовыявление.

В настоящее время не существует рутинных диагностических тестов для определения мутантов подобного рода. Наиболее эффективным и надёжным способом является секвенирование нового поколения (*next generation sequencing, NGS*) [7], однако на сегодняшний день это достаточно трудоёмкая и дорогая методика. Разрабатывались решения на основе методов полимеразной цепной реакции (*polymerase chain reaction, PCR*) и гэп-лигазной цепной реакции (*gap ligase chain reaction, g-LCR*), например для детекции escape-мутантов D144A [14] и G145R [15, 16]. Кроме того, известны попытки применения ПЦР предельного разведения (*limiting dilution cloning PCR, LDC-PCR*) в сочетании с секвенированием для выявления escape-мутаций в 120, 126, 128, 133, 141–145 а.о. [17, 18]. Были также разработаны микрочипы для ДНК-идентификации генотипов ВГВ и выявления важных мутаций в генах *S*, *Pol*, *Core* и *X* [19]. Однако все эти исследования не привели к разработке полноценных диагностических тест-систем. Ранее мы предлагали алгоритм серологического поиска мутаций в 143 и 145 а.о. HBsAg в сыворотке крови (S-HBsAg), основанный на серологическом портретировании – иммуноферментном выявлении дефектов взаимодействия данного антигена с моноклональными анти-HBsAg АТ по критерию падения чувствительности иммуноферментного анализа (ИФА) в ≥ 10 раз при серийных 10-кратных разведениях сывороток [20]. Однако этот вариант оказался довольно трудоёмким, поскольку предполагал использование 11 моноклональных конъюгатов.

Целью данной работы стала оценка чувствительности и специфичности метода серологического портретирования, адаптированного для рутинного выявления escape-мутаций в 143 и 145 а.о. S-HBsAg.

Материал и методы

Образцы. Исследование проводили на 56 образцах сывороток крови, которые были получены от пациентов различных стационаров и донорских пунктов Российской Федерации. На основании данных анамнеза или источника получения образцов пациентов разделили на следующие группы: доноры ($n = 11$), хронические носители HBsAg (группа «Носители») ($n = 8$) и страдающие злокачественными заболеваниями крови (группа «Онкогематология») ($n = 37$).

Образцы сывороток исследовали на наличие серологических маркёров возбудителя гепатита В (HBsAg, AT анти-HBs, антиген инфекционности HBeAg, анти-HBe IgG, анти-HBc IgM + IgG). Кроме того, в пробах определяли уровень вирусной нагрузки ВГВ. Анализ escape-мутаций в положениях 143 и 145 а.о. проводили методами NGS и ИФА посредством иммуноферментной тест-системы «Гепастрип-мутант-3К». Сыворотки проверяли также на AT к вирусам гепатитов С и D.

Диагностические наборы. Исследование сывороток крови на наличие HBsAg проводили с использованием иммуноферментной тест-системы «Гепастрип В» (ООО «Ниармедик Плюс», Россия). Для ряда образцов определяли количество HBsAg, используя отраслевой стандарт (ОСО) HBsAg 42-28-311-00 (ООО «НПО «Диагностические системы», Россия). Тестирование на другие маркёры инфицирования ВГВ, а также на наличие суммарных антител к вирусам гепатитов С и D выполняли методом ИФА с использованием тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия): «ВектоHBe-IgG» (кат. № D-0578), «ВектоHBe антиген» (кат. № D-0576), «Векто-HBc антитела» (кат. № D-0566), «Векто-HBsAg антитела» (кат. № D-0562), «Бест анти-ВГС» (комплект 3) (кат. № D-0773) и «Вектогеп D-антитела» (кат. № D-0954). ИФА проводили в соответствии с прилагаемыми инструкциями производителя.

Выделение и количественное определение ДНК ВГВ осуществляли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с помощью набора реагентов «РеалБест ДНК ВГВ» (количественный вариант) (кат. № D-0599, ЗАО «Вектор-Бест», Россия) также согласно инструкции производителя.

Моноклональные конъюгаты. Моноклональные мышиные AT к HBsAg (11F3, H2), а также их конъюгаты с пероксидазой хрена, приготовленные по методу P. Tijssen и соавт. [21], получены в лаборатории медиаторов и эффекторов иммунитета ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» (НИЦЭМ) Минздрава России. Кроме того, использовали коммерчески доступный конъюгат NF5 (ООО «Сорбент», Россия).

Полногеномное глубокое секвенирование изолятов вируса гепатита В. Полногеномное исследование методом NGS проводили для всех 56 изолятов. С целью амплификации образцов ДНК использовали праймеры, расположенные в консервативных участ-

ках генома, с учётом перекрытия амплифицируемых локусов. Каждую реакцию амплификации осуществляли отдельно. В реакции использовали следующие праймеры [22, 23]:

- пара 1: 1-TCACCATATCTTGGGAACAAGA, 2-CGAACCACTGAACAAATGGC;
- пара 2: 1-GCCATTTGTTTCAGTGGTTCG, 2-TGGGCGTTCACGGTGGT;
- пара 3: 1-ACCACCGTGAACGCCA, 2-TCTTGTCCCAAGAATATGGTGA.

Длина первого ПЦР-продукта составила 1103 п.н., второго – 946 и третьего – 1226 п.н. После амплификации выполняли агарозный гель-электрофорез полученных ПЦР-продуктов. В полученных ампликонах измеряли концентрацию ДНК с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США). Далее все 3 продукта амплификации смешивали эквимолярно в одном образце с последующим определением содержания нуклеиновой кислоты в суммированных амплифицированных образцах также при помощи флуориметра Qubit 2. Концентрация ДНК в образцах нормировалась до 15 нг/мкл. Для приготовления индексированных библиотек в реакцию брали по 100 нг каждого образца; библиотеки были приготовлены в соответствии со стандартным протоколом производителя.

Секвенирование NGS проводили на платформе Ion PMG (Life Technologies, США) с использованием чипов типа 316 по стандартному протоколу. Каждый чип вмещал 16 подготовленных индексированных геномных библиотек при теоретической расчётной ёмкости от 300 М до 1 G, т.е. от 300 млн до 1 млрд нуклеотидов. За расчётную величину брали практическую ёмкость в 500 М исходя из длины генома ВГВ, равной ~3200 п.н. Расчётная глубина секвенирования при одновременном исследовании 16 индексированных геномных библиотек составляла ~9700 прочтений на образец. Результаты секвенирования показали, что средняя глубина прочтения разных образцов составила ~1000–10 000.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей S-гена и сравнительный анализ первичной нуклеотидной последовательности выполняли при помощи программы Vector NTI 9.0 (ThermoFisher Scientific Inc. (Invitrogen), США). В качестве референсных данных использовали последовательности геномов ВГВ (генотипы А–Н), полученные из базы GenBank. Определение генотипов, субтипов и мутаций ВГВ проводили с учётом данных опубликованных ранее работ [11, 25, 26]. Для выравнивания последовательностей применяли также следующие референсы из GenBank: JX096956 (Latvia, субгенотип D2) и X98077, субтип adw [27]. В данной статье приведён анализ относительно части гена S, соответствующей S-HBsAg ВГВ.

Оценка escape-мутантов HBsAg с помощью адаптированной методики серологического портретирования с ИФА набором «Гепастрип-мутант-3К». Методика, реализованная в виде иммуноферментного набора «Гепастрип-мутант-3К», основана на данных работы А.И. Баженова и соавт. [20]. Это «сэндвич»-вариант ИФА, разработанный для поиска мутантов HBsAg в позитив-

ных по данному маркеру образцах, отобранных при скрининговом исследовании человеческих сывороток посредством любой универсальной тест-системы. В ходе анализа поликлональные анти-НВs АТ, сорбированные на поверхности лунок планшетов, связывают НВsAg в сыворотке или плазме крови человека, а образовавшийся комплекс антиген–антитело обнаруживается с помощью пероксидазных конъюгатов мышинных моноклональных АТ по цветной реакции с хромогеном. При этом используются 3 конъюгата, обладающих различной специфичностью в отношении к НВsAg дикого и мутантного типов. Конъюгат 11F3 практически не выявляет варианты НВsAg, несущие мутации S143L и G145R, в то время как конъюгат H2 выявляет как НВsAg дикого типа, так и названные варианты. Третий конъюгат (NF5) реагирует с мутантом в области 143 (но не 145) а.о.

Для каждой исследуемой НВsAg-содержащей сыворотки готовили серию 10-кратных разведений (от 1/10 до 1/1 000 000) в буфере, включающем 125 мМ HEPES ((4-(2-гидроксипиперидин)-1-пиперазинэтансульфоную кислоту)), 438 мМ сахарозу, 192 мМ хлорид натрия, 1,25% (v/v) казеин, 3,3 мМ *p*-гидроксифенил-уксусную кислоту, 5% (w/v) BSA (bovine serum albumin; бычий сывороточный альбумин, БСА), 1% (w/v) человеческий γ -глобулин, 12,2 мкМ метиловый оранжевый, 1,95 мкМ бромфеноловый красный, 0,1% (v/v) ProClin-300, 10% (w/v) мертиолят, 21,6 мкМ амфотерицин В, 0,01% (v/v) гентамицин и 1% (v/v) Твин-20. Каждое разведение сыворотки тестировали с конъюгатами в 4 дублях. Способность конъюгатов выявлять НВsAg в образцах сывороток оценивали относительно НВsAg дикого типа («ИмБио»; АО «НПО «Микроген», Россия), взятого в концентрации 2 мкг/мл.

Рабочие растворы конъюгатов 11F3 (0,8–1,0 мкг/мл), H2 (2 мкг/мл) и NF5 (2 мкг/мл) готовили в буфере, содержащем 0,01 М ЭДТА (этилендиаминтетраацетат), 0,5% (w/o) сухое молоко, 12,5% (v/v) FBS (fetal bovine serum, фетальная бычья сыворотка) (инактивированную 30 мин при 56 °С), 12,5% (v/v) нормальную кроличью сыворотку (инактивированную аналогичным образом), 0,05% (w/o) сапонин, 0,0125% (v/v) Triton X-405, 0,00625% (v/v) Твин-80, 15 мМ калий йодид, 0,1% (v/v) *n*-пропил-галлат, 0,15 М хлорид натрия, 0,5 М мочевины, 0,005% (w/o) бромкрезоловый пурпурный, 0,35% (w/o) тиоцианат калия, 0,1% (w/v) Цвиттергент, 10% (w/v) мертиолят (орто-этилртутьтиосалицилат натрия), 21,6 мкМ амфотерицин В, 0,01% (v/v) гентамицин в растворе Версена.

Для постановки реакции в лунки планшета из тест-системы «Гепастрип В» с иммобилизованными козьими поликлональными АТ анти-НВs вносили по 50 мкл рабочего раствора конъюгата 11F3, H2 или NF5. Каждый из них тестировали по отдельности со всеми разведениями сыворотки (либо с контрольным антигеном дикого типа). После этого в контрольные лунки планшета добавляли по 100 мкл НВsAg дикого типа или буфер, использующийся для разведения сывороток (отрицательный контроль), а в оставшиеся лунки вносили разведения тестируемых сыворо-

ток. Планшет инкубировали во влажной камере при температуре +37 °С на протяжении 2 ч, после чего отмывали 8 раз раствором PBST (Phosphate Buffered Saline Tween 20) (0,15 М хлорид натрия, 2,67 мМ натрия гидрофосфат дигидрат, 0,01% азид натрия, 0,1% (v/v) Твин-20; pH 7,2–7,5). Затем во все лунки вносили 100 мкл свежеприготовленного по стандартной методике раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорида (ТМБ) в субстратном буфере, содержащем пероксид водорода, и выдерживали 30 мин при +37 °С. Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 50 мкл 2 М серной кислоты, после чего сразу производили учёт результатов на спектрофотометре Sunrise (Tecan, Швейцария) при 450 нм против референсной длины волны 620 нм.

Оценку сравнительной активности конъюгатов проводили для разведений НВsAg-содержащей сыворотки со значениями оптической плотности, позволяющими сравнивать активность 2 конъюгатов, т.е. $\leq 3,0$ (плато).

Сыворотки, имеющие в одинаковых разведениях сходные значения оптической плотности с конъюгатами H2 и 11F3, относятся к дикому типу. Образцы же, дающие с конъюгатом H2 значения оптической плотности, превышающие таковые для 11F3 в >10 раз, могут содержать мутацию в положениях 143 или 145 а.о. и требуют дальнейшего исследования. Для этого используется третий конъюгат – NF5, который реагирует с мутантом в области 143 а.о. (но не 145 а.о.). Если реактивность образца сыворотки с конъюгатом H2 не превышает таковую с NF5 в >10 раз, это означает, что в данной пробе присутствует НВsAg с мутацией в положении 143 а.о. Если же реактивность сыворотки с конъюгатом H2 превышает таковую в >10 раз как с 11F3, так и с NF5, можно заключить, что имеющийся НВsAg несёт мутацию в позиции 145 а.о.

Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом при ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (Протокол № 104 от 28.01.2015 г.).

Результаты и обсуждение

По результатам NGS только 5 (8,93%) среди 56 образцов имели мутацию в 143 а.о., причём 4 из них принадлежали группе лиц с онкогематологической патологией. Таким образом, распространённость мутации в позиции 143 а.о. составила 10,81% (4 из 37) (см. табл. 1). При этом 3 из 5 образцов содержали гомогенную мутацию S143T, а 2 оставшихся – мутацию S143L. Все образцы с вариантом S143T, относившиеся к субтипу *adw1* генотипов А и D, определены иммуноферментной тест-системой «Гепастрип-мутант-3К» как содержащие дикий тип, несмотря на достаточно высокий уровень вирусной ДНК (10^5 – 10^8 копий/мл). Низкотитражная сыворотка с гетерогенной мутацией S143L, относительное содержание которой составило 31%, также идентифицирована как имеющая дикий тип вируса. Лишь 1 из 5 сывороток с ВГВ, мутантным по 143 а.о. S-НВsAg, правильно

определена ИФА тест-системой. Это была высокотитражная сыворотка из группы «Доноры», содержащая ВГВ генотипа D субтипа ayw3 (см. табл. 1).

По сравнению с заменами в 143 а.о. мутация в 145 а.о. S-HBsAg встречалась реже и аналогичным образом доминировала в образцах из группы «Онкогематология», однако лучше детектировалась с помощью ИФА (см. табл. 2). Все 4 обнаруженные замены в 145 а.о. представляли собой мутацию G145R. Таким

образом, частота встречаемости этой мутации у онкогематологических больных составила 8,11% (3 из 37), а в целом среди всех исследованных образцов – 7,14% (4 из 56). В 2 случаях мутация оказалась гомогенной, а в 2 других – представленной в виде минорных популяций (22–25%). Оба образца со 100% мутацией G145R правильно идентифицированы иммуноферментной тест-системой. Тем не менее, чувствительность последней оказалась недостаточной для де-

Таблица 1. Выявление мутации в позиции 143 аминокислотного остатка S-HBsAg вируса гепатита В в сыворотках с помощью иммуноферментной тест-системы «Гепастрип-мутант-3К»

Table 1. Detection of mutation in 143 amino acid position of S-HBsAg hepatitis B virus in sera using the enzyme-linked immunosorbent assay kit «Hepastrip-mutant-3K»

№ сыворотки* Serum number*	Группа пациентов Patients' group	Маркеры вирусных гепатитов в сыворотке Markers of viral hepatitis in the serum								Свойства ВГВ по результатам NGS HBV properties according to NGS			Гепастрип-мутант-3К Hepastrip-mutant-3K			Оценка S-HBsAg S-HBsAg assessment
		ВГВ HBV				Другие Others							Оптимальное разведение сыворотки (1 : x) для определения конъюгатом‡ Optimal dilution of serum (1 : x) for detecting by conjugate‡			
		HBsAg§	анти-HBsAg§ anti-HBsAg§	HBeAg	анти-HBe IgG anti-HBe IgG	анти-HBc IgM + IgG anti-HBc IgM + IgG	ДНК, копий/мл DNA, copies/ml	анти-HCV anti-HCV	анти-HDV anti-HDV	Генотип Geno-type	Субтип Sub-type	Мутация в 143 а.о.† Mutation in 143 aa†	11F3	H2	NF5	
18	Онкогематология Hematologic malignancies	+	-	+	-	-	3,0 × 10 ⁸	-	-	A	adw1	S143T 99%	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	дикий тип wild type
29		+	-	-	+	+	2,9 × 10 ⁵	-	-	D	adw1	S143T 100%	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	дикий тип wild type
33		+	-	-	+	+	4,5 × 10 ⁸	-	-	D	adw1	S143T 100%	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	дикий тип wild type
35		+	-	-	+	+	3,7 × 10 ³	-	-	D	ayw3	S143L 31%	10 ³	10 ³	10 ³	дикий тип wild type
77	Доноры Donors	95	<10	-	+	+	7,4 × 10 ⁸	+	+	D	ayw3	S143L 100%	исходный original	10 ⁴	10 ⁵	замена в позиции 143 а.о. substitution in 143 aa position

Примечание: *номера сывороток 1–40 из группы «Онкогематология» соответствуют нумерации из работы [7], содержащей детали диагноза и молекулярно-биологические характеристики; §величина обозначает установленную концентрацию аналита (МЕ/мл); †величина обозначает содержание ВГВ с указанной мутацией относительно общего пула вируса; ‡темно-серая заливка обозначает дефект распознавания в ≥100 раз, светло-серая – в ≥10 раз; «+» – положительный результат, «-» – отрицательный результат; NGS – секвенирование нового поколения.

Note. *the numbers of sera from 1 to 40 from the group «Hematologic malignancies» correspond to the numbering according [7], which contains the details of the diagnosis and molecular biological features; §the value indicates the measured concentration of the analyte (IU/ml); †the value indicates the content of the HBV with such mutation relative to the total viral pool; ‡the recognition defect that is not less than 100 times is highlighted in dark gray, and the recognition defect that is not less than 10 times is highlighted in light gray; «+», positive result; «-», negative result; NGS, next generation sequencing.

текции минорных популяций G145R: в одном случае проба определена как дикий тип, а во втором – как замена в 143 а.о. В последнем случае образец ВГВ (№ 66) имел генотип, который можно отнести к рекомбинантной форме D/E. При этом он нёс в S-HBsAg минорную мутацию L216Opal (содержание 21%) наряду с относящимися к мутациям диагностического ускользания заменами V118A и V128A, что, вероятно, могло повлиять на выявление мутации G145R.

Среди оставшихся 47 образцов 8 представляли собой сыворотки со слабовыраженными дефек-

тами по моноклональным конъюгатам (≤ 10 раз) (табл. 3). Объединяющих их мутаций, позволяющих отчётливо идентифицировать характерный серологический портрет, не обнаружено (табл. 3 и 4). Интересным представляется факт, что escape-мутация D144E, встречающаяся в гомогенном виде в образцах №№ 65 и 10, показала серологическую реакцию, отличающуюся от картины мутационных изменений в позициях 143 и 145 а.о., несмотря близкую к ним расположенность. В частности, оба образца с заменой D144E имели слабый дефект по конъюгату NF5. Эта

Таблица 2. Выявление мутации в позиции 145 аминокислотного остатка S-HBsAg вируса гепатита В в сыворотках с помощью иммуноферментной тест-системы «Гепастрип-мутант-3К»

Table 2. Detection of mutation in 145 amino acid position of S-HBsAg hepatitis B virus in sera using the enzyme-linked immunosorbent assay kit «Hepastrip-mutant-3K»

№ сыворотки* Serum Number*	Группа пациентов Patients' group	Маркеры вирусных гепатитов в сыворотке Markers of viral hepatitis in the serum								Свойства ВГВ по результатам NGS HBV properties according to NGS	Гепастрип-мутант-3К Hepastrip-mutant-3K			Оценка S-HBsAg S-HBsAg assessment		
		ВГВ HBV				Другие Others					Оптимальное разведение сыворотки (1 : x) для определения конъюгатом [‡] Optimal dilution of serum (1 : x) for detecting by conjugate [‡]	11F3	H2		NF5	
		HBsAg [§]	анти-HBsAg [§] anti-HBsAg [§]	HBeAg	анти-HBe IgG anti-HBe IgG	анти-HBc IgM + IgG anti-HBc IgM + IgG	ДНК, копий/мл DNA, copies/ml	анти-HCV anti-HCV	анти-HDV anti-HDV							Генотип Genotype
1	Онкогематология Hematologic malignancies	60	30	–	+	+	$1,0 \times 10^8$	–	–	D/E?	ayw2/ay?	G145R 100%	10 ²	10 ⁵	10 ⁴	замена в позиции 145 а.о. substitution in 145 aa position
2		95	–	+	±	+	$9,4 \times 10^7$	–	–	D	adw3	G145R 100%	10 ²	10 ⁵	10 ³	замена в позиции 145 а.о. substitution in 145 aa position
15		+	–	–	+	+	$1,4 \times 10^8$	n/t [#] n/t [#]	–	D	ayw?	G145R 25%	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	дикий тип wild type
66	HBsAg-носители HBsAg carriers	>1	<10	+	+	+	$3,7 \times 10^8$	–	–	D/E?	ayw3	G145R 22%	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵	замена в позиции 143 а.о. substitution in 143 aa position

Примечание: *номера сывороток 1–40 из группы «Онкогематология» соответствуют нумерации из работы [7], содержащей детали диагноза и молекулярно-биологические характеристики; [§]величина обозначает установленную концентрацию аналита (МЕ/мл); [†]величина обозначает содержание ВГВ с указанной мутацией относительно общего пула вируса; [‡]тёмно-серая заливка обозначает дефект распознавания в ≥ 100 раз, светло-серая – в ≥ 10 раз; [#]n/t – не тестировано; «+» – положительный результат, «–» – отрицательный результат.

Note. *the numbers of sera from 1 to 40 from the group «Hematologic malignancies» correspond to the numbering according [7], which contains the details of the diagnosis and molecular biological features; [§]the value indicates the measured concentration of the analyte (IU/ml); [†]the value indicates the content of the HBV with such mutation relative to the total viral pool; [‡]the recognition defect that is not less than 100 times is highlighted in dark gray, and the recognition defect that is not less than 10 times is highlighted in light gray; «+», positive result; «–», negative result; [#]n/t, not tested.

Таблица 3. Характеристика сывороток со слабовыраженными дефектами распознавания вируса гепатита В моноклональными конъюгатами из иммуноферментной тест-системы «Гепастрип-мутант-3К»

Table 3. Features of sera with mild defects of hepatitis B virus recognition by monoclonal conjugates with the enzyme-linked immunosorbent assay kit «Hepastrip-mutant-3K»

№ сыворотки* Serum number*	Группа пациентов Patients' group	Маркеры вирусных гепатитов в сыворотке Markers of viral hepatitis in serum								Свойства ВГВ по результатам NGS HBV properties according to NGS			Гепастрип-мутант-3К Hepastrip-mutant-3K			
		ВГВ HBV						Другие Others					Оптимальное разведение сыворотки (1 : x) для определения конъюгатом [‡] Optimal dilution of serum (1 : x) for detecting by conjugate [‡]			Оценка S-HBsAg S-HBsAg assessment
		HBsAg [§]	анти-HBsAg [§] anti-HBsAg [§]	HBeAg	анти-HBe IgG anti-HBe IgG	анти-HBc IgM + IgG anti-HBc IgM + IgG	ДНК, копий/мл DNA, copies/ml	анти-HCV anti-HCV	анти-HDV anti-HDV	Гено-тип Geno-type	Суб-тип Sub-type	Общие мутации Mutual mutations	11F3	H2	NF5	
14	Онкогематология Hematologic malignancies	+	-	-	+	+	6,0 × 10 ⁷	н/д [†] n/t [†]	-	D	ayw2	нет none	10 ³	10 ³	10 ⁴	замена в позиции 143 а.о. substitution in 143 a.o. position?
38	Онкогематология Hematologic malignancies	+	-	+	+	+	5,0 × 10 ⁸	н/д n/t	-	D2	ayw3	нет none	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁶	замена в позиции 143 а.о. substitution in 143 a.o. position?
40	Онкогематология Hematologic malignancies	+	-	-	+	+	1,1 × 10 ⁵	-	-	D2	ayw3	нет none	10 ³	10 ³	10 ⁴	замена в позиции 143 а.о. substitution in 143 a.o. position?
63	HBsAg-носители HBsAg carriers	>1	-	+	+	+	4,4 × 10 ⁵	-	-	D	ayw2	нет none	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴	?
64	HBsAg-носители HBsAg carriers	>1	-	+	+	+	1,4 × 10 ⁸	-	-	D	ayw2	нет none	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴	?
65	HBsAg-носители HBsAg carriers	>1	-	+	+	+	2,5 × 10 ⁷	-	-	D/E?	adw2	нет none	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁵	?
9	Онкогематология Hematologic malignancies	+	н/т n/t	-	н/т n/t	+	н/т n/t	н/т n/t	н/т n/t	D	ayw3	нет none	10	10	исходный original	?
10	Онкогематология Hematologic malignancies	+	н/т n/t	н/т n/t	н/т n/t	н/т n/t	4,7 × 10 ⁶	н/т n/t	н/т n/t	D	adw3	нет none	10 ⁵	10 ⁴	10 ⁴	?

Примечание: *номера сывороток 1–40 из группы «Онкогематология» соответствуют нумерации из работы [7], содержащей детали диагноза и молекулярно-биологические характеристики; [§]величина обозначает установленную концентрацию аналита (МЕ/мл); [†]н/т – не тестировано; [‡]серая заливка обозначает дефект распознавания в ≥10 раз; «+» – положительный результат, «-» – отрицательный результат; «?» – характер изменений неясен.

Note. *the numbers of sera from 1 to 40 from the group «Hematologic malignancies» correspond to the numbering according [7], which contains the details of the diagnosis and molecular biological features; [§]the value indicates the measured concentration of the analyte (IU/ml); [†]n/t, not tested; [‡]the recognition defect that is not less than 10 times is highlighted in gray; «+», positive result; «-», negative result; «?», the details of the changes are unclear.

же мутация обнаружена ещё в одном образце группы «Онкогематология», однако её содержание не превышало 72%; вероятно, по этой причине в тест-системе «Гепастрип-мутант-3К» не зарегистрирован даже слабый дефект распознавания. Серологический портрет остальных 38 образцов также ничем не отличался от портрета дикого типа вируса.

HBsAg является основным серологическим маркером для выявления острой и мониторинга хронической ВГВ-инфекции. Уровень ДНК возбудителя у вирусоносителей, которые проходят лечение аналогами нуклеозидов/нуклеотидов, может опускаться ниже предела обнаружения. Поэтому для мониторинга течения хронической ВГВ-инфекции используется количественное определение HBsAg, в т.ч. в фазах иммунотолерантности, иммунного клиренса и иммунного контроля (неактивной фазы), а также при реактивации HBeAg-негативной формы заболевания [12]. Однако при использовании даже самых чувствительных методов определения HBsAg могут иметь место диагностические ошибки. Такая возможность появляется в том случае, если в образце присутствуют escape-мутанты, особенно при их множественном возникновении у одного и того же пациента. Это способствует увеличению эпидемиологической опасности, особенно учитывая накопление мутационных изменений в группах риска [7].

Полученные нами результаты показывают, что рутинный поиск escape-мутантов оправдан именно в таких субпопуляциях, одной из которых являются страдающие онкогематологическими заболеваниями лица. Escape-мутации S143L/T, D144E и G145R выявлены преимущественно у этой категории больных с частотой 10,81, 5,41 и 8,11% соответственно. Чувствительность иммуноферментного выявления этих мутаций оказалась невелика. Наиболее отчётливый результат достигнут при 100% гомогенности мутации и высокой концентрации ДНК ВГВ. Несмотря на это, обнаружена специфичность иммуноферментного выявления замены S143L в отличие от S143T. Кроме того, надёжность выявления мутаций S143L и G145R напрямую связана с глубиной выявляемых серологических дефектов. В случае мутации S143L снижение глубины дефекта распознавания мутантного HBsAg моноклональным конъюгатом 11F3 до величины ≤ 10 раз приводила к погрешности определения, выявляя в качестве сомнительных образцы с ВГВ, не содержащих такой замены. Это обосновывает необходимость проведения дальнейших экспериментов по уточнению количественных критериев используемой тест-системы.

Другим важным аспектом подхода, описанного в данной работе, может являться применение его в целях разработки и контроля качества вакцин, на-

Таблица 4. Мутации в S-HBsAg в образцах со слабовыраженными дефектами распознавания вируса гепатита В моноклональными конъюгатами иммуноферментной тест-системы «Гепастрип-мутант-3К»

Table 4. Mutations in S-HBsAg in samples with mild defects of hepatitis B virus recognition by monoclonal conjugates of enzyme-linked immunosorbent assay kit «Hepastrip-mutant-3K»

№ сыворотки* Serum number*	Группа пациентов Patients' group	Дефект по конъюгатам в ИФА Conjugate defect in ELISA	Генотип ВГВ HBV genotype	Субтип ВГВ HBV subtype	Аминокислотные замены в S-HBsAg и степень их гомогенности Amino acid substitutions in S-HBsAg, and their homogeneity
14	Онкогематология Hematologic malignancies	11F3, H2	D	ayw2	V118T (100%); V128A (100%); E164A (40%); T189I (21%); S207N/H/R (39%); L222I (21%)
38	Онкогематология Hematologic malignancies		D2	ayw3	нет none
40	Онкогематология Hematologic malignancies		D2	ayw3	S114P (<100%)
63	HBsAg-носители HBsAg carriers	NF 5	D	ayw2	V118T (100%); V128A (100%); T189I (68%); L216Opal (21%)
64	HBsAg-носители HBsAg carriers		D	ayw2	R24K (27%); V118T (100%); V128A (100%)
65	HBsAg-носители HBsAg carriers		D/E?	adw2	P11L (99%); V118T (100%); V128A (100%); Y134H (94%); D144E (100%); V177A (98%)
9	Онкогематология Hematologic malignancies		D	ayw3	S114A (97%)
10	Онкогематология Hematologic malignancies	H2, NF5	D	adw3	V118T (100%); V128A (100%); D144E (100%); S174N (100%); L222R (66%); I226S (99%)

Примечание: *номера сывороток 1–40 из группы «Онкогематология» соответствуют нумерации из работы [7], содержащей детали диагноза и молекулярно-биологические характеристики; ИФА – иммуноферментный анализ.

Note. *the numbers of sera from 1 to 40 from the group «Hematologic malignancies» correspond to the numbering according [7], which contains the details of the diagnosis and molecular biological features; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

правленных против ескаре-мутантов. В такой ситуации рекомбинантный HBsAg с мутацией может рассматриваться как гомогенный белковый препарат, и тест-система «Гепастрип-мутант-3К» позволит отчётливо выявлять правильный фолдинг этого мутантного белка в количественном отношении.

Заключение

Иммуноферментный вариант детекции ескаре-мутаций S143L, D144E и G145R может быть использован в рутинной лабораторной диагностике, особенно в группах риска. Тем не менее, возможно уточнение параметров диагностической чувствительности и специфичности тест-системы, а также критериев оценки наличия мутационных изменений при дополнительных исследованиях на увеличенной выборке образцов, охарактеризованных молекулярно-биологическими методами. Кроме того, данная тест-система и методика в целом применимы для разработки и контроля качества вакцин против ескаре-мутантов.

ЛИТЕРАТУРА

- Mahamat G., Kenmoe S., Akazong E.W., Ebogo-Belobo J.T., Mbaga D.S., Bowo-Ngandji A., et al. Global prevalence of hepatitis B virus serological markers among healthcare workers: A systematic review and meta-analysis. *World J. Hepatol.* 2021; 13(9): 1190–202. <https://doi.org/10.4254/wjh.v13.i9.1190>
- Polaris Observatory Collaborators. The case for simplifying and using absolute targets for viral hepatitis elimination goals. *J. Viral Hepat.* 2021; 28(1): 12–9. <https://doi.org/10.1111/jvh.13412>
- Han Q., Zhang C., Zhang J., Tian Z. The role of innate immunity in HBV infection. *Semin. Immunopathol.* 2013; 35(1): 23–38. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0331-y>
- Araujo N.M., Teles S.A., Spitz N. Comprehensive Analysis of Clinically Significant Hepatitis B Virus Mutations in Relation to Genotype, Subgenotype and Geographic Region. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 616023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.616023>
- Баженов А.И., Эльгорт Д.А., Фельдшерова А.А., Будницкая П.З., Никитина Г.И., Хац Ю.С., и др. Выявление антител к мутантным формам HBsAg у лиц, иммунизированных против гепатита В вакцинами разных субтипов. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* 2011; 5(60): 49–53.
- Hossain M.G., Ueda K. A meta-analysis on genetic variability of RT/HBsAg overlapping region of hepatitis B virus (HBV) isolates of Bangladesh. *Infect. Agent. Cancer.* 2019; 14: 33. <https://doi.org/10.1186/s13027-019-0253-6>
- Konopleva M.V., Belenikin M.S., Shanko A.V., Bazhenov A.I., Kiryanov S.A., Tupoleva T.A., et al. Detection of S-HBsAg Mutations in Patients with Hematologic Malignancies. *Diagnostics (Basel).* 2021; 11(6): 969. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11060969>
- Семенов Т.А., Ярош Л.В., Баженов А.И., Никитина Г.Ю., Клейменов Д.А., Эльгорт Д.А., и др. Эпидемиологическая оценка распространенности «скрытых» форм и HBsAg-мутантов вируса гепатита В у гематологических больных. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* 2012; 6(67): 9–14.
- Hsu H.Y., Chang M.H., Ni Y.H., Chen H.L. Survey of hepatitis B surface variant infection in children 15 years after a nationwide vaccination programme in Taiwan. *Gut.* 2004; 53(10): 1499–503. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.034223>
- Komatsu H., Inui A., Umetsu S., Tsunoda T., Sogo T., Konishi Y., et al. Evaluation of the G145R Mutant of the Hepatitis B Virus as a Minor Strain in Mother-to-Child Transmission. *PLoS One.* 2016; 11(11): e0165674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165674>
- Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J. Clin. Virol.* 2005; 32(2): 102–12. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.10.008>
- Deguchi M., Kagita M., Yoshioka N., Tsukamoto H., Takao M., Tahara K., et al. Evaluation of the highly sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay “Lumipulse HBsAg-HQ” for hepatitis B virus screening. *J. Clin. Lab. Anal.* 2018; 32(4): e22334. <https://doi.org/10.1002/jcla.22334>
- Коноплева М.В., Борисова В.Н., Соколова М.В., Фельдшерова А.А., Крымский М.А., Семенов Т.А., и др. Сравнительная характеристика антигенных свойств рекомбинантных и нативных HBs-антигенов с мутацией G145R и оценка их иммуногенности. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(4): 179–86. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-179-186>
- Cuestas M.L., Mathet V.L., Oubiña J.R. Specific primer sets used to amplify by PCR the hepatitis B virus overlapping S/Pol region select different viral variants. *J. Viral Hepat.* 2012; 19(10): 754–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2012.01614.x>
- Zhang M., Gong Y., Osiowy C., Minuk G.Y. Rapid detection of hepatitis B virus mutations using real-time PCR and melting curve analysis. *Hepatology.* 2002; 36(3): 723–8. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.35346>
- Osiowy C. Sensitive Detection of HBsAg Mutants by a Gap Ligase Chain Reaction Assay. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(7): 2566–71. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.7.2566-2571.2002>
- Nainan O.V., Khristova M.L., Byun K., Xia G., Taylor P.E., Stevens C.E., et al. Genetic variation of hepatitis B surface antigen coding region among infants with chronic hepatitis B virus infection. *J. Med. Virol.* 2002; 68(3): 319–27. <https://doi.org/10.1002/jmv.10206>
- Osiowy C. Detection of HBsAg mutants. *J. Med. Virol.* 2006; 78(S1): S48–51. <https://doi.org/10.1002/jmv.20607>
- Gauthier M., Bonnaud B., Arsac M., Lavocat F., Maisetti J., Kay A., et al. Microarray for hepatitis B virus genotyping and detection of 994 mutations along the genome. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(11): 4207–15. <https://doi.org/10.1128/JCM.00344-10>
- Баженов А.И., Коноплева М.В., Эльгорт Д.А., Фельдшерова А.А., Будницкая П.З., Никитина Н.И., и др. Алгоритм серологического поиска и оценка распространенности серологически значимых HBsAg-мутаций у хронических носителей вируса гепатита В. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2007; 6: 30–7.
- Tijssen P., Kurstak E. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates enzyme immunoassays. *Anal. Biochem.* 1984; 136(2): 451–7. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90243-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90243-4)
- Pumpens P., Grens E., Nassal M. Molecular Epidemiology and Immunology of Hepatitis B Virus Infection. *Intervirology.* 2002; 45: 218–32.
- Zheng X., Weinberger K.M., Gehrke R., Isogawa M., Hilken G., Kemper T., et al. Mutant hepatitis B virus surface antigens (HBsAg) are immunogenic but may have a changed specificity. *Virology.* 2004; 329: 454–64. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.08.033>
- Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J. Clin. Virol.* 2005; 32: 102–12. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.10.008>
- Norder H., Hammas B., Löfdahl S., Couroucé A.M., Magnius L.O. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J. Gen. Virol.* 1992; 73(5): 1201–8. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-5-1201>
- Norder H., Couroucé A.M., Coursaget P., Echevarria J.M., Lee S.D., Mushahwar I.K., et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology.* 2004; 47(6): 289–309. <https://doi.org/10.1159/000080872>
- Pult I., Chouard T., Wieland S., Klemenz R., Yaniv M., Blum H.E. A hepatitis B virus mutant with a new hepatocyte nuclear factor 1 binding site emerging in transplant-transmitted fulminant hepatitis B. *Hepatology.* 1997; 25(6): 1507–15. <https://doi.org/10.1002/hep.510250633>

REFERENCES

- Mahamat G., Kenmoe S., Akazong E.W., Ebogo-Belobo J.T., Mbaga D.S., Bowo-Ngandji A., et al. Global prevalence of hepatitis B virus serological markers among healthcare workers: A systematic review and meta-analysis. *World J. Hepatol.* 2021; 13(9): 1190–202. <https://doi.org/10.4254/wjh.v13.i9.1190>
- Polaris Observatory Collaborators. The case for simplifying and using absolute targets for viral hepatitis elimination goals. *J. Viral Hepat.* 2021; 28(1): 12–9. <https://doi.org/10.1111/jvh.13412>

3. Han Q., Zhang C., Zhang J., Tian Z. The role of innate immunity in HBV infection. *Semin. Immunopathol.* 2013; 35(1): 23–38. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0331-y>
4. Araujo N.M., Teles S.A., Spitz N. Comprehensive Analysis of Clinically Significant Hepatitis B Virus Mutations in Relation to Genotype, Subgenotype and Geographic Region. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 616023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.616023>
5. Bazhenov A.I., Elgort D.A., Feldsherova A.A., Budnitskaya P.Z., Nikitina G.I., Hats Yu.S., et al. Detection of antibodies to HBsAg mutant forms in individuals immunized of different subtypes hepatitis B vaccines [Vyyavlenie antitel k mutantnym formam HBsAg u lits, immunizirovannykh protiv gepatita B vaksiniami raznykh subtipov]. *Epidemiologiya i Vaksinoprofilaktika.* 2011; 5(60): 49–53 (in Russian).
6. Hossain M.G., Ueda K. A meta-analysis on genetic variability of RT/HBsAg overlapping region of hepatitis B virus (HBV) isolates of Bangladesh. *Infect. Agent. Cancer.* 2019; 14: 33. <https://doi.org/10.1186/s13027-019-0253-6>
7. Konopleva M.V., Belenikin M.S., Shanko A.V., Bazhenov A.I., Kiryanov S.A., Tupoleva T.A., et al. Detection of S-HBsAg Mutations in Patients with Hematologic Malignancies. *Diagnostics (Basel).* 2021; 11(6): 969. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11060969>
8. Semenenko T.A., Yarosh L.V., Bazhenov A.I., Nikitina G.Yu., Kleimenov D.A., Elgort D.A., et al. Epidemiological evaluation of the prevalence of «occult» forms and HBsAg mutants of hepatitis B virus in hematological patients [Epidemiologicheskaya otsenka rasprostranennosti «skrytykh» form i HBsAg-mutantov virusa gepatita B u gematologicheskikh bol'nykh]. *Epidemiologiya i Vaksinoprofilaktika.* 2012; 6 (67): 9–14 (in Russian).
9. Hsu H.Y., Chang M.H., Ni Y.H., Chen H.L. Survey of hepatitis B surface variant infection in children 15 years after a nationwide vaccination programme in Taiwan. *Gut.* 2004; 53(10): 1499–503. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.034223>
10. Komatsu H., Inui A., Umetsu S., Tsunoda T., Sogo T., Konishi Y., et al. Evaluation of the G145R Mutant of the Hepatitis B Virus as a Minor Strain in Mother-to-Child Transmission. *PLoS One.* 2016; 11(11): e0165674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165674>
11. Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J. Clin. Virol.* 2005; 32(2): 102–12. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.10.008>
12. Deguchi M., Kagita M., Yoshioka N., Tsukamoto H., Takao M., Tahara K., et al. Evaluation of the highly sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay “Lumipulse HBsAg-HQ” for hepatitis B virus screening. *J. Clin. Lab. Anal.* 2018; 32(4): e22334. <https://doi.org/10.1002/jcla.22334>
13. Konopleva M.V., Borisova V.N., Sokolova M.V., Feldsherova A.A., Krymskij M.A., Semenenko T.A., et al. A comparative characteristic of antigenic properties of recombinant and native HBs-antigens with G145R mutation and evaluation of their immunogenicity [Sravnitel'naya kharakteristika antigennykh svoystv rekombinantnykh i nativnykh HBs-antigenov s mutatsiyey G145R i otsenka ikh immunogennosti]. *Voprosy virusologii.* 2017; 62(4): 179–86. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-179-186> (in Russian)
14. Cuestas M.L., Mathet V.L., Oubiña J.R. Specific primer sets used to amplify by PCR the hepatitis B virus overlapping S/Pol region select different viral variants. *J. Viral. Hepat.* 2012; 19(10): 754–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2012.01614.x>
15. Zhang M., Gong Y., Osiowy C., Minuk G.Y. Rapid detection of hepatitis B virus mutations using real-time PCR and melting curve analysis. *Hepatology.* 2002; 36(3): 723–8. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.35346>
16. Osiowy C. Sensitive Detection of HBsAg Mutants by a Gap Ligase Chain Reaction Assay. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(7): 2566–71. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.7.2566-2571.2002>
17. Nainan O.V., Khristova M.L., Byun K., Xia G., Taylor P.E., Stevens C.E., et al. Genetic variation of hepatitis B surface antigen coding region among infants with chronic hepatitis B virus infection. *J. Med. Virol.* 2002; 68(3): 319–27. <https://doi.org/10.1002/jmv.10206>
18. Osiowy C. Detection of HBsAg mutants. *J. Med. Virol.* 2006; 78(S1): S48–51. <https://doi.org/10.1128/JCM.00344-10>
19. Gauthier M., Bonnaud B., Arsac M., Lavocat F., Maisetti J., Kay A., et al. Microarray for hepatitis B virus genotyping and detection of 994 mutations along the genome. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(11): 4207–15. <https://doi.org/10.1128/JCM.00344-10>
20. Bazhenov A.I., Konopleva M.V., Elgort D.A., Feldsherova A.A., Budnitskaya P.Z., Nikitina N.I., et al. Algorithm of serologic screening and assessment of prevalence of serologically meaningful mutations of HBsAg in hepatitis B virus carriers [Algoritm serologicheskogo poiska i otsenka rasprostranennosti serologicheskikh znachimyykh HBsAg-mutatsiy u khronicheskikh nositeley virusa gepatita B]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 6: 30–7 (in Russian).
21. Tijssen P., Kurstak E. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates enzyme immunoassays. *Anal. Biochem.* 1984; 136 (2): 451–7. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90243-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90243-4)
22. Pumpens P., Grens E., Nassal M. Molecular Epidemiology and Immunology of Hepatitis B Virus Infection. *Intervirology.* 2002; 45: 218–32.
23. Zheng X., Weinberger K.M., Gehrke D., Isogawa M., Hilkene G., Kemper T. et al. Mutant hepatitis B virus surface antigens (HBsAg) are immunogenic but may have a changed specificity. *Virology.* 2004; 329: 454–64. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.08.033>
24. Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J. Clin. Virol.* 2005; 32: 102–12. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.10.008>
25. Norder H., Hammas B., Löfdahl S., Couroucé A.M., Magnus L.O. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J. Gen. Virol.* 1992; 73(5): 1201–8. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-5-1201>
26. Norder H., Couroucé A.M., Coursaget P., Echevarria J.M., Lee S.D., Mushahwar I.K. et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology.* 2004; 47(6): 289–309. <https://doi.org/10.1159/000080872>
27. Pult I., Chouard T., Wieland S., Klemenz R., Yaniv M., Blum H.E. A hepatitis B virus mutant with a new hepatocyte nuclear factor 1 binding site emerging in transplant-transmitted fulminant hepatitis B. *Hepatology.* 1997; 25(6): 1507–15. <https://doi.org/10.1002/hep.510250633>

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-92>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Распространенность маркеров вирусного гепатита В среди доноров крови в Гвинейской Республике

Бумбали С.^{1,2}, Балде Т.А.Л.², Семенов А.В.³, Останкова Ю.В.⁴, Серикова Е.Н.⁴, Найденова Е.В.⁵, Валутите Д.Э.⁴, Щемелев А.Н.⁴, Зуева Е.Б.⁴, Эсауленко Е.В.⁴, Тотолян Арег А.⁴

¹Международный исследовательский центр по тропическим инфекциям в Гвинее, Нзерекоре, Гвинейская Республика;

²Исследовательский институт прикладной биологии Гвинее, Киндиа, Гвинейская Республика;

³ФБУН 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;

⁴ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 197101, Санкт-Петербург, Россия;

⁵ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 410005, Саратов, Россия

Введение. Проблема трансфузионной безопасности в отношении парентеральных вирусных гепатитов до настоящего времени сохраняет свою актуальность. Вирусный гепатит В (ГВ) остается наиболее распространенной вирусной инфекцией, передаваемой при трансфузиологических манипуляциях. Одной из естественных фаз течения хронического вирусного гепатита В (ХГВ) является оккультный гепатит (ОкГВ), характеризующийся недетектируемым уровнем HBsAg (независимо от содержания иных серологических маркеров) при наличии ДНК ВГВ в ткани печени и крайне низким уровнем вирусной нагрузки в крови вплоть до неопределяемого. В Гвинейской Республике, как и в большинстве государств континента, профилактика трансфузионной передачи ВГВ посредством скрининга доноров до сих пор основывается на изолированном серологическом определении HBsAg, в связи с чем ОкГВ сохраняется в качестве потенциальной угрозы для гемотрансфузионной безопасности. Определение ДНК ВГВ служит надёжной профилактической мерой против передачи вируса от доноров с HBsAg-негативным ГВ, особенно в высокоэндемичных регионах. В связи с этим для обоснования рекомендаций по повышению безопасности крови на фоне значительной частоты встречаемости ВГВ на территории Гвинейской Республики проведено настоящее исследование.

Цель работы – оценка распространенности серологических и молекулярно-генетических маркеров вирусного гепатита В (ГВ) у доноров крови в Гвинейской Республике.

Материал и методы. Исследованы 250 образцов крови, полученные от доноров, проживающих на территории г. Конакри (Гвинейская Республика). В пробах определяли наличие серологических (поверхностный антиген – HBsAg; антитела (АТ) к поверхностному (анти-HBs IgG) и ядерному (коровому) (анти-HBc IgG) антигенам) и молекулярно-генетических (ДНК) маркеров этой инфекции.

Результаты и обсуждение. Встречаемость маркеров вирусного ГВ составила 83,2%; HBsAg обнаружен у 16,4% исследуемых. Частота его выявления оказалась более высокой среди мужчин (19,55%) по сравнению с женщинами (8,45%), относительный риск инфицирования вирусом с формированием HBsAg-положительной хронической формы заболевания у лиц мужского пола также достоверно выше. Значение распространенности ДНК возбудителя в исследуемой группе составило 30,4%; при этом 15,6% приходится на ОкГВ. Показано преобладание данного варианта течения инфекционного процесса у доноров 30–49 лет (24,78%). Среди лиц моложе 30 лет встречаемость ОкГВ оказалась ниже (8,73%), а в возрасте от 50 лет и старше оккультная форма ГВ не выявлена. На основании филогенетического анализа 76 изолятов вируса установлено преобладание в исследованной группе генотипа Е (85,53%).

Случаи выявления ДНК патогена имели место у HBsAg-негативных доноров крови при наличии АТ анти-HBs IgG ($n = 4$), а также на фоне одновременного присутствия анти-HBs IgG и анти-HBc IgG ($n = 7$). При этом показатель вирусной нагрузки превышал 200 МЕ/мл. В ходе секвенирования в каждом образце обнаружены эскаре-мутации, способствующие ускользанию вируса от диагностики при скринировании на HBsAg.

Заключение. Оценка распространенности маркеров ГВ у доноров крови, определение генотипов и клинически значимых мутаций вариантов вируса необходимо для обеспечения биологической и трансфузионной безопасности при медицинских манипуляциях, контроля и предотвращения распространения данного инфекционного агента.

Ключевые слова: вирусный гепатит В (ГВ); оккультный вирусный гепатит В (ОкГВ); вирус гепатита В (ВГВ); серологические маркеры; молекулярно-биологические маркеры; лабораторная диагностика; инфекционная безопасность крови; доноры крови; Гвинейская Республика

Для цитирования: Бумбали С., Балде Т.А.Л., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Найденова Е.В., Валутите Д.Э., Щемелев А.Н., Зуева Е.Б., Эсауленко Е.В., Тотолян Арег А. Распространенность маркеров вирусного гепатита В среди доноров крови в Гвинейской Республике. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(1): 60-68. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-92>

Для корреспонденции: Останкова Юлия Владимировна, канд. биол. наук, заведующая лабораторией иммунологии и вирусологии ВИЧ-инфекции, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии, ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 197101, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: shenna1@yandex.ru

Участие авторов: Бумбали С. – планирование и организация исследований, доставка образцов; Балде Т.А.Л. – проведение исследований, доставка образцов; Семенов А.В. – организация исследований, написание текста статьи; Останкова Ю.В. – проведение исследований, подбор литературы, статистическая обработка данных, подготовка иллюстративного материала, написание текста статьи; Серикова Е.Н. – проведение исследований; Найденова Е.В. – проведение исследований, написание текста статьи; Валутите Д.Э. – проведение исследований; Щемелев А.Н. – проведение исследований; Зуева Е.Б. – проведение исследований; Эсауленко Е.В. – руководство исследованиями, написание текста статьи; Тотолян Арег А. – общее руководство, написание текста статьи.

Финансирование. Исследования проводились в рамках распоряжений Правительства Российской Федерации N 1448-р от 25.07.2015, N 2904-р от 22.12.2017 и N 2985-р от 14.11.2020 г. о российско-гвинейском научно-техническом сотрудничестве в области эпидемиологии, профилактики и мониторинга бактериальных и вирусных инфекций в Гвинейской Республике.

Благодарность. Авторский коллектив выражает благодарность за помощь в сборе образцов биологического материала руководству и сотрудникам регионального госпиталя г. Конакри (Сонакру) (Гвинейская Республика).

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен решением Национального этического комитета Министерства здравоохранения Гвинейской Республики (Протокол № 129/CNERS/16 от 31.08.2015 г.).

Поступила 23.12.2021

Принята в печать 27.01.2022

Опубликована 28.02.2022

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-92>

Prevalence of viral hepatitis B markers among blood donors in the Republic of Guinea

Sanaba Boumbaly^{1,2}, Thierno Amadu Labe Balde², Alexandr V. Semenov³, Yulia V. Ostankova⁴, Elena N. Serikova⁴, Ekaterina V. Naidenova⁵, Diana E. Valutite⁴, Alexandr N. Shchemelev⁴, Elena B. Zueva⁴, Elena V. Esaulenko⁴, Areg A. Totolian⁴

¹International Tropical Infections Research Center, Nzérékoré, Republic of Guinea;

²Research Institute of Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea;

³FSBI State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rospotrebnadzor), 630559, Novosibirsk Region, Kol'tsovo, Russia;

⁴FBSI «Saint Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor), 197101, Saint Petersburg, Russia;

⁵FSHI Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor), 410005, Saratov, Russia

Introduction. The problem of transfusion safety in relation to parenteral viral hepatitis still remains relevant. Viral hepatitis B (HB) remains the most common viral infection transmitted through transfusion procedures. One of the natural phases of chronic hepatitis B (CHB) is occult hepatitis B infection (OBI), characterized by an undetectable HBsAg (regardless of the other serological markers content) in the presence of hepatitis B virus (HBV) DNA in the liver tissue and an extremely low, up to undetectable, level of viral load in the blood. In the Republic of Guinea, as in most countries on the continent, the prevention of HBV transmission through transfusion is still based on HBsAg serological testing of donors only. In this connection, OBI remains as a potential threat to blood transfusion safety. Detection of HBV DNA is a reliable preventive measure against transmission of the virus from donors with HBsAg-negative HBV infection, especially in highly endemic regions. In this regard, the study was conducted to substantiate recommendations for improving blood safety against the background of significant HBV prevalence in the Republic of Guinea.

The **aim** of the work was the evaluation of serological and molecular markers of HBV infection in blood donors in the Republic of Guinea.

Material and methods. We examined 250 blood samples obtained from donors living in Conakry, Republic of Guinea. Samples were tested for the presence of serological (surface antigen, HBsAg; antibodies (ABs) to surface (anti-HBs IgG) and core (anti-HBc IgG) antigens) and molecular (DNA) markers of HBV infection.

Results and discussion. The overall detection rate of hepatitis B markers was 83.2%; HBsAg was detected in 16.4% of all individuals. The high incidence of HBsAg in men (19.55%) compared to women (8.45%) was shown, the relative risk of HBV infection with the formation of HBsAg-positive chronic hepatitis B in males was also significantly higher. The prevalence of the HBV DNA in the study group was 30.4%, the OBI cases accounted for 15.6%. The prevalence of this form of the disease was shown in donors aged 30–49 years (24.78%), in the group of people younger than 30 years, the incidence was lower (8.73%), and at the age of over 50 years, OBI was not detected. Based on the phylogenetic analysis of 76 virus isolates, it was shown that genotype E prevails in the examined group (85.53%).

Cases of pathogen DNA detection occurred in HBsAg-negative blood donors in the presence of anti-HBs IgG ($n = 4$), as well as in the simultaneous presence of ABs anti-HBs IgG and anti-HBc IgG ($n = 7$). The viral load exceeded 200 IU/ml in OBI samples. Escape mutations were detected by sequencing in each OBI sample, contributing to the virus escaping from diagnostic based on screening for HBsAg.

Conclusion. Assessment of the prevalence viral hepatitis B markers in blood donors, determination of genotypes and clinically significant mutations of virus variants are necessary to ensure safe medical manipulations, control and prevention of the spread of this infectious agent.

Keywords: *viral hepatitis B (HB); occult hepatitis B infection (OBI); hepatitis B virus (HBV); serological markers; molecular biological markers; laboratory diagnostics; infectious blood safety; blood donors; Republic of Guinea*

Forcitation: Boumbaly S., Balde T.A.L., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Naidenova E.V., Valutite D.E., Shchemelev A.N., Zueva E.B., Esaulenko E.V., Totolian Areg A. Prevalence of viral hepatitis B markers among blood donors in the Republic of Guinea. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(1): 60-68.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-92>

For correspondence: Yulia V. Ostankova, Ph.D. (Biol.), Head of the HIV Infection Immunology and Virology Laboratory, Senior Researcher of the Molecular Immunology Laboratory, FBSI «Saint Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology» of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (Rosпотребнадзор), 197101, Saint Petersburg, Russia.

E-mail: shenna1@yandex.ru

Information about the authors:

Boumbaly S., <https://orcid.org/0000-0002-4506-6033>

Balde T.A.L., <https://orcid.org/0000-0002-3808-4380>

Semenov A.V., <https://orcid.org/0000-0003-3223-8219>

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

Serikova E.N., <https://orcid.org/0000-0002-0547-3945>

Naidenova E.V., <https://orcid.org/0000-0001-6474-3696>

Valutite D.E., <https://orcid.org/0000-0002-0931-102X>

Shchemelev A.N., <https://orcid.org/0000-0002-3139-3674>

Zueva E.B., <https://orcid.org/0000-0002-0579-110X>

Esaulenko E.V., <https://orcid.org/0000-0003-3669-1993>

Totolian Areg A., <https://orcid.org/0000-0003-4571-8799>

Contribution: Boumbaly S. – planning and organization of research, sample delivery; Balde T.A.L. – planning and organization of research, sample delivery; Semenov A.V. – organization of research, article text writing; Ostankova Yu.V. – conducting research, literature selection, statistical data processing, illustrative material preparing, article text writing; Serikova E.N. – conducting research; Naidenova E.V. – conducting research, article text writing; Valutite D.E. – conducting research; Shchemelev A.N. – conducting research; Zueva E.B. – conducting research; Esaulenko E.V. – managing of research, article text writing; Totolian Areg A. – general guidance, article text writing.

Funding. The studies were conducted within the framework of the Orders of the Government of the Russian Federation Nos. 1448-r of July 25, 2015, 2904-r of December 22, 2017, and 2985-r of November 14, 2020 on Russian-Guinean scientific and technical cooperation in the field of epidemiology, prevention and monitoring of bacterial and viral infections in the Republic of Guinea.

Acknowledgement. The authors' team is grateful for the help in collecting samples of biological material to the management and employees of the regional hospitals of Conakry (Republic of Guinea).

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

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the National Ethics Committee Ministry of Health of the Republic of Guinea (Approval No. 129/CNERS/16 dated August 31, 2015).

Received 23 December 2021

Accepted 27 January 2022

Published 28 February 2022

Введение

Проблема трансфузионной безопасности в отношении парентеральных вирусных гепатитов до настоящего времени сохраняет свою актуальность. Вирусный гепатит В (ГВ) остается наиболее распространенной вирусной инфекцией, передаваемой при трансфузиологических манипуляциях [1]. Несмотря на значимость объема переливаемой плазмы или компонентов крови, определяющую роль в плане инфицирования играет суммарная концентрация вирусных частиц, полученных реципиентом от донора, так как минимальная инфекционная доза для заражения вирусом ГВ (ВГВ – *Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*) составляет ~16 копий (3 МЕ/мл) ДНК этого патогена [2]. Таким образом, переливание компонентов крови остается одним из ведущих вариантов искусственного пути передачи ВГВ. На протяжении последних десятилетий риск такой передачи возбудителя ГВ неуклонно снижался за счет сложившейся в большинстве стран мира регламентированной практики обеспечения безопасности гемоконтактной терапии. Так, к уменьшению вероятности инфицирования ведет определенный порядок формирования донорских кадров, включающий набор добровольцев, медицинское освидетельствование, лабораторное тестирование по декретированным показателям и отбор кандидатов на основе оценки поведенческого риска. Один из способов снизить вероятность передачи ВГВ при переливании донорской крови – полноценный скрининг образцов. Определение присутствия данного инфекционного агента в сыворотке возможно по биохимическим, гистологическим и вирусологическим характеристикам, таким, например, как уровень активности аланинаминотрансферазы (АЛТ), наличие связанных с ГВ антител (АТ) и/или антигенов и ДНК вируса. Однако в большинстве лабораторий установление факта инфицированности доноров производится только по одному серологическому маркеру – поверхностному антигену ВГВ (НВsAg), что на сегодняшний день, безусловно, недостаточно. Во-первых, инфекция не будет выявлена в период «серонегативного окна», который составляет ~59 дней (в среднем 45–50 для наиболее чувствительных тест-систем). Во-вторых, одной из естественных фаз течения хронического вирусного гепатита В (ХГВ) является occultный гепатит (ОкГВ), характеризующийся недетектируемым уровнем НВsAg (независимо от содержания иных серологических маркеров) при наличии ДНК ВГВ в ткани печени и крайне низким уровнем вирусной нагрузки в крови вплоть до неопределяемого [3]. Истинный ОкГВ можно разделить на серонегативный и серопозитивный. При этом развитие данной формы инфекции в первом случае может быть как мгновенным (при первичном инфицировании), так и постепенным с потерей серологических маркеров по мере клинического течения заболевания. При серопозитивном же варианте ОкГВ потеря НВsAg может являться либо итогом разрешения острого ГВ, либо

последовательной фазой прогрессирования ХГВ [4]. Третьей причиной отрицательного результата выявления НВsAg могут быть мутации, связанные с конформационными и гидрофобными изменениями внутри и за пределами главного гидрофильного региона (области) (major hydrophilic region, MHR) НВsAg – основной мишени для захвата АТ в коммерческих наборах (так называемый ложный ОкГВ) [1].

Учитывая сказанное, в некоторых странах процедура скрининга доноров при выявлении серологических маркеров ГВ расширена введением протокола определения АТ анти-НВс IgG [5]. В отличие от НВsAg последние могут присутствовать как при ХГВ, так и в период реконвалесценции острой инфекции, когда НВsAg детектируется не во всех случаях. Однако тест-системы для определения серологических маркеров ГВ изначально разрабатывались для обследования пациентов с подозрением на заболевание, а не для скринирования доноров, и могут давать ложноположительный результат, так как их чувствительность часто выше специфичности, а показатели ложной реактивности могут составлять от 16 до 75% [1, 5]. Кроме того, тесты на анти-НВс IgG не выявляют инфекцию в период «серонегативного окна», а стратегия скрининга доноров на анти-НВс IgG не может быть использована в регионах с высокой встречаемостью ВГВ, поскольку становится возможной неприемлемо большая потеря потенциальных доноров крови. Тем не менее тестирование на анти-НВс IgG по-прежнему может играть значительную роль в алгоритмах скрининга ввиду снижения остаточного риска инфицирования.

В ряде стран для выявления инфицированных доноров крови введено обязательное тестирование на присутствие ДНК ВГВ [5]. Поскольку, как уже сказано выше, для ОкГВ характерна очень низкая (чаще неопределяемая) вирусная нагрузка, такая процедура затруднена, в связи с чем сформулированы рекомендации по использованию для обнаружения вируса как коммерческих наборов, так и комплектов олигонуклеотидов совместно с вложенной, или гнездовой (*англ. nested*) полимеразной цепной реакцией (ПЦР), разработанных в лабораториях, изучающих данный патоген [3, 6].

В большинстве случаев ОкГВ протекает бессимптомно, не проявляясь клинически и морфологически на протяжении нескольких лет [7]. Распространенность ОкГВ в мире варьирует от региона к региону и в целом тем больше, чем выше доля НВsAg-позитивных больных ХГВ. В странах Африки ВГВ широко распространен; соответственно, встречаемость occultной формы ХГВ потенциально также высока. В частности, распространенность ОкГВ среди городского населения африканских государств по некоторым данным достигает 30% [8]. В Гвинейской Республике, как и в большинстве государств континента, профилактика трансфузионной передачи ВГВ посредством скрининга доноров до сих пор основывается на изолированном серологическом определении НВsAg [9, 10]. В связи с этим ОкГВ сохраняется

в качестве потенциальной угрозы для гемотрансфузионной безопасности.

Выявление ДНК ВГВ у доноров крови является сложной задачей для стран с низким уровнем дохода, таких как Гвинейская Республика, из-за высокой стоимости диагностики, ограниченности имеющихся материально-технических ресурсов и недостаточного количества обученного персонала. Несмотря на то что в период борьбы с эпидемией болезни, вызванной вирусом Эбола (БВВЭ) (*Filoviridae: Ebolavirus: Zaire ebolavirus*) в 2014–2016 гг., в рамках международного сотрудничества в стране разворачивались сети госпиталей, оборудовались диагностические лаборатории и проводилось обучение персонала, молекулярно-генетические методы по-прежнему не используются при скринировании донорской крови на парентеральные гепатиты и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus*). Это частично связано с тем, что все вышеупомянутые ресурсы в большинстве своем направлены на выявление возбудителей особо опасных инфекций [11]. Тем не менее определение ДНК ВГВ служит надежной профилактической мерой против передачи вируса от доноров с HBsAg-негативным ГВ, особенно в высокоэндемичных по нему регионах. В связи с этим для обоснования рекомендаций по повышению безопасности крови на фоне значительной частоты встречаемости ВГВ на территории Гвинейской Республики проведено настоящее исследование.

Целью работы являлась оценка распространенности серологических и молекулярно-генетических маркеров возбудителя ГВ среди доноров крови в Гвинейской Республике.

Материал и методы

В работе использовали образцы плазмы крови, полученные в 2019 г. от 250 добровольных доноров, проживающих на территории г. Конакри (Гвинейская Республика). Лабораторные исследования проводили на базе Российско-гвинейского научного исследовательского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней, расположенного на территории Исследовательского института прикладной биологии Гвинеи (IRBAG) в префектуре Киндиа. На проведение данного этапа работы было получено согласие Национального этического комитета Министерства здравоохранения Гвинейской Республики (Протокол № 129/CNERS/16 от 31 августа 2015 г.). Все участвующие в эксперименте лица предоставили письменное информированное согласие на проведение исследований.

Обследование пациентов на наличие серологических маркеров парентеральных вирусных гепатитов методом иммуноферментного анализа (ИФА) производили путем качественного определения HBsAg, АТ анти-HBs IgG и анти-HBc IgG с использованием коммерческих наборов «ДС-ИФА-HBsAg», «ДС-ИФА-АНТИ-HBsAg», «ДС-ИФА-АНТИ-HBc» (НПО «Диагностические системы», Россия) и «Вектогеп В-HBs-антиген», «ВектоHBsAg-антигена», «Гепабест

анти-HBc-IgG», (АО «Вектор-Бест», Россия) согласно инструкциям производителя.

Выявление генетических маркеров возбудителя ГВ осуществляли методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией как при помощи коммерческого набора «АмплиСенс HBV-FL» (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии, Россия) в соответствии с инструкциями производителя, так и с использованием разработанной в ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» методики, позволяющей детектировать ДНК ВГВ в биологическом материале при низкой вирусной нагрузке, в т.ч. при HBsAg-негативном ГВ или ОкГВ [6].

Для определения генотипов вируса выполняли nested-ПЦР с последующим секвенированием. Использовали перекрывающиеся пары праймеров, совместно фланкирующие фрагмент протяженностью 1475 п.н., который включает регион HBs Pre-S1/Pre-S2/S размером 1169 п.н. (область 2848–3182...1–835 п.н.) согласно представленному в международной базе данных GenBank изоляту Mart-B47 (HE974377.1) [12].

Статистическую обработку данных производили с помощью пакетов программ MS Excel professional plus 2013 (Microsoft), Prizm v5.0 (GraphPad Software Inc.). При оценке статистической погрешности использовали «точный» интервал Клоппера–Пирсона. Результаты представляли с указанием 95% доверительного интервала (ДИ). Для оценки достоверности различий численных данных, полученных при парных сравнениях, использовали (в зависимости от характеристик выборок) точный критерий Фишера или критерий χ^2 с поправкой Йейтса. В качестве порога достоверности отличий значение вероятности определили как $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Возраст обследованных варьировал от 18 до 72 лет. Доля мужчин в группе превышала число женщин в 2,5 раза: 71,6 и 28,4% (95% ДИ: 65,58–77,1) соответственно. На первом этапе исследования проведен гендерно-возрастной анализ доноров крови, у которых получали образцы для выявления маркеров ГВ (**рисунок**).

При оценке общей распространенности серологических маркеров в исследуемых образцах их встречаемость составила 83,2% (95% ДИ: 77,98–87,62), однако HBsAg обнаружен у лишь 16,4% (95% ДИ: 12,03–21,58) лиц. Результат анализа встречаемости исследованных маркеров ГВ в группе представлен в **табл. 1**.

Высокая встречаемость серологических маркеров ГВ в группе обследованных, свидетельствующая о контакте с вирусом большинства из них, подтверждает данные о распространенности патогена на территории Африканского региона. Так, например, в Республике Гвинея-Бисау контакт с ВГВ доказан у 91,9% доноров крови [13]. Частота положительной детекции HBsAg у первичных доноров в Гвинейской Республике в исследовании 1999–2000 гг.

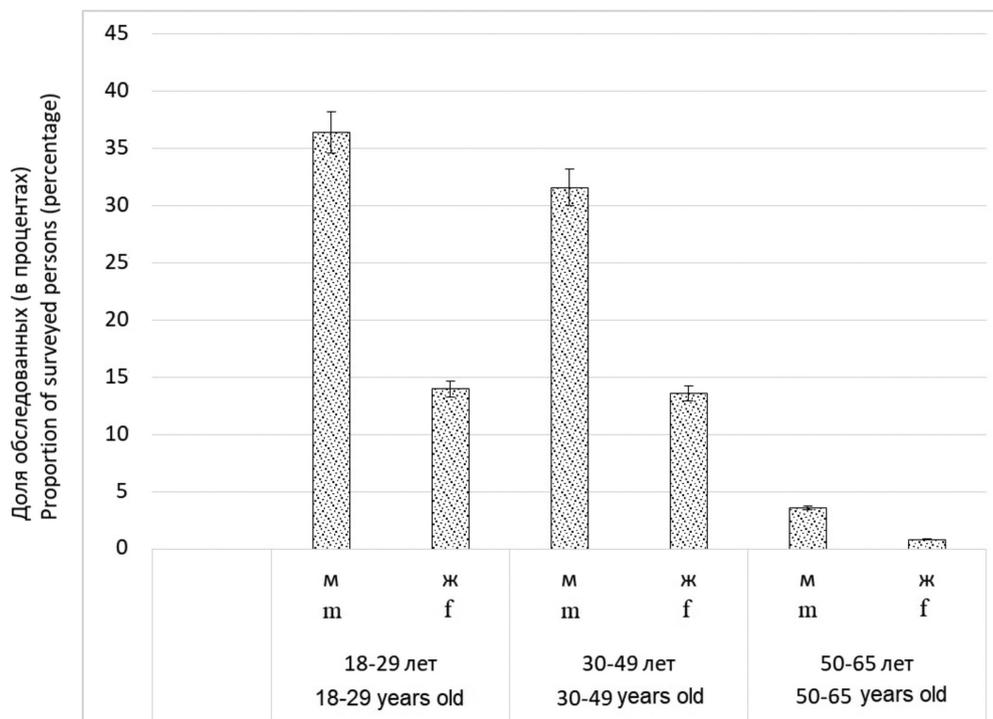


Рис. Гендерно-возрастная структура обследованных доноров крови.

Примечание. Даны следующие обозначения: м (m) – мужчины, ж (f) – женщины.

Fig. Gender-age structure of the examined blood donors.

Note. The following designations are given: m, male, f, female.

Таблица 1. Распределение серологических маркеров гепатита В (HBsAg, анти-HBc IgG, анти-HBs IgG) в обследованной группе и среди серопозитивных лиц

Table 1. Distribution of the hepatitis B serological markers (HBsAg, anti-HBc IgG, anti-HBs IgG) in the examined group and among seropositive individuals

Выявленные серологические маркеры в сыворотке крови Revealed serological markers in blood serum	Число обследованных лиц (доля в процентах) n = 250 Number of surveyed individuals (proportion in percentage) n = 250	Доля серопозитивных доноров от числа лиц с серологическими маркерами гепатита В (в процентах) n = 208 Proportion of seropositive donors out of the number of individuals with hepatitis B serological markers (in percentage) n = 208
HBsAg	41 (16.40)	19,71
HBs IgG	34 (13.60)	16,35
HBc IgG	73 (29.20)	35,10
HBc IgG + HBs IgG	60 (24.00)	28,85
Серонегативные лица Seronegative individuals	42 (16.80)	–

составляла 15% [9]. Результаты настоящего исследования подтверждают, что ГВ по-прежнему является серьезной проблемой для здравоохранения региона, и в целом соответствуют данным о распространенности маркера среди доноров крови в Западной Африке [13, 14], составляя 16,4%. Столь высокая встречаемость этого антигена в обследованной группе связана, по всей видимости, с тем, что существенная доля исследованных лиц являлись первичными донорами (64,8%; 95% ДИ: 58,53–70,71), которые в странах Африки нередко сдают кровь в целях получения вознаграждения, будучи также заинтересованы в бесплатном тестировании на ВИЧ, сифилис и парентеральные вирусные гепатиты. Отмечено, что количе-

ство HBsAg-положительных донаций по отношению к HBsAg-негативным значительно выше у первичных и/или замещающих доноров, чем среди безвозмездных доноров-добровольцев, для которых показана значительно более низкая распространенность вирусных маркеров [14]. В связи с этим возможно дополнительное повышение степени трансфузиологической безопасности за счет привлечения добровольных безвозмездных доноров к сдаче крови на регулярной основе – регулярному донорству.

При анализе встречаемости HBsAg в группе по гендерному показателю продемонстрирована значительно большая встречаемость данного маркера у мужчин (19,55%), чем среди женщин (8,45%); при этом относи-

тельный риск (relative risk, RR) инфицирования вирусом с формированием HBsAg-позитивной формы ХГВ у лиц мужского пола достоверно выше по сравнению с женщинами (RR = 2,314; 95% ДИ: 1,018–5,251; $p = 0,0369$).

В группе доноров выявлено 53,2% (95% ДИ: 46,81–59,51) случаев наличия анти-HBc IgG, из них 45,11% (24% от общего числа) – с одновременным присутствием анти-HBs IgG. Данный факт указывает на то, что 24% доноров контактировали с вирусом, выздоровели и сохраняли определяемые уровни нейтрализующих АТ после естественного заражения. В Республике Гана, стране с высокой эндемичностью по ГВ, АТ анти-HBs IgG обнаружены у 24,5% анти-HBc-реактивных доноров [15]. Большое значение имеет выявление части доноров с анти-HBs IgG, сообщающих об отсутствии вакцинации против ГВ в анамнезе.

Отдельного внимания заслуживают ситуации, характеризующиеся изолированным наличием анти-HBc IgG, поскольку существует несколько возможных объяснений подобного серологического профиля: 1) поздняя реконвалесценция острого гепатита В, при которой HBsAg не выявляется, но низкий уровень ДНК ВГВ еще может сохраняться в течение короткого времени; 2) ХГВ в присутствии анти-HBc IgG при концентрации HBsAg ниже предела чувствительности используемых диагностических наборов; 3) инфицирование вирусом, несущим мутации, приводящие к низкому уровню репликации и/или образованию измененных эпитопов HBsAg, которые не обнаруживаются с помощью используемых в практическом здравоохранении тест-систем. Таким образом, среди доноров крови с единственным серологическим маркером в виде анти-HBc IgG возможны случаи как истинного, так и ложного ОкГВ.

В литературных источниках, описывающих распространенность ОкГВ в различных популяциях, обычно представлены данные относительно определенных этнических групп или групп риска повышенного инфицирования, по каким-либо причинам заинтересовавших исследователей. Кроме того, вариабельность этого показателя зависит от применяемых для скрининга методов диагностики и их чувствительности, а также от анализируемых характеристик того или иного контингента. Например, в группах риска (ВИЧ- или ВГС-инфицированные (вирус гепатита С, *Flaviviridae: Hepacivirus: Hepacivirus C*), потребители инъекционных наркотиков и т.д.) встречаемость ОкГВ значительно выше. Несмотря на противоречивые сведения относительно его распространенности в популяциях здоровых лиц, при изучении специфического иммунитета показано, что выраженность реакции Т-хелперов 1 (Th1), способствующих развитию клеточного иммунного ответа преимущественно за счет макрофагальной активации, у пациентов с ОкГВ оказалась значительно выше, чем среди имеющих HBsAg-позитивный ХГВ [16, 17]. В процессе реактивации ОкГВ возможно увеличение репликативной активности вируса у пациентов, принимающих иммуносупрессивные препараты, а также

у ВИЧ-позитивных на фоне длительной антиретровирусной терапии; при этом результатом может быть развитие фульминантного гепатита с летальным исходом. Считается, что вероятность реактивации составляет от 21 до 67% [18]. При этом не исключена роль ОкГВ в фиброзировании ткани печени, прогрессировании до цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы при низкой вирусной нагрузке [3, 7].

В Гвинейской Республике данные относительно ОкГВ получены для ВИЧ-инфицированных пациентов и свидетельствуют об уровне распространенности до 45,16% в указанной группе [19]. Этот показатель определен также для беременных, распространенность HBsAg-негативного ГВ среди которых равна 9,84% [20].

В настоящем исследовании присутствие ДНК ВГВ зарегистрировано у 90,24% (14,8% от общего количества исследуемых) HBsAg-позитивных и у 18,66% (15,6%) HBsAg-негативных лиц, соответственно. Встречаемость ДНК ВГВ среди доноров крови составила 30,4% (95% ДИ: 24,76–36,51), причем 15,6% (95% ДИ: 11,33–20,7) приходится на случаи ОкГВ. Установленная распространенность последнего среди доноров крови в Гвинейской Республике в целом соответствует показателям стран Западной Африки, где показана частота ОкГВ на уровне 4,6–17,0%, а в отдельных когортах HBsAg-отрицательных доноров – до 32% [21]. Неоднородность данных разных исследований может быть объяснена различиями в используемых методах и стратегиях формирования анализируемых выборок [22]. В настоящей работе тестирование на вирусную ДНК выполняли индивидуально в каждом образце; диагностика же с использованием минипулов, включающих даже 2–3 образца, может повлиять на эффективность подобного тестирования за счет получаемого разбавления при объектировании проб. Низкий уровень вирусной нагрузки (<20 МЕ/мл), наблюдаемый в большинстве выявленных нами случаев, подтверждает, что доноры с истинным ОкГВ инфицированы репликационно-компетентными патогенами, репликационная активность и экспрессия генов которых подавлены.

Следует отметить, что частота выявления маркеров патогенов у доноров крови в сельской местности может быть выше по сравнению с уровнем распространенности ВГВ, выявленным нами в г. Конакри. Это может быть обусловлено, во-первых, ограниченным доступом к медицинской помощи, включая диагностику, в сельских общинах по сравнению с городскими; во-вторых, значительно более низким уровнем грамотности в сельской, нежели в городах, что может затруднить восприятие и понимание сообщений в отношении путей передачи возбудителя [8].

Возрастное распределение доноров крови с ОкГВ оказалось сходным с наблюдаемым в аналогичных популяциях в 1995–2005 гг. в странах Южно-Африканского региона. Данная форма выявлена преимущественно среди лиц 30–49 лет (24,78%; 95% ДИ: 17,14–33,78), тогда как в возрасте младше 30 лет встречаемость ее была значительно ниже (8,73%; 95% ДИ: 4,44–15,08;

$\chi^2 = 11,236$ при $p = 0,0008$, df (число степеней свободы, degrees of freedom) = 1), а в возрасте старше 50 лет ОжГВ не обнаружен ни у одного из исследуемых. Возникновение ОжГВ в более молодом возрасте, по-видимому, связано не с каким-либо характерным для региона генотипом ВГВ, а, скорее, со спецификой естественного течения и передачи инфекции на территории Африки к югу от Сахары. Подобная специфика предусматривает реализацию главным образом вертикального пути инфицирования в раннем детстве.

Результаты распределения ДНК ВГВ и серологических маркеров вируса среди HBsAg-негативных доноров крови представлены в **табл. 2**.

На основании полученных результатов следует констатировать, что изолированного скрининга донорской крови на HBsAg недостаточно для устранения риска трансфузионной передачи ВГВ в Гвинейской Республике. Тестирование донаций с целью определения ДНК вируса снижает этот риск за счет выявления ОжГВ и острых инфекций в период «серологического окна» [22]. В отсутствие тестирования на анти-HBs IgG и ДНК ВГВ проведение гемотрансфузионных мероприятий сопряжено с риском передачи инфекции от доноров, имеющих occultную форму болезни [9].

Поскольку в трансфузиологической практике существует тенденция последовательного применения тех или иных мер безопасности на фоне уже принятых для достижения конечной цели нулевого риска, соответствующие затраты и экономическая эффективность все в большей степени становятся предметом дискуссий. Однако на сегодняшний день дополнительное тестирование донаций в высокоэндемичных по ГВ регионах только на анти-HBs IgG без одновременного определения вирусной ДНК вызовет значительный дефицит снабжения компонентами и препаратами крови. Возможным решением может стать одновременный скрининг на анти-HBs IgG, поскольку их присутствие в концентрации >100 МЕ/л в анти-HBs IgG-положительных донорских средах обыч-

но считается безопасным с трансфизиологической точки зрения.

Кроме того, для всех образцов нами определены также генотипы и субгенотипы вируса. На основании филогенетического анализа 76 изолятов ВГВ показано, что в обследованной группе преобладают варианты возбудителя генотипа E (85,53%) по сравнению с генотипом A субгенотипа A3 (11,84%) и генотипа D субгенотипа D2 (2,63%). Распределение генотипов вируса у доноров крови в Гвинейской Республике в 2006 г. также продемонстрировало преобладание генотипа E (95,1%) по сравнению с A3 (1%) и рекомбинантной формой A/E (4–7%) [23].

Следует отметить, что в Гвинейской Республике распределение геновариантов ВГВ среди доноров крови отличается от такового среди ВИЧ-инфицированных лиц, у которых преобладал ВГВ генотипа E (47,36%), по сравнению с D1 – 21,05%, D2 – 15,78%, D3 – 10,52% и A2 – 5,26%, однако при этом отсутствовал субгенотип A3 ($\chi^2 = 29,739$ при $p < 0,0001$, $df = 2$) [19].

Особый интерес представляют случаи выявления вирусной ДНК у HBsAg-негативных доноров крови при наличии АТ анти-HBs IgG ($n = 4$) и одновременном присутствии антител анти-HBs IgG и анти-HBs IgG ($n = 7$), что свойственно реконвалесцентам и свидетельствует о сформировавшемся протективном иммунитете. Во всех этих случаях вирусная нагрузка превышала 200 МЕ/мл, то есть у всех 11 пациентов установлен ложный ОжГВ. Это может быть результатом точечных мутаций в располагающейся в зоне MHR S-белка ВГВ а-детерминанте. Данные мутационные изменения способны приводить к изменению иммунологического эпитопа, влиять на антигенность, иммуногенность, секрецию и/или экспрессию HBsAg, снижать или полностью подавлять репликацию и/или секрецию вириона, оказывая неблагоприятное воздействие на HBsAg, что приводит к неэффективности обнаружения указанного маркера. Для этих изолятов

Таблица 2. Распределение ДНК ВГВ и серологических маркеров вирусного гепатита В (анти-HBs IgG, анти-HBs IgG) среди HBsAg-негативных доноров крови и в общей группе

Table 2. Hepatitis B virus DNA and serological markers (anti-HBs IgG, anti-HBs IgG) distribution in the HBsAg-negative and in the general groups

Выявленные серологические маркеры и ДНК ВГВ в плазме крови Revealed HBV DNA and serological markers in blood serum	Число обследованных HBsAg-негативных доноров (доля от лиц с серологическими маркерами гепатита В, в процентах) $n = 209$ Number of HBsAg-negative donors examined (proportion of individuals with hepatitis B serological markers, in percentage) $n = 209$	Доля от общего числа обследованных лиц (в процентах) $n = 250$ Proportion of the total number of surveyed individuals (in percentage) $n = 250$
HBs IgG + ДНК ВГВ HBs IgG + HBV DNA	4 (1,91)	1,60
HBc IgG + ДНК ВГВ HBc IgG + HBV DNA	21 (10,05)	8,40
HBc IgG + HBs IgG + ДНК ВГВ HBc IgG + HBs IgG + HBV DNA	7 (3,35)	2,80
Серонегативные лица с наличием ДНК ВГВ Seronegative individuals with HBV DNA presence	7 (3,35)	2,80

мы провели секвенирование полных геномов вируса в соответствии с описанной ранее процедурой [24]. Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в международную базу GenBank под номерами MZ962189–MZ962199. Все образцы принадлежат к генотипу E; в каждом случае обнаружены мутации, ассоциированные с HBsAg-негативным ХГВ (Y100C, M103I) и/или escape-мутации, локализованные в области MHR гена S, способствующие ускользанию вируса от диагностики при скринировании на HBsAg (L115I/E, T127P, Q129H/R, M133I/A/F, C137Y, K141E, D144E, G145A/R, C147T, R149A/D). Перечисленными мутациями можно объяснить природу случаев ОкГВ, наблюдавшихся в нашем исследовании. Такие же мутационные изменения наблюдались при выявленном ложном ОкГВ у HBsAg-негативных доноров крови в Буркина-Фасо [21]. Присутствие генотипов ВГВ с escape-мутациями имеет большое клиническое значение, поскольку последние могут способствовать реактивации ГВ даже у пациентов с анти-HBs IgG.

В дальнейшем предполагается проведение анализа с молекулярно-генетической характеристикой всех выявленных вариантов ВГВ в группе доноров крови.

Заключение

Таким образом, среди доноров крови в г. Конакри установлена высокая встречаемость вирусного ГВ, включая его оккультную форму. Изучение структуры генома возбудителя заболевания, проведенное при скрининге донорской крови, доказывает значимость определения не только HBsAg, но и анти-HBc IgG наряду с ДНК ВГВ, что снизит риск передачи вируса реципиентам от доноров с ОкГВ. В высокоэндемичных по ГВ странам следует проводить собственную оценку эффективности и экономической целесообразности внедрения высокотехнологичных методов скринирования доноров крови на основе информации о ресурсах государственного здравоохранения и эпидемиологических данных. В связи с изложенным определена необходимость проведения дальнейших исследований для более точной оценки распространенности ВГВ среди первичных и регулярных доноров крови, определения генотипов и клинически значимых мутаций циркулирующих в регионе вирусных вариантов.

ЛИТЕРАТУРА

- Niederhauser C. Reducing the risk of hepatitis B virus transfusion-transmitted infection. *J. Blood Med.* 2011; 2: 91–102. <https://doi.org/10.2147/JBM.S12899>
- Candotti D., Assenato S.M., Laperche S., Allain J.P., Levicnik-Stezinar S. Multiple HBV transfusion transmissions from undetected occult infections: revising the minimal infectious dose. *Gut.* 2019; 68(2): 313–21. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316490>
- Raimondo G., Locarnini S., Pollicino T., Levrero M., Zoulim F., Lok A.S., the Taormina Workshop on Occult HBV Infection Faculty Members. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2019; 71(2): 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.03.034>
- Mulrooney-Cousins P.M., Michalak T.I. Persistent occult hepatitis B virus infection: experimental findings and clinical implications. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13(43): 5682–6. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i43.5682>
- Candotti D., Laperche S. Hepatitis B virus blood screening: need for reappraisal of blood safety measures? *Front. Med. (Lausanne).* 2018; 5: 29. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00029>
- Серикова Е.Н., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Тотолян Арег А. Метод выявления вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке с использованием ПЦР в режиме реального времени. *Клини. Лаб. Диагн.* 2021; 66(1): 59–64. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-59-64>
- Эсауленко Е.В., Никитина О.Е., Порецкова Е.А., Писарева М.М. Вирусная нагрузка при хроническом гепатите В: корреляции с лабораторно-морфологическими показателями. *Журнал инфектологии.* 2012; 4(2): 67–72.
- Arica B.S., Seremba E., Rule J., Yuan H.J., Lee W.M. High prevalence of occult hepatitis B infection in an African urban population. *J. Med. Virol.* 2016; 88(4): 674–80. <https://doi.org/10.1002/jmv.24372>
- Loua A., Sow E.M., Magassouba F.B., Camara M., Baldé M.A. Evaluation of residual infectious risk among blood donors in National Center of Blood Transfusion in Conakry. *Transfus. Clin. Biol.* 2004; 11(2): 98–100. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2004.01.004> (in French)
- Delamou A., Haba N.Y., Mari-Saez A., Gallian P., Ronse M., Jacobs J., et al. Organizing the donation of convalescent plasma for a therapeutic clinical trial on Ebola virus disease: the experience in Guinea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2016; 95(3): 647–53. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0890>
- Найденова Е.В., Лопатин А.А., Сафронов В.А., Коломоец Е.В., Левковский А.Е., Силла А.Л., и др. Обеспечение биологической безопасности при проведении противоэпидемических мероприятий в период ликвидации эпидемии лихорадки Эбола в Гвинейской Республике. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2018; 7(3): 102–8. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-13015>
- Brichler S., Lagathu G., Chekarou M.A., Le Gal F., Edouard A., Dény P., et al. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. *J. Gen. Virol.* 2013; 94(Pt. 10): 2318–29. <https://doi.org/10.1099/vir.0.055459-0>
- Hønge B.L., Olesen J.S., Jensen M.M., Jespersen S., da Silva Z.J., Rodrigues A., et al. Hepatitis B and C in the adult population of Bissau, Guinea-Bissau: a cross-sectional survey. *Trop. Med. Int. Health.* 2020; 25(2): 255–63. <https://doi.org/10.1111/tmi.13335>
- Osaro E., Charles A.T. The challenges of meeting the blood transfusion requirements in Sub-Saharan Africa: the need for the development of alternatives to allogenic blood. *J. Blood Med.* 2011; 2: 7–21. <https://doi.org/10.2147/JBM.S17194>
- Allain J.P., Candotti D., Soldan K., Sarkodie F., Phelps B., Giachetti C., et al. The risk of hepatitis B virus infection by transfusion in Kumasi, Ghana. *Blood.* 2003; 101(6): 2419–25. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-04-1084>
- Bes M., Vargas V., Piron M., Casamitjana N., Esteban J.I., Vilanova N., et al. T cell responses and viral variability in blood donation candidates with occult hepatitis B infection. *J. Hepatol.* 2012; 56(4): 765–74. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.11.011>
- Zerbini A., Pilli M., Boni C., Fiscicaro P., Penna A., Di Vincenzo P., et al. The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection. *Gastroenterology.* 2008; 134(5): 1470–81. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.02.017>
- Makvandi M. Update on occult hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol.* 2016; 22(39): 8720–34. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i39.8720>
- Щемелев А.Н., Останкова Ю.В., Зуева Е.Б., Voumbaly S., Balde T.A.L., Семенов А.В. Характеристика вируса гепатита В и вируса иммунодефицита человека среди пациентов с коинфекцией ВИЧ/ВГВ из Гвинейской Республики. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2019; (3): 118–24. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-3-118-124>
- Балде Т.А.Л., Бумбали С., Серикова Е.Н., Валутите Д.Э., Щемелев А.Н., Останкова Ю.В., и др. Сравнительный анализ вертикального риска передачи некоторых гемоконтактных инфекций в Гвинейской Республике. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2021; (1): 87–94. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-1-87-94>
- Diarra B., Yonli A.T., Sorgho P.A., Compaore T.R., Ouattara A.K., Zongo W.A., et al. Occult hepatitis B virus infection and associated

- genotypes among HBsAg-negative subjects in Burkina Faso. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2018; 10(1): e2018007. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2018.007>
22. Allain J.P., Candotti D. Diagnostic algorithm for HBV safe transfusion. *Blood Transfus.* 2009; 7(3): 174–82. <https://doi.org/10.2450/2008.0062-08>
 23. Garmiri P., Loua A., Haba N., Candotti D., Allain J.P. Deletions and recombinations in the core region of hepatitis B virus genotype E strains from asymptomatic blood donors in Guinea, west Africa. *J. Gen. Virol.* 2009; 90(Pt. 10): 2442–51. <https://doi.org/10.1099/vir.0.012013-0>
 24. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.B., Totolian Areg A. The first cases of Hepatitis B virus subgenotype D4 detection in patients with chronic, acute, and occult hepatitis B in the Russian Federation. *Mol. Gen. Microbiol. Virol.* 2020; 35: 221–8. <https://doi.org/10.3103/S0891416820040072>
- ### REFERENCES
1. Niederhauser C. Reducing the risk of hepatitis B virus transfusion-transmitted infection. *J. Blood Med.* 2011; 2: 91–102. <https://doi.org/10.2147/JBM.S12899>
 2. Candotti D., Assennato S.M., Laperche S., Allain J.P., Levicnik-Steinar S. Multiple HBV transfusion transmissions from undetected occult infections: revising the minimal infectious dose. *Gut.* 2019; 68(2): 313–21. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316490>
 3. Raimondo G., Locarnini S., Pollicino T., Levrero M., Zoulim F., Lok A.S., the Taormina Workshop on Occult HBV Infection Faculty Members. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2019; 71(2): 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.03.034>
 4. Mulrooney-Cousins P.M., Michalak T.I. Persistent occult hepatitis B virus infection: experimental findings and clinical implications. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13(43): 5682–6. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i43.5682>
 5. Candotti D., Laperche S. Hepatitis B virus blood screening: need for reappraisal of blood safety measures? *Front. Med. (Lausanne).* 2018; 5: 29. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00029>
 6. Serikova E.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Totolian Areg A. Method for detecting hepatitis B virus in blood plasma at low viral load using real-time PCR [Metod vyyavleniya virusa gepatita B v plazme krovi pri nizkoy virusnoy nagruzke s ispol'zovaniem PIsR v rezhime real'nogo vremeni]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2021; 66(1): 59–64. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-59-64> (in Russian)
 7. Esaulenko E.V., Nikitina O.E., Poretskova E.A., Pisareva M.M. Viral load in chronic hepatitis B: correlation with laboratory and morphological parameters [Virusnaya nagruzka pri khronicheskom gepatite B: korrelyatsii s laboratorno-morfologicheskimi pokazatelyami]. *Zhurnal infektologii.* 2012; 4(2): 67–72. (in Russian)
 8. Apica B.S., Seremba E., Rule J., Yuan H.J., Lee W.M. High prevalence of occult hepatitis B infection in an African urban population. *J. Med. Virol.* 2016; 88(4): 674–80. <https://doi.org/10.1002/jmv.24372>
 9. Loua A., Sow E.M., Magassouba F.B., Camara M., Baldé M.A. Evaluation of residual infectious risk among blood donors in National Center of Blood Transfusion in Conakry. *Transfus. Clin. Biol.* 2004; 11(2): 98–100. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2004.01.004> (in French)
 10. Delamou A., Haba N.Y., Mari-Saez A., Gallian P., Ronse M., Jacobs J., et al. Organizing the donation of convalescent plasma for a therapeutic clinical trial on Ebola virus disease: the experience in Guinea. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2016; 95(3): 647–53. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0890>
 11. Naidenova E.V., Lopatin A.A., Safronov V.A., Kolomoets E.V., Levkovskiy A.E., Silla A.L., et al. Biological safety at carrying out anti-epidemic measures during the liquidation of the epidemic Ebola fever in the Republic of Guinea [Obespechenie biologicheskoy bezopasnosti pri provedenii protivoepidemicheskikh meropriyatiy v period likvidatsii epidemii likhoradki Ebola v Gvineyskoy Respublike]. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie.* 2018; 7(3): 102–8. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-13015> (in Russian)
 12. Brichler S., Lagathu G., Chekaraou M.A., Le Gal F., Edouard A., Dény P., et al. African, Amerindian and European hepatitis B virus strains circulate on the Caribbean Island of Martinique. *J. Gen. Virol.* 2013; 94(Pt. 10): 2318–29. <https://doi.org/10.1099/vir.0.055459-0>
 13. Hønge B.L., Olesen J.S., Jensen M.M., Jespersen S., da Silva Z.J., Rodrigues A., et al. Hepatitis B and C in the adult population of Bissau, Guinea-Bissau: a cross-sectional survey. *Trop. Med. Int. Health.* 2020; 25(2): 255–63. <https://doi.org/10.1111/tmi.13335>
 14. Osaro E., Charles A.T. The challenges of meeting the blood transfusion requirements in Sub-Saharan Africa: the need for the development of alternatives to allogenic blood. *J. Blood Med.* 2011; 2: 7–21. <https://doi.org/10.2147/JBM.S17194>
 15. Allain J.P., Candotti D., Soldan K., Sarkodie F., Phelps B., Giachetti C., et al. The risk of hepatitis B virus infection by transfusion in Kumasi, Ghana. *Blood.* 2003; 101(6): 2419–25. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-04-1084>
 16. Bes M., Vargas V., Piron M., Casamitjana N., Esteban J.I., Vilanova N., et al. T cell responses and viral variability in blood donation candidates with occult hepatitis B infection. *J. Hepatol.* 2012; 56(4): 765–74. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.11.011>
 17. Zerbini A., Pilli M., Boni C., Fisicaro P., Penna A., Di Vincenzo P., et al. The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection. *Gastroenterology.* 2008; 134(5): 1470–81. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.02.017>
 18. Makvandi M. Update on occult hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol.* 2016; 22(39): 8720–34. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i39.8720>
 19. Shchemelev A.N., Ostankova Yu.V., Zueva E.B., Boumbaly S., Balde T.A.L., Semenov A.V. Characterization of hepatitis B virus and human immunodeficiency virus among HIV/HBV co-infected patients from the Republic of Guinea [Kharakteristika virusa gepatita B i virusa immunodefitsita cheloveka sredi patsientov s koinfektsiyey VCh/VGV iz Gvineyskoy Respubliki]. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2019; (3): 118–24. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2019-3-118-124> (in Russian)
 20. Balde T.A.L., Boumbaly S., Serikova E.N., Valutite D.E., Shchemelev A.N., Ostankova Yu.V., et al. Comparative analysis of the vertical risk of transmission of some blood-borne infections in the Republic of Guinea [Srvnietel'nyy analiz vertikal'nogo riska peredachi nekotorykh gemokontaknykh infektsiy v Gvineyskoy Respublike]. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2021; (1): 87–94. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-1-87-94> (in Russian)
 21. Diarra B., Yonli A.T., Sorgho P.A., Compaore T.R., Ouattara A.K., Zongo W.A., et al. Occult hepatitis B virus infection and associated genotypes among HBsAg-negative subjects in Burkina Faso. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 2018; 10(1): e2018007. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2018.007>
 22. Allain J.P., Candotti D. Diagnostic algorithm for HBV safe transfusion. *Blood Transfus.* 2009; 7(3): 174–82. <https://doi.org/10.2450/2008.0062-08>
 23. Garmiri P., Loua A., Haba N., Candotti D., Allain J.P. Deletions and recombinations in the core region of hepatitis B virus genotype E strains from asymptomatic blood donors in Guinea, west Africa. *J. Gen. Virol.* 2009; 90(Pt. 10): 2442–51. <https://doi.org/10.1099/vir.0.012013-0>
 24. Ostankova Yu.V., Semenov A.V., Zueva E.B., Totolian Areg A. The first cases of Hepatitis B virus subgenotype D4 detection in patients with chronic, acute, and occult hepatitis B in the Russian Federation. *Mol. Gen. Microbiol. Virol.* 2020; 35: 221–8. <https://doi.org/10.3103/S0891416820040072>

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-95>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Выявление SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) у детей с острой кишечной инфекцией в Нижнем Новгороде за период 2020–2021 гг.

Морозова О.В., Новикова Н.А., Епифанова Н.В., Новиков Д.В., **Мохонов В.В.**, Сашина Т.А., Зайцева Н.Н.

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

Введение. Новая коронавирусная инфекция COVID-19 является серьезной проблемой общественного здравоохранения во всем мире. В ряде публикаций показано наличие при этом заболевании помимо респираторных нарушений симптомов со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) (тошноты, рвоты, диареи). **Цель** настоящей работы – мониторинг РНК возбудителя COVID-19 – коронавируса SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) у детей, госпитализированных с острой кишечной инфекцией (ОКИ), с последующей молекулярно-генетической характеристикой обнаруженных штаммов.

Материал и методы. Материалом для исследования служили образцы фекалий детей с ОКИ, находившихся на госпитализации в инфекционном стационаре Нижнего Новгорода в период с 01.07.2020 по 31.10.2021 гг. Обнаружение вирусной РНК проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ). Определение нуклеотидной последовательности фрагмента гена S-белка осуществляли методом секвенирования по Сэнгеру.

Результаты и обсуждение. При исследовании 2476 образцов фекалий детей с ОКИ, генетический материал SARS-CoV-2 выявлен в 45 образцах. Максимальное количество проб, содержащих РНК вируса SARS-CoV-2, приходилось на ноябрь 2020 г. (частота обнаружения 12,2%). В 20,0% случаев вирусная РНК детектирована в сочетании с рота-, норо- и аденовирусами. Установлены 28 нуклеотидных последовательностей комплементарной ДНК (кДНК) фрагмента гена S-белка. Филогенетический анализ показал принадлежность изучаемых штаммов SARS-CoV-2 к 2 вариантам. При анализе аминокислотной последовательности S-белка у исследованных штаммов показано отсутствие в выборке 2020 г. мутации N501Y, являющейся маркером вариантов с высоким эпидемиологическим потенциалом (ВЭП) – вызывающих озабоченность (*англ.* variants of concern, VOC) согласно определению Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) (линии Alpha B.1.1.7, Beta B.1.351, Gamma P.1). В 2 образцах, изолированных в сентябре 2021 г., идентифицирован вариант линии B.1.617.2 Delta.

Заключение. Обнаружение РНК SARS-CoV-2 в копроматериале детей с ОКИ, свидетельствующее о возможности реализации фекально-орального механизма передачи возбудителя, определяет необходимость оптимизации его мониторинга и разработки алгоритма работы с пациентами, имеющими признаки ОКИ, в условиях пандемии новой коронавирусной инфекции.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, острая кишечная инфекция (ОКИ), дети до 14 лет

Для цитирования: Морозова О.В., Новикова Н.А., Епифанова Н.В., Новиков Д.В., **Мохонов В.В.**, Сашина Т.А., Зайцева Н.Н. Выявление SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) у детей с острой кишечной инфекцией в Нижнем Новгороде за период 2020–2021 гг. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(1): 69-76. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-95>

Для корреспонденции: Морозова Ольга Владимировна, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций, ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (ННИИЭМ Роспотребнадзора), 603950, Нижний Новгород, Россия. E-mail: olga.morozova.bsc@gmail.com

Участие авторов: Морозова О.В. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментальных исследований, анализ литературных данных, оформление результатов, написание текста статьи; Новикова Н.А. – организация и руководство исследованием, написание текста статьи; Епифанова Н.В. – написание текста статьи, статистическая обработка результатов; Новиков Д.В. – проведение экспериментальных исследований; **Мохонов В.В.** – проведение экспериментальных исследований; Сашина Т.А. – проведение экспериментальных исследований; Зайцева Н.Н. – общее руководство, одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

Финансирование. Исследование проведено в рамках выполнения Государственного задания Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) № 141-00105-21-00 от 14.01.2021.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен локальным Этическим комитетом ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (ННИИЭМ Роспотребнадзора) (Протокол № 12 от 10.12.2021).

Поступила 30.11.2021

Принята в печать 14.01.2022

Опубликована 28.02.2022

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-95>

Detection SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) in children with acute intestinal infection in Nizhny Novgorod during 2020–2021

Olga V. Morozova, Nadezhda A. Novikova, Natalia V. Epifanova, Dmitry V. Novikov, Vladislav V. Mokhonov, Tatiana A. Sashina, Natalia N. Zaytseva

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

Introduction. The novel coronavirus infection COVID-19 is a major public health problem worldwide. Several publications show the presence of gastrointestinal (GI) symptoms (nausea, vomiting, and diarrhea) in addition to respiratory disorders.

The **aim** of this study was the monitoring of RNA of COVID-19 pathogen, coronavirus SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) in children hospitalized with acute intestinal infection (All), with following molecular-genetic characterization of detected strains.

Material and methods. Fecal samples of children with All hospitalized in infectious hospital of Nizhny Novgorod (Russia) in the period from 01.07.2020 to 31.10.2021 were used as material for the study. Viral RNA detection was performed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). The nucleotide sequence of S-protein gene fragment was determined by Sanger sequencing.

Results and discussion. SARS-CoV-2 genetic material was detected in 45 out of 2476 fecal samples. The maximum number of samples containing RNA of the virus occurred in November 2020 (detection rate of 12.2%). In 20.0% of cases, SARS-CoV-2 RNA was detected in combination with rota-, noro-, and adenoviruses. 28 nucleotide sequences of S-protein gene fragment complementary DNA (cDNA) were determined. Phylogenetic analysis showed that the studied SARS-CoV-2 strains belonged to two variants. Analysis of the S-protein amino acid sequence of the strains studied showed the absence of the N501Y mutation in the 2020 samples, which is a marker for variants with a high epidemic potential, called variants of concern (VOC) according to the World Health Organization (WHO) definition (lines Alpha B.1.1.7, Beta B.1.351, Gamma P.1). Delta line variant B.1.617.2 was identified in two samples isolated in September 2021.

Conclusion. The detection of SARS-CoV-2 RNA in the fecal samples of children with All, suggesting that the fecal-oral mechanism of pathogen transmission may exist, determines the necessity to optimize its monitoring and to develop an algorithm of actions with patients with signs of All under the conditions of a novel coronavirus infection pandemic.

Keywords: SARS-CoV-2, acute intestinal infection (All), children under the age of 14

For citation: Morozova O.V., Novikova N.A., Epifanova N.V., Novikov D.V., Mokhonov V.V., Sashina T.A., Zaytseva N.N. Detection SARS-COV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) in children with acute intestinal infection (Nizhny Novgorod region, 2020-2021). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(1): 69-76 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-95>

For correspondence: Olga V. Morozova, Ph.D., Researcher of the Molecular Epidemiology of Viral Infections Laboratory, FSBI «Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Right Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 603950, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: olga.morozova.bsc@gmail.com

Information about the authors:

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

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

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

Novikov D.V., <https://orcid.org/0000-0001-7049-6935>

Mokhonov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-8542-5723>

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

Zaytseva N.N., <https://orcid.org/0000-0001-5370-4026>

Contribution: Morozova O.V. – concept and design of the study, research conducting, analysis of literature data, presentation of results, writing the text of the article; Novikova N.A. – organization and management of research, writing the text of the article; Epifanova N.V. – writing the text of the article, statistical processing of the results; Novikov D.V. – research conducting; Mokhonov V.V. – research conducting; Sashina T.A. – research conducting; Zaitseva N.N. – general guidance, final approval of the final version of the article for publication.

Funding. The study was funded by the Federal Service for Supervision of Consumer Right Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor) as a part of the federal program No 141-00105-21-00 dated January 14, 2021.

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

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Local Ethics Committee of the «Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology» (Protocol No. 12 dated December 21, 2021).

Received 30 November 2021

Accepted 14 January 2022

Published 28 February 2022

Введение

Вирус SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) является возбудителем новой коронавирусной инфекции (COVID-19), впервые зарегистрированной в г. Ухань (Китайская Народная Республика (КНР) в декабре 2019 г. [1, 2]. Коронавирусы являются причиной респираторных и кишечных инфекционных заболеваний как у людей, так и у животных [3]. COVID-19 чаще всего проявляется респираторными нарушениями [4]; в то же время в ряде случаев могут присутствовать симптомы со стороны желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), признаки поражения нервной, сердечно-сосудистой систем и другие осложнения. Помимо лёгочной ткани генетический материал SARS-CoV-2 обнаружен в почках, сердце, печени, мозге инфицированных пациентов [5].

Геном возбудителя представлен однонитевой РНК положительной полярности. Вирус проникает в клетки через рецептор – ангиотензинпревращающий фермент 2 (АПФ2) (angiotensin converting enzyme 2, ACE2) [6]. Продемонстрирована его экспрессия в эпителиоцитах пищевода, энтероцитах подвздошной и толстой кишки, что позволяет предположить возможность репродукции патогена в этих клетках [7–10]. Показано, что до 79% больных с COVID-19 в Ухане имели такие симптомы поражения ЖКТ, как диарея, снижение аппетита, тошнота, рвота, боли в животе и желудочно-кишечное кровотечение [11]. У ряда пациентов (взрослых и детей) с последующим лабораторным подтверждением инфицирования SARS-CoV-2 наблюдали только диарею и рвоту при отсутствии катаральных явлений и гипертермии [12–14]. Ряд исследований продемонстрировал присутствие вируса в образцах стула, перенесших новую коронавирусную инфекцию как с диареей, так и без неё [9, 15].

Обнаружение SARS-CoV-2 в образцах кала служит доказательством его тропизма к эпителию ЖКТ [2, 16]. Сравнение результатов анализа копрома- териала пациентов с клиническими проявлениями COVID-19 разной степени выраженности позволило предположить, что наличие РНК возбудителя в фекалиях не связано с тяжестью заболевания и/или проявлением гастроинтестинальных симптомов. Возраст выделявших вирус с фекалиями варьировал от 10 мес. до 78 лет, а результаты сохранялись позитивными на

протяжении до 16 сут [17, 18]. РНК нового коронавируса выявляли в образцах кала спустя 2–5 сут после верификации положительных результатов исследования респираторных мазков и в ряде случаев – после получения отрицательного результата [15–17]. По мнению F. Xiao и соавт., наличие вирионов SARS-CoV-2 в копрома- териале пациентов с COVID-19 доказывает существование алиментарного пути передачи этого вируса [19].

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) совместно с партнёрами, экспертными сетями, национальными органами и исследовательским сообществом осуществляет мониторинг возникающих вариантов SARS-CoV-2. На территории Российской Федерации по состоянию на сентябрь 2021 г. высоким эпидемическим потенциалом (ВЭП) обладают вызывающие озабоченность (*англ.* variants of concern, VOC) согласно определению ВОЗ варианты вируса линий Alpha (Британский, B.1.1.7+Q.), Beta (ЮАР, B.1.351), Gamma (Бразильский, P.1) и Delta (Индийский-2, B.1.617.2 + AY.). В ноябре 2021 г. в Южной Африке впервые идентифицирован вариант SARS-CoV-2 линии B.1.1.529 Omicron. В декабре 2021 г. штамм Omicron выявлен на территории РФ, в т.ч. в Нижнем Новгороде. Кроме этого, ряд вариантов относится к требующим дополнительных исследований (ТДИ) [20].

В настоящее время в научной литературе отсутствуют данные о выявлении SARS-CoV-2 в копрома- териале детей с острой кишечной инфекцией (ОКИ) без диагноза COVID-19. В нашей работе проведено исследование по определению генетического материала этого вируса в образцах стула пациентов детского возраста, госпитализированных с ОКИ в инфекционный стационар Нижнего Новгорода в 2020–2021 гг., а также дана молекулярно-биологическая характеристика обнаруженных штаммов.

Материал и методы

Нативные образцы. Выполнено продольное эпидемиологическое исследование по определению РНК SARS-CoV-2 в 2476 образцах копрома- териала детей в возрасте от 1 мес. до 17 лет, госпитализированных в инфекционный стационар Нижнего Новгорода с картиной ОКИ без респираторных симптомов в период с 01.07.2020 по 31.10.2021 г. На момент поступления обследование на присутствие SARS-CoV-2 не проводили. В работе

использовали остаточное количество образцов фекалий, взятых во время стандартной клинической практики, связанной с проведением диагностики на наличие вирусов кишечной группы: ротавирусов (*Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus A*); норовирусов (*Caliciviridae: Norovirus*); аденовирусов (*Adenoviridae: Mastadenoviridae: Human adenovirus*); астровирусов (*Astroviridae: Mastastrovirus*), а также энтеровирусов (*Picornaviridae: Enterovirus*). Исследование проводили в формате случайной выборки и анонимного тестирования.

У всех участников или лиц, представляющих несовершеннолетних пациентов, получено добровольное информированное согласие. Протокол исследования одобрен локальным Этическим комитетом ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (ННИИЭМ Роспотребнадзора).

Выделение тотальной РНК из клинического материала проводили с использованием комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК «РИБО-преп» (ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора)) согласно инструкции по применению. Детекцию вирусов кишечной группы выполняли при помощи тест-систем: «АмплиСенс Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL», «АмплиСенс ОКИ скрин-FL», «АмплиСенс Enterovirus-FL» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора).

Выявление РНК SARS-CoV-2 осуществляли посредством полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с помощью набора реагентов «Вектор-ПЦР-2019-nCoV-RG» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), на приборе CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, Inc., США) также в соответствии с инструкцией производителя.

Секвенирование по Сэнгеру. На основе сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей генома SARS-CoV-2, представленных в GenBank, были подобраны праймеры для амплификации фрагмента комплементарной ДНК (кДНК) размером 789 п.н., кодирующего домен связывания белка S вируса с рецептором АПФ2:

– праймер SF: 5'-TGT GCA CTT GAC CCT CTC TCA GAA ACA AAG TGT AC-3';

– праймер SR: 5'-AGT AAG AAC ACC TGT GCC TGT TAA ACC ATT GAA G-3'.

Последовательности полученных фрагментов кДНК устанавливали с использованием генетического анализатора Beckman Coulter GenomeLab GeXP и набора реагентов DTCS Quick Start Kit (Beckman Coulter, США) согласно рекомендациям производителя.

Филогенетический анализ. Для филогенетического анализа была сформирована выборка нуклеотидных последовательностей, включающая:

– полученные в данном исследовании и депонированные в GenBank (№№ OL444789–OL444815 ($n = 28$);

– близкородственные геномные последовательности изолированных на территориях других стран вариантов SARS-CoV-2, зарегистрированные в базах данных GenBank и GISAID ($n = 50$);

– полногеномные последовательности принадлежащих к разным линиям штаммов, изолированных на территории Нижнего Новгорода из респираторных мазков, доступные в базе данных GISAID ($n = 25$);

последовательности вариантов с ВЭП (VOC) линий В.1.1.7, В.1.135, Р.1 ($n = 13$);

последовательность референсного генома коронавируса, идентифицированного в Ухане ($n = 1$).

Подбор модели эволюции и филогенетический анализ осуществляли в программе MEGA X [21]. Филогенетическое дерево конструировали методом максимального правдоподобия (maximum likelihood) с использованием трёхпараметрической модели эволюции Тамуры T92 (Tamura 3-parameter).

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием критерия χ^2 . Различия определяли как достоверные при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

При ретроспективном анализе 2476 образцов фекалий детей, госпитализированных в инфекционный стационар с ОКИ, генетический материал SARS-CoV-2 выявлен в 45 пробах. Частота обнаружения составила за 2020 г. 4,3% (34 пробы из 798), в 2021 г. – 0,7% (11/1678). При постановке ПЦР-РВ с использованием сертифицированной тест-системы во всех случаях детекции РНК вируса значение порогового цикла (cycle threshold, Ct) оказалось высоким – от 24,95 до 39,19. В 12 образцах величина Ct превышала значение диагностического порогового цикла, указанное в инструкции к набору (>35). Однако присутствие РНК SARS-CoV-2 в пробах, которые при скрининге формально имели статус отрицательных, подтверждено при амплификации и секвенировании фрагмента вирусного генома с использованием праймеров, подобранных в ходе данной работы.

Все исследованные образцы предварительно были тестированы на вирусы кишечной группы (рота-, норо-, адено-, астровирусы) и энтеровирусы, что позволило проанализировать наличие микст-инфекций. В 5 образцах РНК SARS-CoV-2 обнаружена в сочетании с РНК норовируса, в 1 пробе с РНК ротавируса и в ещё 1 случае – с ДНК аденовируса. В 2 образцах коронавирусы идентифицированы в комбинации с рота-/норо- и норо-/аденовирусами. Энтеровирусы в SARS-CoV-2-содержащих образцах не обнаружены. Таким образом, в 80% случаев SARS-CoV-2 в образцах стула детей с диареей выявлен в виде возбудителя моновирусной инфекции.

Относительно возрастных групп вирусная РНК идентифицирована в следующих соотношениях: от 0 до 12 мес. – 27,3% \pm 1,2; от 1 до 2 лет – 24,2% \pm 1,1; от 3 до 7 лет – 39,4% \pm 1,3; старше 7 лет – 9,1% \pm 0,7.

Кроме того, проведён анализ помесечного распределения положительных образцов (рис. 1). Число проб,

содержащих РНК SARS-CoV-2, увеличивалось с июля по декабрь 2020 года. Пик обнаружения пришёлся на ноябрь 2020 г. – 12,2 % (19/156). В период с января по июль 2021 г. вирусный генетический материал в фекалиях госпитализированных с ОКИ детей не выявлен. В то же время с июля по октябрь 2021 г. РНК коронавируса детектирована в 11 пробах из 1678 исследованных (0,7%), что статистически значимо ниже ($\chi^2 = 39,39; p < 0,001$), чем в 2020 г. Таким образом, РНК SARS-CoV-2 обнаруживали в период начала сезонного подъёма заболеваемости ОКИ вирусной этиологии, в частности рота- и норовирусной инфекций (рис. 1).

В 31 случае установлена нуклеотидная последовательность фрагмента генома SARS-CoV-2, что подтвердило наличие его РНК в образцах; из них 28 последовательностей использованы для филогенетического анализа. Ввиду ненадлежащего качества 3 последовательности были исключены из дальнейшей работы. Филогенетический анализ показал, что штаммы SARS-CoV-2, обнаруженные у детей с ОКИ в Нижнем Новгороде в 2020 г., ведут своё происхождение от референсного штамма, изолированного на территории г. Ухань в 2019 г., – hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 (EPI_ISL_402124). Гомология нуклеотидных последовательностей составила 99,3–100,0%. Как видно на рисунке 2, а, выявленные штаммы кластеризуются отдельно от представителей линий Alpha, Beta и Gamma. Из выборки 2021 г. для филогенетического анализа использованы 3 нуклеотидные последовательности. При этом 1 штамм SARS-CoV-2, изолированный в августе 2021 г., кластеризовался с большинством нижегородских штаммов, детектированных в 2020 г.; 2 других, выделенные в сентябре того же года, принадлежали линии Delta.

Уровень различий нуклеотидных последовательностей вирусных штаммов, изолированных в Нижнем Новгороде, и вариантов с ВЭП варьировал от 0,4 до 0,8%. Близкородственные выявленным штаммам

SARS-CoV-2 вирусы идентифицированы на территории Соединённых Штатов Америки (США), Италии, Японии, Великобритании и других стран, в т.ч. у домашних животных (кошек (*Felis catus*) и собак (*Canis familiaris*)), живущих с инфицированными новым коронавирусом людьми. В базе данных GISAID представлено 25 полных последовательностей генома SARS-CoV-2, изолированного из назофарингеальных мазков от больных COVID-19 в Нижнем Новгороде за период с июня 2020 по сентябрь 2021 г. Часть этих последовательностей кластеризовалась вместе с полученными в данном исследовании штаммами.

При анализе аминокислотных последовательностей домена связывания S-белка коронавируса с рецептором установлено, что в позиции 501 у всех секвенированных штаммов находится аспарагин (Asn, N) и отсутствует замена N501Y, характерная для генотипов с ВЭП Alpha, Beta и Gamma. Нуклеотидные последовательности 2 штаммов, выявленных в сентябре 2021 года, несли мутации L452R и T478K, что позволяет отнести их к линии B.1.617.2. В исследованной выборке установлено присутствие единичных мутаций в позициях N437S, Q474R и S477T. Последовательность геномного фрагмента штамма SARS-CoV-2, изолированного в августе 2021 г. (период абсолютного превалирования Delta-варианта), не содержала мутаций L452R и T478K, являющихся маркерными для линии Delta (рис. 2, б).

Обсуждение

В настоящее время известно 7 видов коронавирусов, поражающих человека. Из них 4 вызывают лёгкие респираторные симптомы: 229E, NL63 (род *Alphacoronavirus*), OC43, HKU1 (род *Betacoronavirus*). Эти инфекционные агенты выделены как из назофарингеальных мазков, так и из образцов стула детей с ОКИ [22, 23]. При этом частота выявления каждого серотипа коронавируса и выраженность проявления

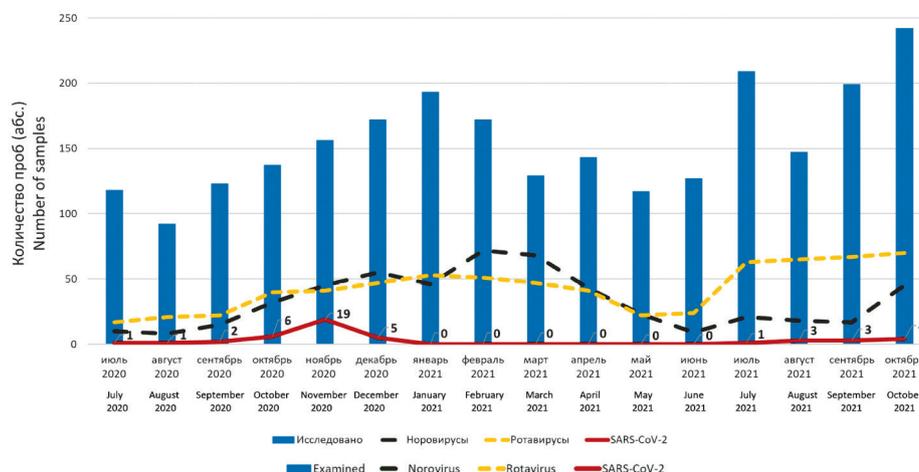


Рис. 1. Помесячное обнаружение РНК SARS-CoV-2 в образцах копроматериала детей с острой кишечной инфекцией.
Fig. 1. Monthly detection of SARS-CoV-2 RNA in fecal samples from children with an acute intestinal infection.

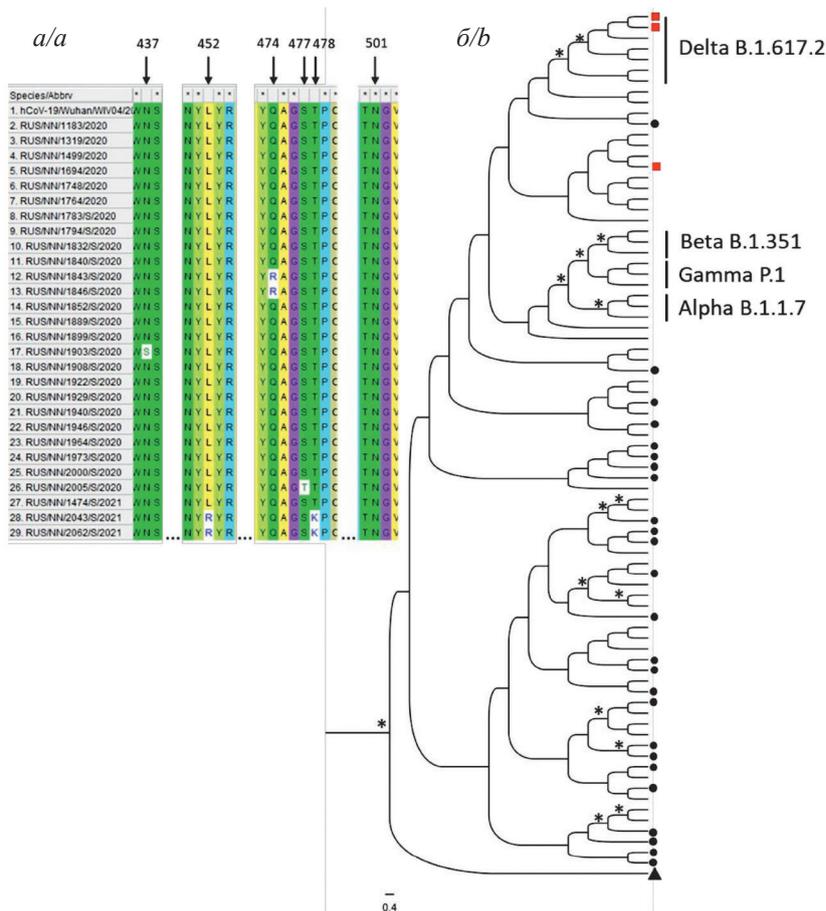


Рис. 2. Молекулярно-генетическая характеристика SARS-CoV-2 изолированного у детей с ОКИ.

a) – аминокислотные последовательности фрагмента S-белка SARS-CoV-2, обнаруженного у детей с острой кишечной инфекцией; замены выделены белым цветом; б) – филогенетическое дерево, сконструированное на основе частичных нуклеотидных последовательностей гена S-белка штаммов SARS-CoV-2, обнаруженных у детей с острой кишечной инфекцией в Нижнем Новгороде, и близкородственных последовательностей, доступных в базах данных GISAID и GenBank;

Примечание. ● – штаммы, изолированные в 2020 г., ■ – штаммы, изолированные в 2021 г., ▲ – референсный штамм, изолированный в г. Ухань в 2019 г.

Fig. 2. Molecular and genetic characteristics of SARS-CoV-2 isolated from children with acute intestinal infections.

a), amino acid sequences of the SARS-CoV-2 S-protein fragment found in children with an acute intestinal infection, amino acid substitutions are highlighted in white; b), phylogenetic tree constructed on the basis of partial nucleotide sequences of the S-protein gene of SARS-CoV-2 strains found in children with acute intestinal infection in Nizhny Novgorod, and closely related sequences available in the GISAID and GenBank databases.

Note. ●, strains isolated in 2020; ■, strains isolated in 2021; ▲, reference strain isolated in Wuhan in 2019.

симптомов поражения ЖКТ варьировала в зависимости от возраста заболевших и региона их проживания [24]. Другие 3 вида – MERS-CoV (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Merbecovirus*), SARS-CoV и SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) – могут вызывать тяжёлую симптоматическую инфекцию с коэффициентом летальности 15,0, 37,0 и 0,4–2,3% (до 15,4% в некоторых странах) соответственно [25, 26].

Ранее исследователями из разных стран установлено, что MERS-CoV, способный вызывать у человека заболевание с тяжёлым респираторным синдромом, мог устойчиво поддерживать собственную репликацию в клетках тонкой кишки [27]. При инфицировании SARS-CoV помимо респираторных расстройств и гипертермии распространённым клиническим проявлением заболевания является диарея. По данным

ряда авторов, от 20,3 до 73,0% пациентов при заражении имели кишечные симптомы [28–31]. Более того, в некоторых случаях вирус обнаруживали в фекалиях спустя 10 нед после начала инфекции [3]. Показано, что ЖКТ может быть мишенью для SARS-CoV, а выделяемый с калом вирус способен распространяться, инфицируя других лиц [32].

В нашей работе РНК SARS-CoV-2 обнаружена в копроматериале детей, госпитализированных с картиной ОКИ без симптомов острой респираторной вирусной инфекции (ОРВИ) и диагноза COVID-19. Генетический материал вируса выявлен у детей дошкольного возраста во всех возрастных группах с одинаковой частотой. ПЦР-тестирование характеризовалось высокими значениями Ct, однако наличие РНК в пробах подтверждалось амплификацией фрагментов и их секвенированием с использованием ори-

гинальных праймеров. Высокий показатель S_t мог свидетельствовать о низкой концентрации вирусных частиц в субстрате, что, вероятно, связано со слабой репликативной активностью SARS-CoV-2 в клетках слизистой оболочки ЖКТ. В пользу этого говорит отсутствие у госпитализированных с ОКИ детей, выделявших патоген с фекалиями, респираторных симптомов, при наличии которых возбудитель мог бы попасть в ЖКТ с секретами дыхательных путей.

В ходе исследования установлено статистически достоверное различие частоты выявления РНК нового коронавируса в копро материале детей в 2020 г. – 4,3% и в 2021 г. – 0,7% ($p < 0,001$). Наибольшее количество позитивных проб пришлось на ноябрь 2020 г., когда частота обнаружения составила 12,2%, снизившись в декабре до 2,9%. В последующие месяцы (с января по июнь 2021 г.) образцов, содержащих РНК SARS-CoV-2, не выявлено. Следует отметить, что согласно данным официальной статистики в указанный период времени в Нижнем Новгороде наблюдался рост заболеваемости COVID-19: регистрировалось 394–458 случаев заражения вариантом Wuhan в сутки, в основном взрослого населения. В июле–октябре 2021 г. в образцах фекалий госпитализированных с ОКИ детей отмечено 11 положительных находок РНК SARS-CoV-2. В это время с конца июня 2021 г. отмечен рост заболеваемости COVID-19 (473–503 заражения за сутки), вызванной индийским (Delta) вариантом. Снижение частоты обнаружения SARS-CoV у детей, госпитализированных с явлениями ОКИ в сезон 2021 г., может быть связано с распространением в популяции нового варианта вируса Delta.

В 80,0% случаев SARS-CoV-2 обнаружен в виде патологического агента моновирусной инфекции при отсутствии рота-, норо-, адено-, астровирусов, которые являются ведущими возбудителями ОКИ, а также энтеровирусов, способных бессимптомно инфицировать детей или вызывать симптоматическую ОКИ. К настоящему времени накоплено достаточно свидетельств того, что в ряде случаев при COVID-19 возникают различные гастроинтестинальные симптомы (тошнота, рвота, диарея и др.) [33]. Клинические исследования, проведенные F. D'Amico и соавт. показывают, что частота возникновения диареи у инфицированных SARS-CoV-2, колеблется от 2,0 до 50,0% [34]. Она может предшествовать появлению респираторных проявлений либо сопровождать их. Объединенный анализ показал, что общая частота возникновения диареи составляет 10,4%. Кроме того, по некоторым данным, вирусная РНК в фекалиях обнаруживается на протяжении более длительного периода времени, чем в мазках из носоглотки [34].

Способность SARS-CoV-2 инфицировать эпителиоциты ЖКТ показана с использованием иммунофлуоресцентных методов. Получены данные, свидетельствующие, что белок ACE2, который, как доказано ранее, является клеточным рецептором для SARS-CoV-2, экспрессируется в железистых клетках эпителия желудка, двенадцатиперстной, тонкой киш-

ки и прямой кишки [7-10, 34]. В связи с этим можно предположить, что в настоящем исследовании при моноинфекции SARS-CoV-2 последний явился причиной симптомов поражения ЖКТ.

Обнаружение SARS-CoV-2 у госпитализированных с картиной ОКИ детей без респираторных симптомов и установленной COVID-19 ставит вопрос о необходимости тестирования на РНК нового коронавируса пациентов детского возраста, поступающих на стационарное лечение с этим диагнозом.

Выявленные штаммы SARS-CoV-2 были использованы для изучения их молекулярно-генетических особенностей. Все идентифицированные нами в 2020 и 2021 гг. штаммы проявили филогенетическое родство с референсным «уханьским» вариантом линии B, в частности Delta-вариантом (B.1.617.2).

К настоящему времени в результате анализа аминокислотной последовательности S-протеина SARS-CoV-2, выполняющего роль прикрепительного белка, обнаружены мутационные изменения, способные привести к изменению трансмиссивных свойств и тяжести течения заболевания [35]. Такой анализ показал особенности появившихся после «уханьского» варианта штаммов, имеющих мутации N501Y (линии Alpha, Beta, Gamma) и L452R, T478K (линия Delta) в S-белке, относительно референс-штамма. Выявленные нами в сентябре 2021 г. 2 образца несли мутации L452R и T478K, позволяющие отнести их к линии B.1.617.2 (Delta). Примечательно, что эти мутации отсутствовали в штамме коронавируса, который был изолирован в августе 2021 г. на фоне доминирования Delta-варианта на территории Нижнего Новгорода.

Появление в нижегородской популяции SARS-CoV-2 нового штамма линии B.1.1.529 Omicron требует проведения дальнейших исследований по выявлению данного штамма у детей, госпитализированных с картиной ОКИ.

Заключение

В образцах стула детей, госпитализированных с ОКИ без диагноза COVID-19, в 45 случаях ($n = 2476$) обнаружена РНК SARS-CoV-2, при этом последний выступил в качестве этиологического агента моновирусной инфекции в 80,0% случаев. Частота обнаружения вируса на протяжении 2020 г. составила 4,3% ($n = 798$), в 2021 г. – 0,7% ($n = 1678$) ($p < 0,001$). Штаммы, изолированные в 2020 г., не несли маркерных мутаций для вариантов Alpha, Beta, Gamma и Delta, в то время как 2 из 3 секвенированных штаммов, выделенных в 2021 г., несли мутации L452R и T478K, характерные для варианта Delta B.1.617.2. Обнаружение РНК SARS-CoV-2 в копро материале детей с ОКИ, свидетельствующее о возможности реализации фекально-орального механизма передачи вируса, определяет необходимость оптимизации его мониторинга и разработки алгоритма работы с пациентами с данной нозологической формой в условиях пандемии новой коронавирусной инфекции.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Xiang Y.T., Yang Y., Li W., Zhang L., Zhang Q., Cheung T., et al. Timely mental health care for the 2019 novel coronavirus outbreak is urgently needed. *Lancet Psychiatry*. 2020; 7(3): 228–9. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(20\)30046-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(20)30046-8)
2. Holshue M.L., DeBolt C., Lindquist S., Lofy K.H., Wiesman J., Bruce H., et al. First case of 2019 novel coronavirus in the United States. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(10): 929–36. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001191>
3. Leung W.K., To K.F., Chan P.K., Chan H.L.Y., Wu A.K.L., Lee N., et al. Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. *Gastroenterology*. 2003; 125(4): 1011–7. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(03\)01215-0](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(03)01215-0)
4. Wang X.W., Li J.S., Guo T.K., Zhen B., Kong Q.X., Yi B., et al. Concentration and detection of SARS coronavirus in sewage from Xiao Tang Shan Hospital and the 309th Hospital. *J. Virol. Methods*. 2005; 128(1-2): 156–61. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.03.022>
5. Puelles V.G., Lütgehetmann M., Lindenmeyer M.T., Spherhake J.P., Wong M.N., Allweiss L., et al. Multiorgan and renal tropism of SARS-CoV-2. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(6): 590–2. <https://doi.org/10.1056/NEJMc2011400>
6. Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.M., Wang W., Song Z.G., et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*. 2020; 579(7798): 265–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
7. Burgueño J.F., Reich A., Hazime H., Quintero M.A., Fernandez I., Fritsch J., et al. Expression of SARS-CoV-2 entry molecules ACE2 and TMPRSS2 in the gut of patients with IBD. *Inflamm. Bowel. Dis.* 2020; 26(6): 797e808. <https://doi.org/10.1093/ibd/izaa085>
8. Harmer D., Gilbert M., Borman R., Clark K.L. Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Lett.* 2002; 532(1-2): 107–10. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03640-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03640-2)
9. Xiao F., Tang M., Zheng X., Liu Y., Li X., Shan H. Evidence for gastrointestinal infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology*. 2020; 158(6): 1831–3.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.055>
10. Du M., Cai G., Chen F., Christiani D.C., Zhang Z., Wang M. Multi-omics evaluation of gastrointestinal and other clinical characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Gastroenterology*. 2020; 158(8): 2298–301. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.03.045>
11. Tian Y., Rong L., Nian W., He Y. Review article: gastrointestinal features in COVID-19 and the possibility of faecal transmission. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2020; 51(9): 843–51. <https://doi.org/10.1111/apt.15731>
12. Wang D., Hu B., Hu C., Zhu F., Liu X., Zhang J., et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*. 2020; 323(11): 1061–9. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
13. Vespa E., Pugliese N., Colapietro F., Aghemo A. Stay (GI) Healthy: COVID-19 and gastrointestinal manifestations. *Tech. Innov. Gastrointest. Endosc.* 2021; 23(2): 179–89. <https://doi.org/10.1016/j.tige.2021.01.006>
14. An P., Chen H., Ren H., Su L., Ji M., Kang J., et al. Gastrointestinal symptoms onset in COVID-19 patients in Wuhan, China. *Dig. Dis. Sci.* 2020; 66(10): 3578–87. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06693-6>
15. Xu Y., Li X., Zhu B., Liang H., Fang C., Gong Y., et al. Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding. *Nat. Med.* 2020; 26(4): 502–5. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0817-4>
16. Yang Z., Li G., Dai X., Liu G., Li G., Jie Y. Three cases of novel coronavirus pneumonia with viral nucleic acids still positive in stool after throat swab detection turned negative. *Chin. J. Dig.* 2020; 40: E002–E002. [https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2020.0002 \(in Chinese\)](https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2020.0002 (in Chinese))
17. Ling Y., Xu S.B., Lin Y.X., Tian D., Zhu Z.Q., Dai F.H., et al. Persistence and clearance of viral RNA in 2019 novel coronavirus disease rehabilitation patients. *Chin. Med. J. (Engl.)*. 2020; 133(9): 1039–43. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000000774>
18. Zhang J.J., Dong X., Cao Y.Y., Yuan Y.D., Yang Y.B., Yan Y.Q., et al. Clinical characteristics of 140 patients infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy*. 2020; 75(7): 1730–41. <https://doi.org/10.1111/all.14238>
19. Xiao F., Sun J., Xu Y., Li F., Huang X., Li H., et al. Infectious SARS-CoV-2 in feces of patient with severe COVID-19. *Emerg. Infect. Dis.* 2020; 26(8): 1920–2. <https://doi.org/10.3201/eid2608.200681>
20. VGARus. Russian platform for aggregating information about virus genomes. Available at: <https://genome.crie.ru/app/index> (accessed December 29, 2021).
21. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
22. Jevšnik M., Steyer A., Zrim T., Pokorn M., Mrvič T., Grosek Š., et al. Detection of human coronaviruses in simultaneously collected stool samples and nasopharyngeal swabs from hospitalized children with acute gastroenteritis. *Virol. J.* 2013; 10: 46. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-46>
23. Paloniemi M., Lappalainen S., Vesikari T. Commonly circulating human coronaviruses do not have a significant role in the etiology of gastrointestinal infections in hospitalized children. *J. Clin. Virol.* 2015; 62: 114–7. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.10.017>
24. Leung T.F., Chan P.K., Wong W.K., Ip M., Cheng W.T., Ng P.C. Human coronavirus NL63 in children: epidemiology, disease spectrum, and genetic diversity. *Hong Kong Med. J.* 2012; 18(Suppl. 2): 27–30.
25. Abdelghany T.M., Ganash M., Bakri M.M., Qanash H., Al-Rajhi A.M.H., Elhussieny N.I. SARS-CoV-2, the other face to SARS-CoV and MERS-CoV: Future predictions. *Biomed. J.* 2021; 44(1): 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.10.008>
26. Laxminarayan R., Mohan C.B., Vinay T.G., Arjun Kumar K.V., Wahl B., Lewnard J.A. SARS-CoV-2 infection and mortality during the first epidemic wave in Madurai, south India: a prospective, active surveillance study. *Lancet Infect. Dis.* 2021; 21(12): 1665–76. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00393-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00393-5)
27. Zhou J., Li C., Zhao G., Chu H., Wang D., Yan H.H., et al. Human intestinal tract serves as an alternative infection route for Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Sci. Adv.* 2017; 3(11): ea04966. <https://doi.org/10.1126/sciadv.a04966>
28. Donnelly C.A., Ghani A.C., Leung G.M., Hedley A.J., Fraser C., Riley S., et al. Epidemiological determinants of spread of causal agent of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *Lancet*. 2003; 361(9371): 1761–6. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13410-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13410-1)
29. Booth C.M., Matukas L.M., Tomlinson G.A., Rachlis A.R., Rose D.B., Dwosh H.A., et al. Clinical features and short-term outcomes of 144 patients with SARS in the greater Toronto area. *JAMA*. 2003; 289(21): 2801–9. <https://doi.org/10.1001/jama.289.21.JOC30885>
30. Lee N., Hui D., Wu A., Chan P., Cameron P., Joynt G.M., et al. A major outbreak of severe acute respiratory syndrome in Hong Kong. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348(20): 1986–94. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030685>
31. Stockman L.J., Massoudi M.S., Helfand R., Erdman D., Siwek A.M., Anderson L.J., et al. Severe acute respiratory syndrome in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2007; 26(1): 68–74. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000247136.28950.41>
32. Ding Y., He L., Zhang Q., Huang Z., Che X., Hou J., et al. Organ distribution of severe acute respiratory syndrome (SARS) associated coronavirus (SARS-CoV) in SARS patients: implications for pathogenesis and virus transmission pathways. *J. Pathol.* 2004; 203(2): 622–30. <https://doi.org/10.1002/path.1560>
33. Moura I.B., Buckley A.M., Wilcox M.H. Can SARS-CoV-2 be transmitted via faeces? *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2022; 38(1): 26–9. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000794>
34. D'Amico F., Baumgart D.C., Danese S., Peyrin-Biroulet L. Diarrhea during COVID-19 infection: Pathogenesis, epidemiology, prevention, and management. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2020; 18(8): 1663–72. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2020.04.001>
35. Fratev F. N501Y and K417N mutations in the spike protein of SARS-CoV-2 alter the interactions with both hACE2 and human-derived antibody: a free energy of perturbation retrospective study. *J. Chem. Inf. Model.* 2021; 61(12): 6079–84. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c01242>

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-100>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Выделение нового штамма М-2020 вируса оспы верблюдов (*Poxviridae: Orthopoxvirus: Camelopox virus*) в Республике Казахстан и изучение его репродукции на различных биологических системах

Жугунисов К.Д.¹, Мамбеталиев М.А.¹, Азанбекова М.А.¹, Кенжебаева М.К.¹, Килибаев С.С.¹, Туысканова М.С.^{1,2}, Джапашева А.С.¹, Омуртай А.Д.¹, Табыс Ш.Т.¹

¹ДГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (НИИПББ КН МОН РК), 080409, Жамбылская область, Кордайский р-н, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан;

²НАО «Казахский национальный университет имени Аль-Фараби», 050040, Алматы, Республика Казахстан

Введение. В данной работе представлены результаты выделения вируса оспы верблюдов (ОВ) (*Poxviridae: Orthopoxvirus: Camelopox virus*, CMLPV) и изучения его репродуктивных свойств на чувствительных биологических системах.

Материал и методы. В исследовании использован эпизоотический штамм М-96 вируса, а также его аттенуированные варианты КМ-40 и КМ-70, полученные путём последовательного пассирования. Выделение возбудителя из суспензии биопсийных образцов осуществляли на культуре клеток и в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ). Все эксперименты проводили с числом повторности, обеспечивающим получение достоверных результатов.

Результаты. В серии экспериментов выделен вирус ОВ из корочек и соскобов с оспенными папулами кожи, полученных во время вспышки заболевания от больных верблюдов (*Camelus bactrianus*) из различных районов Мангистауской области Республики Казахстан в конце 2019 г. При этом признаки размножения возбудителя на хорион-аллантоиной оболочке (ХАО) отмечались с 3 пассажа. Полученный вирус вызывал формирование на ХАО патологических изменений в виде возвышающихся точечных или сплошных узелков белого цвета, ограниченных от окружающей ткани, с геморрагическими очагами в центре, в размере от 1,0 до 5,0 мм. Определены репродуктивные свойства изолята на чувствительных биологических системах в сравнении с эпизоотическим штаммом М-96 CMLPV, выделенным ранее на территории Казахстана во время вспышки ОВ 1996 г., а также его аттенуированными вариантами. Выделенному вирусу присвоено условное название М-2020.

Обсуждение. При исследовании в обеих чувствительных системах культивирования (клеточной культуре и РКЭ) штаммы М-96 и его аттенуированные варианты КМ-40, КМ-70, использованные в экспериментах в качестве контроля, продемонстрировали высокую инфекционную активность с титром 4,75–6,75 lg ТЦД₅₀/см³, тогда как для исследуемого изолята вируса ОВ М-2020 указанная величина оказалась существенно ниже (3,00–4,75 lg ТЦД₅₀/см³, $p > 0,05$).

Ключевые слова: оспа верблюдов; вирус; выделение; куриные эмбрионы; культура клеток

Для цитирования: Жугунисов К.Д., Мамбеталиев М.А., Азанбекова М.А., Кенжебаева М.К., Килибаев С.С., Туысканова М.С., Джапашева А.С., Омуртай А.Д., Табыс Ш.Т. Выделение нового штамма М-2020 вируса оспы верблюдов (*Poxviridae: Orthopoxvirus: Camelopox virus*) в Республике Казахстан и изучение его репродукции на различных биологических системах. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(1): 77-86.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-100>

Для корреспонденции: Туысканова Молдир Сержанкызы, магистр биологии, младший научный сотрудник лаборатории «Коллекция микроорганизмов» ДГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан, 080409, Жамбылская область, Кордайский р-н, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан. E-mail: monica_94@list.ru

Участие авторов: Жугунисов К.Д. – планирование исследования, статистическая обработка результатов, оформление статьи; Мамбеталиев М.А. – проведение мониторинговых исследований, отбор биопроб; Азанбекова М.А. – проведение экспериментов, выделение и изучение репродукции вируса в биологических системах, идентификация и изучение антигенного родства полученного изолята; Кенжебаева М.К. – проведение экспериментов, выделение и изучение репродукции вируса в биологических системах, идентификация и изучение антигенного родства полученного изолята; Килибаев С.С. – проведение экспериментов, выделение и изучение репродукции вируса в биологических системах, идентификация и изучение антигенного родства полученного изолята; Омуртай А.А. – проведение экспериментов, выделение и изучение репродукции вируса в биологических системах, идентификация и изучение антигенного родства полученного изолята; Табыс Ш.Т. – проведение экспериментов, выделение и изучение репродукции вируса в биологических системах, идентификация и изучение антигенного родства полученного изолята; Туысканова М.С. – оформление статьи, связь с редакцией.

Финансирование. Работа выполнена в рамках научного проекта на тему «Разработка технологии изготовления инактивированной вакцины против оспы верблюдов» (AP09258770) по грантовому финансированию на 2021–2023 гг. при поддержке Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 12.01.2022
Принята в печать 02.02.2022
Опубликована 28.02.2022

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-100>

Isolation of a new strain M-2020 of the camelpox virus (*Poxviridae: Orthopoxvirus: Camelpox virus*) in Republic of Kazakhstan and study of its reproduction in various biological systems

Kuandyk D. Zhugunissov¹, Muratbay A. Mambetaliyev¹, Moldyr A. Azanbekova¹, Marzhan K. Kenzhebaeva¹, Sanat S. Kilibayev¹, Moldir S. Tuyskanova^{1,2}, Arailym S. Dzhaspasheva¹, Alisher D. Omurtay¹, Shalkar T. Tabys¹

¹DGE «Research Institute for Biological Safety Problems», Committee of Science of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, 080409, Gvardeyskiy vill., Zhambyl region, Korday district, Republic of Kazakhstan;

²NJSC «Al-Farabi Kazakh National University», 050040, Almaty, Republic of Kazakhstan

Introduction. This article presents the results of isolation of camel smallpox virus (*Poxviridae: Orthopoxvirus: Camelpox virus*, CMLPV) and study of its reproductive properties on sensitive biological systems.

Material and methods. The epizootic strain M-96 of the virus as well as its attenuated variants KM-40 and KM-70 obtained by sequential passivation were used in the study. Isolation of the pathogen from suspension of biopsy specimens was performed on cell culture and in embryonated chicken eggs (ECEs). All experiments were performed with the number of replications ensuring obtaining reliable results.

Results. The CMLPV was isolated from the crusts and pox papules of the skin taken from sick camels (*Camelus bactrianus*) during an outbreak in various districts of the Mangistau region at the end of 2019. The signs of pathogen reproduction on chorio-allantoic membrane (CAM) were observed from 3 passages. The obtained virus caused formation of pathological changes on the CAM in the form of elevated dot or solid white formations separated from the surrounding tissue, with hemorrhagic foci in the center. The reproductive properties of the isolate on sensitive biological systems were determined in comparison with the epizootic CMLPV strain M-96, isolated earlier in the territory of Kazakhstan during the outbreak 23–24 years ago, as well as its attenuated variants. The isolated virus was given the conventional name M-2020.

Discussion. When studied in two sensitive cultivation systems (cell culture and ECEs), strain M-96 and its attenuated variants KM-40, KM-70, which were used in the experiments as a control, demonstrated high infectious activity with titer 4.75–6.75 lg TCID₅₀/cm³, while for the examined isolate M-2020 of CMLPV had the significantly lower values (3.00–4.75 lg TCID₅₀/cm³, $p > 0,05$).

Key words: camelpox; virus; isolation; embryonated chicken eggs; cell culture

For citation: Zhugunissov K.D., Mambetaliyev M.A., Azanbekova M.A., Kenzhebaeva M.K., Kilibayev S.S., Tuyskanova M.S., Dzhaspasheva A.S., Omurtay A.D., Tabys Sh.T. Isolation of a new strain M-2020 of the camelpox virus (*Poxviridae: Orthopoxvirus: Camelpox virus*) in Republic of Kazakhstan and study of its reproduction in various biological systems. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(1): 77–86. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-100>

For correspondence: Moldir S. Tuyskanova, M.Biol., Junior Researcher, Laboratory «Collection of Microorganisms», DGE «Research Institute for Biological Safety Problems», Committee of Science of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan, (RIBSP), 080409, Gvardeyskiy vill., Zhambyl region, Korday district, Republic of Kazakhstan. E-mail: monica_94@list.ru

Information about the authors:

Zhugunissov K.D., <https://orcid.org/0000-0003-4238-5116>

Mambetaliyev M.A., <https://orcid.org/0000-0001-6034-6642>

Azanbekova M.A., <https://orcid.org/0000-0002-5807-7604>

Kenzhebaeva M.K., <https://orcid.org/0000-0001-6666-6532>

Kilibayev S.S., <https://orcid.org/0000-0001-9203-2189>

Tuyskanova M.S., <https://orcid.org/0000-0001-6565-082X>

Dzhapasheva A.S., <https://orcid.org/0000-0002-7414-4635>

Omurtay A.D., <https://orcid.org/0000-0002-9331-5161>

Tabys Sh.T., <https://orcid.org/0000-0002-4909-6598>

Contribution: Zhugunissov K.D. – research planning, statistical processing of results, registration of articles; Mambetaliev M.A. – monitoring studies, selection of biological samples; Azanbekova A.A. – conducting experiments, isolation and study of virus reproduction in biological systems, identification and study of antigenic affinity of the isolate; Kenzhebaeva M.K. – conducting experiments, isolation and study of virus reproduction in biological systems, identification and study of antigenic affinity of obtained isolate; Kilibayev S.S. – conducting experiments, isolation and study of virus reproduction in biological systems, identification and study of antigenic affinity of obtained isolate; Dzhapasheva A.S. – conducting experiments, isolation and study of virus reproduction in biological systems, identification and study of antigenic affinity of obtained isolate; Omurtay A.A. – conducting experiments, isolation and study of virus reproduction in biological systems, identification and study of antigenic affinity of obtained isolate; Tabys Sh.T. – conducting experiments, isolation and study of virus reproduction in biological systems, identification and study of antigenic affinity of obtained isolate; Tuyskanova M.S. – preparation of the article, communication with the editors.

Funding. The work was carried out within the scientific project on «Development of technology for manufacturing inactivated vaccine against camel smallpox» (AP09258770) under grant funding for 2021–2023 supported by the Committee of Science of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Received 12 January 2022

Accepted 02 February 2022

Published 28 February 2022

Введение

Одной из отраслей животноводства пустынных и полупустынных зон Республики Казахстан является верблюдоводство, занимающее определённое место в сельскохозяйственном производстве с обеспечением потребностей населения в мясе, молоке и шерсти. Во многом благодаря этому становится возможным освоение таких природных зон [1]. В настоящее время ставится задача превратить верблюдоводство в высокодоходную отрасль продуктивного животноводства. Для этого необходимо увеличить и сохранить поголовье верблюдов (*Camelus bactrianus*), принять возможные меры по защите его от инфекционных болезней, в т.ч. оспы верблюдов (ОВ), периодически наносящей значительный экономический ущерб [2]. На территории Казахстана ОВ периодически наблюдалась в Мангистауской и Атырауской (Гурьевской) областях на протяжении 1930 г., 1942–1943, 1965–1967, 1968–1969 гг. [3] и 1996 г. Во время вспышки в 1996 г. в Мангистауской области из 8 тыс. особей заболели 830, из них 43 пали [4]. В этот период сотрудниками ДГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Комитета науки Министерства образования и науки Республики Казахстан (НИИПББ КН МОН РК) на территории региона выделен эпизоотический штамм М-96 вируса ОВ (*Poxviridae: Orthopoxvirus: Camel痘 virus, CMLPV*), изучены его биологические, морфологические, физико-химические и генетические свойства [5–9]. Позже полный геном штамма был секвенирован и депонирован в базе GenBank (№ AF438165.1) [10]. После указанной вспышки ОВ вновь регистрировалась в Мангистауской области летом 2019 г.; диагноз подтверждён лабораторно сотрудниками НИИПББ в декабре того же года (неопубликованные данные). В конце 2019 г. в это учреждение доставлен патологический биоматериал от заболевших особей из различных районов Мангистауской области с целью выделения вируса и последующего изучения его репродуктивных свойств на различных биологи-

ческих системах в сравнении с другими штаммами, имеющимися в коллекции микроорганизмов НИИПББ. Важно отметить, что проведение такого рода исследований позволяет правильно организовать профилактические мероприятия, а также наладить производство диагностических и вакцинных препаратов против особо опасных инфекций животных.

С учётом изложенного целью данной работы стало выделение и изучение репродуктивных свойств изолята вируса ОВ, полученного при вспышках болезни на территории Мангистауской области в 2019 г.

Материал и методы

Вирус и патологический материал. В работе использован эпизоотический штамм М-96 вируса ОВ, который выделен от верблюда, заболевшего в период вспышки в Мангистауской области в 1996 г., а также его аттенуированные варианты КМ-40 и КМ-70, полученные путём последовательного пассирования на чувствительных биологических системах. Объектом исследования был патологический биологический материал (корочки и соскобы с оспенными папулами кожи), отобранный от больных животных во время вспышки ОВ из различных районов Мангистауской области в конце 2019 г. Расположение региона и места отбора биопроб представлены на **рис. 1**.

Биологические системы культивирования. При проведении экспериментов использовали первично-трипсинизированную культуру клеток почки ягнёнка (ПЯ), выращенной в питательной среде с 10% содержанием фетальной сыворотки крови крупного рогатого скота (КРС) (fetal bovine serum, FBS), а также развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ) в возрасте 11–12 сут. Последние получены с птицефабрик с благополучной ситуацией по эпидемиологическому статусу и показателям биологической безопасности.

Выделение и культивирование вируса на чувствительных биологических системах. Выделение возбудителя из суспензии биопсийных образцов проводили на клеточной культуре и в РКЭ, как описано

в протоколах Всемирной организации здравоохранения животных (Office International des Epizooties (OIE), 2019) [11]. Перед инфицированием эмбрионы подвергали органолептическому контролю посредством овоскопирования. После соответствующей обработки скорлупы эмбриона над областью воздушной камеры (пуги) тонко отточенным металлическим копьём осуществляли прокол и с помощью пинцета формировали отверстие размером 4–5 мм в диаметре. Затем на подскорлуповой оболочке стерильными иглами в 2–3 местах делали насечки и наносили в них вирусный материал в объёме 0,2 см³. Отверстие в скорлупе заклеивали лейкопластырем, после чего РКЭ инкубировали в вертикальном положении при температуре (37 ± 0,5) °С и относительной влажности воздуха (55 ± 5) % в течение 120 ч.

С целью контроля оставляли незаражёнными 2–3 эмбриона, которым на хорион-аллантаисную оболочку (ХАО) наносили физиологический (0,9%) раствор хлорида натрия в том же объёме. Овоскопический контроль осуществляли ежедневно. Гибель эмбрионов в течение первых 48 ч расценивали как неспецифичную. Начиная с 3-суточного срока инкубирования погибшие РКЭ помещали в бытовой холодильник при (4 ± 2) °С и сохраняли до окончания опыта. Эмбрионы, оставшиеся живыми на протяжении 120 ч, после инкубирования также охлаждали в бытовом холодильнике при аналогичном температурном режиме не менее 18 ч.

Титр вируса ВО в полученных образцах определяли титрованием в первичной культуре клеток ПЯ или РКЭ согласно описанной ранее методике [9].

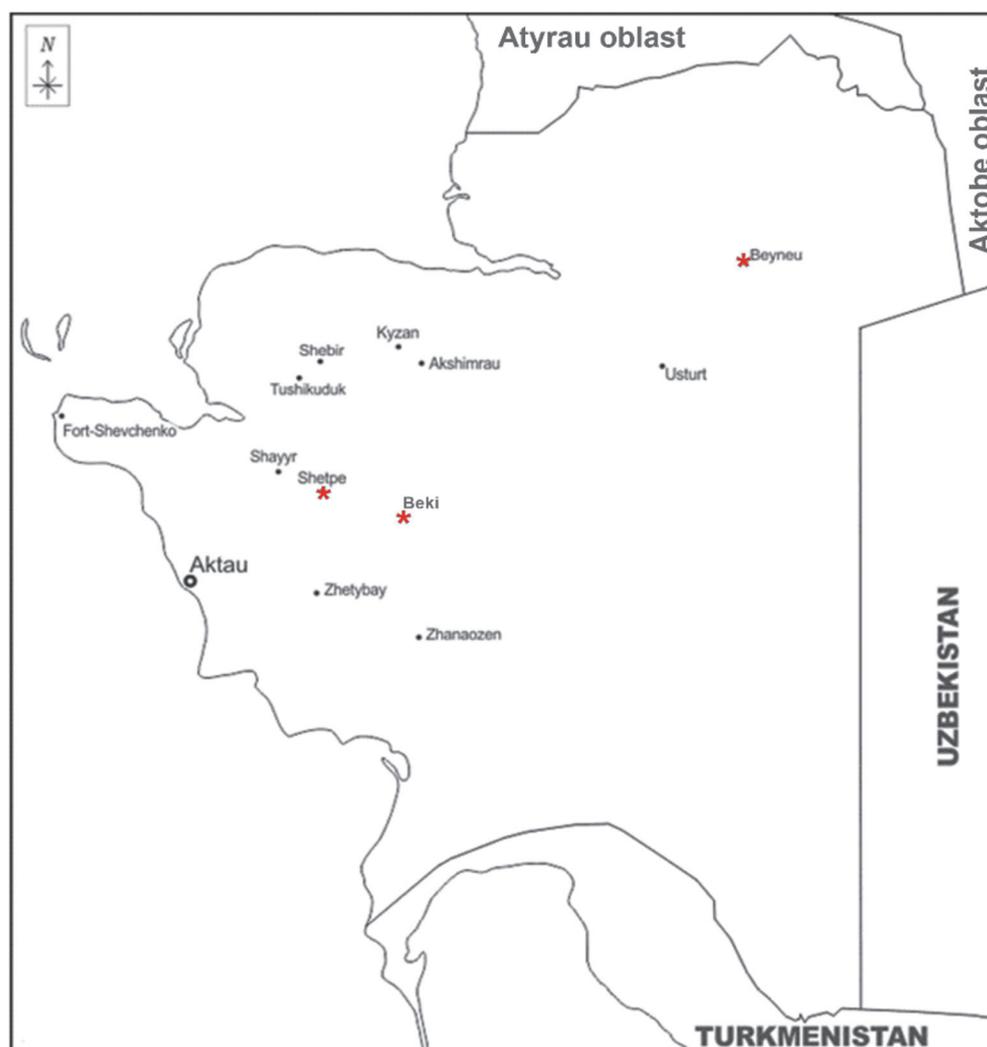


Рис. 1. Карта Мангистауской области и места отбора патологического биоматериала на территории.

Место отбора проб обозначены красными звездочками.

Fig. 1. Map and locations for sampling of the pathological material in Mangistau region.

Sampling location is indicated with red asterisks.

Показателем титра считали наибольшее его разведение, вызывающее цитопатическое действие (ЦПД) в 50% заражённых проб с клеточной культурой или образованием оспенных бляшек на ХАО РКЭ. Непосредственное значение вычисляли по методу Рида и Менча [12] с выражением в $\lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (ТЦД – тканевая цитопатическая доза) для культуры клеток ПЯ или в $\lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ (ЭИД – эмбриональная инфицирующая доза) в случае РКЭ.

Электронно-микроскопические исследования. Пробы готовили методом негативного контрастирования с использованием 2 % водного раствора фосфорновольфрамовой кислоты (ФВК). Каплю материала, содержащего вирус, помещали в лунку тefлоновой пластины. На каплю наносили опорную сетку с пленкой-подложкой, напыленной углем. Через 5–10 мин адсорбции сетку удаляли, а избыток жидкости отбирали фильтровальной бумагой. Сетку с образцом переносили на 1–2 мин на 1 каплю раствора ФВК pH 6,8, а затем на 5 мин – на 1 раствора ФВК pH 7,0. После контрастирования и удаления избытка контрастера препарат подсушивали на воздухе. Препараты исследовали на электронном микроскопе «JEM-100 CX JEOL» (Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и увеличении $\times 20\,000$ – $150\,000$.

Определение антигенного родства вируса. Антигенное родство между новым изолятом и ранее выделенным штаммом устанавливали в процессе реакции нейтрализации с использованием специфической

сыворотки, полученной от верблюдов, иммунизированных аттенуированным штаммом KM-40 CMLPV. Учёт результатов нейтрализации проводили на протяжении 7 сут по наличию или отсутствию ЦПД вируса в культуре клеток ПЯ.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты выполняли с числом повторностей, обеспечивающим получение достоверных результатов. Статистическую обработку проводили с вычислением среднего арифметического значения (X) и средней квадратической ошибки (m) при помощи программы GraphPad Prism v.9. Различия считали статистически значимыми при уровне достоверности 95% ($p \leq 0,05$).

Результаты

Выделение вируса оспы верблюдов в развивающихся куриных эмбрионах. Результаты экспериментов, проведённых *in vitro* с использованием чувствительных биологических систем, приведены в **табл. 1**.

Как видно из данных **табл. 1**, после вскрытия РКЭ при исследовании ХАО оспенные узелки в 1 и 2 пассажах не обнаружены. В образце № 5 признаки размножения вируса отмечались с 3 пассажа. До этого момента поражения были слабо выражены и характеризовались наличием в месте инокуляции единичных ограниченных узелков, возвышающихся над окружающей поверхностью. Видимые патологические изменения на ХАО наблюдались с 6 пассажа; при этом в указанной области регистрировались обширные

Таблица 1. Результаты биопроб по выделению вируса оспы верблюдов на развивающихся куриных эмбрионах методом последовательного пассажа

Table 1. Results of bioassays for the isolation of camelpox virus on the embryonated chicken eggs by the method of serial passages

Номер биопробы Bioassay number	Наименование изолята и дата получения образца Name of the isolate and sampling date of the pathological material	Количество пассажей и результаты пассирования Number of passages and passing results					
		I	II	III	IV	V	VI
1	№ 1 от 12.12.2019 г., из корочки, район Шетпе No. 1 dated December 12, 2019, from the crust, Shetpe district	–	–	–	–	–	–
2	№ 2 от 12.12.2019 г., из корочки, район Шетпе No. 2 dated December 12, 2019, from the crust, Shetpe district	–	–	–	–	–	–
3	№ 3, 1272 от 12.12.2019 г., из корочки, район Шетпе No. 3 dated December 12, 2019, from the crust, Shetpe district	–	–	–	–	–	–
4	№ 4, 303405 от 12.12.2019 г., из корочки, район Шетпе No. 4 dated December 12, 2019, from the crust, Shetpe district	–	–	–	–	–	–
5	№ KZR506384619, от 12.12.2019 г., из корочки, район Бейнеу No. KZR506384619, dated December 12, 2019, from the crust, Beyneu district	–	–	+	+	+	+
6	№ KZR506384620, от 12.12.2019 г., из корочки, район Бейнеу No. KZR506384620, dated December 12, 2019, from the crust, Beyneu district	–	–	–	–	–	–
7	№ KZR506375943, от 12.12.2019 г., из корочки, район Бейнеу No. KZR506375943, dated December 12, 2019, from the crust, Beyneu district	–	–	–	–	–	–
8	№ 06290618, от 12.12.2019 г., из корочки, район Беки No. 06290618, dated December 12, 2019, from the crust, Beki district	–	–	–	–	–	–
9	№ 06302984 от 12.12.2019 г., из корочки, район Беки No. 06302984, dated December 12, 2019, from the crust, Beki district	–	–	–	–	–	–
10	№ 06302710 от 12.12.2019 г., из корочки, район Беки No. 06302710, dated December 12, 2019, from the crust, Beki district	–	–	–	–	–	–

Примечание. «–» – отсутствие оспенных бляшек на хорион-аллантаической оболочке; «+» – наличие оспенных бляшек на хорион-аллантаической оболочке.

Note. «–», no camelpox plaques on the chorio-allantoic membrane; «+», presence of camelpox plaques on the chorio-allantoic membrane.

участки поражения, представляющие собой выступающие над поверхностью оболочки сплошные белые образования с очагами кровоизлияния. Следует отметить, что из других образцов вирус не выделен, так как оспенные узелки отсутствовали даже при последовательном пассировании до уровня 6 пассажа.

Таким образом, в результате проведённых исследований из доставленного биоматериала изолирован вариант вируса ОВ, который получил предварительное название М-2020. После тщательного изучения биологических и генетических свойств изолята предполагаются его паспортизация и депонирование в соответствующие базы данных для пополнения ряда коллекционных штаммов в качестве вирулентного образца, предназначенного для контроля иммуногенности вакцин, а также выполнения научно-исследовательских работ.

Изучение репродуктивных свойств изолята М-2020 на биологических системах. Для сравнительного изучения репродуктивных свойств изолята М-2020 с другими штаммами СМЛРВ использованы эпизоотический штамм М-96 и его аттенуированные варианты КМ-40 и КМ-70. Эксперименты выполнены на РКЭ.

Специфичность вирусосодержащих материалов оценивали по наличию характерного ЦПД в монослое культуры клеток (рис. 2) или по выявлению бляшек на ХАО куриных эмбрионов (рис. 3), а также в соответствии с результатами электронно-микроскопических исследований (рис. 4).

Из рис. 1 видно, что ЦПД вируса в культуре клеток ПЯ характеризовалось очаговым поражением монослоя в виде наличия имеющих светопреломляющую цитоплазму клеточных элементов различной формы (округлые, веретенообразные, овальные) с чёткими очертаниями ядерной и цитоплазматической оболочки. При этом отмечалась отёчность этих клеток с увеличением их в размерах в несколько раз по сравнению с нормальными. На местах отмерших клеток

образовывались пустые участки. При заражении куриных эмбрионов появление оспенных бляшек на ХАО регистрировалось спустя 48–72 ч с максимальным развитием изменений на 72–96 ч. Через 96–120 ч помимо бляшек имели место вторичные поражения в виде ограниченных беловатых узелков размерами от 1,0 до 2,0–3,0 мм, рассеянных по всей поверхности оболочки по ходу кровеносных сосудов (рис. 3 а, б).

Результаты экспериментов по изучению репродуктивных свойств изолята М-2020 в сравнении с другими штаммами вируса ОВ на чувствительных биологических системах представлены в табл. 2.

Приведённые данные свидетельствуют о стабильной высокой биологической активности всех штаммов ВОВ в культуре клеток ПЯ и РКЭ с показателями титра от $3,00 \pm 0,08$ до $6,75 \pm 0,25 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ на 4–5 сут культивирования. Эти результаты позволяют заключить, что все испытываемые штаммы хорошо культивируются в чувствительных системах (независимо от адаптации к той или иной из них) с высокой инфекционной активностью.

Изучение антигенного родства изолята М-2020 вируса оспы верблюдов. Установление антигенной идентичности нового изолята вируса ОВ проведено в реакции нейтрализации с использованием специфической и нормальной сывороток животных. Результаты исследования представлены в табл. 3.

При изучении антигенной взаимосвязи между изолятом и аттенуированным штаммом вируса ОВ установлено, что в реакции нейтрализации, протекавшей в клеточной культуре, полученная от вакцинированных животных специфическая сыворотка в разведении 1 : 32 полностью нейтрализовала полевой изолят вирулентного возбудителя в дозе $200 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Обсуждение

Выделение возбудителя как основной исследовательский метод классической вирусологии имеет осо-

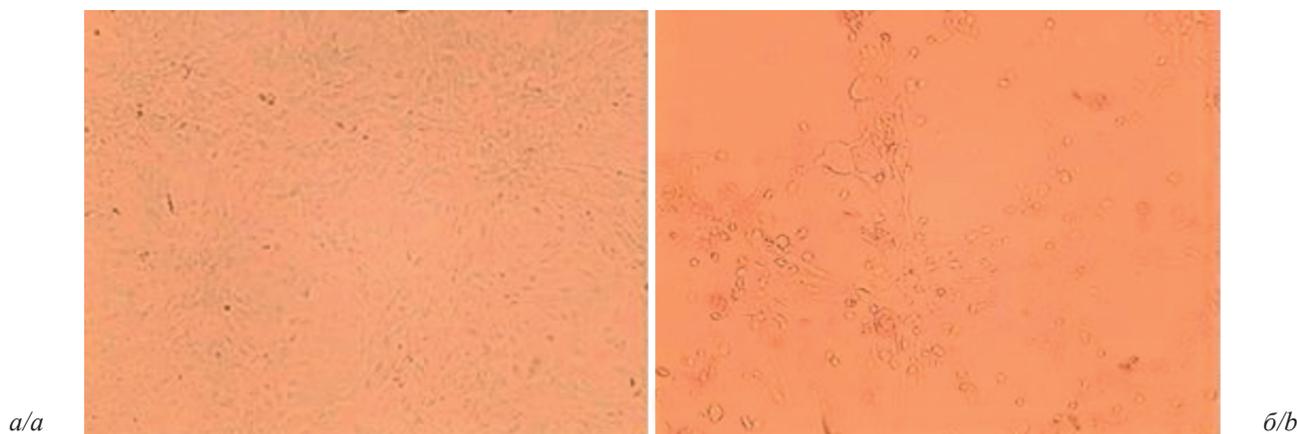


Рис. 2. Световая микроскопия культуры клеток почки ягнёнка до и после заражения вирусом оспы верблюдов: а) – неинфицированная клеточная культура (контроль на 3 сут); б) – цитопатическое действие вируса в культуре (на 3 сут после инфицирования). Микрофотография (увеличение $\times 20$).

Fig.2. Light microscopy of the lamb kidney cells before and after infection with CMLPV: а) , non-infected lamb kidney cells (control on the 3rd day); б) , cytopathic effect of the virus in the cell culture (on the 3rd day after infection). Microphotograph (magnification $\times 20$).

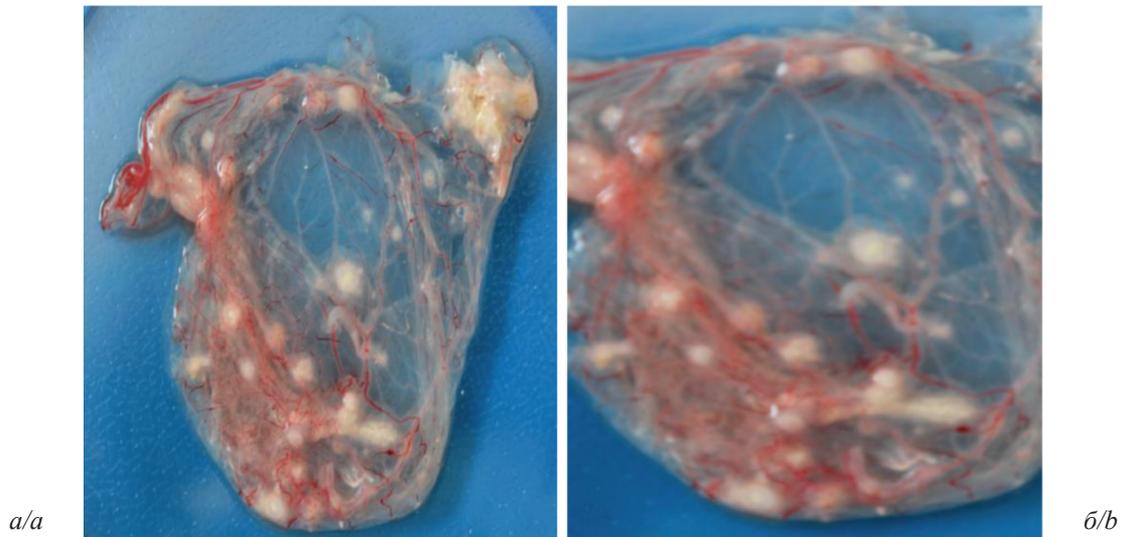


Рис. 3. Характерные бляшки на хорион-аллантаической оболочке куриных эмбрионов при инфицировании штаммами вируса оспы верблюдов; *a)* – при заражении штаммом KM-40; *б)* – при заражении изолятом M-2020. Нативный макропрепарат.

Fig. 3. Characteristic plaques on the chorioallantoic membrane of chicken embryos when infected with strains of the CMLPV: *a)*, after infection with strain KM-40; *b)*, after infection with isolate M-2020. Native macropreparation.

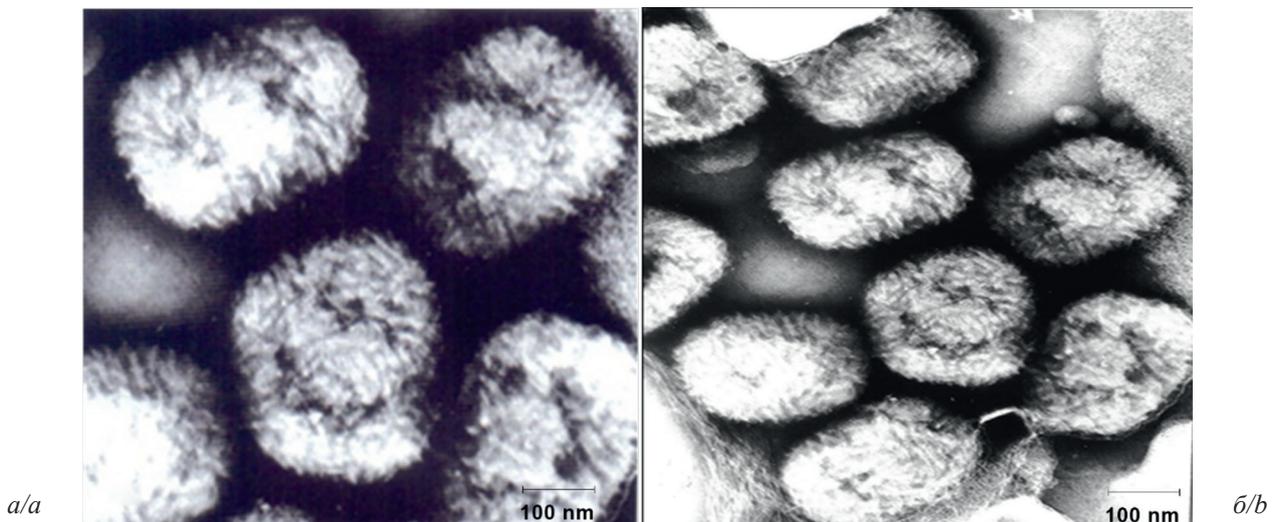


Рис. 4. Электронная микроскопия вирионов оспы верблюдов: *a)* – штамм M-96, *б)* – изолят M-2020. Микрофотография, негативное контрастирование 2% раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты, увеличение $\times 150\ 000$ (по Н.С. Кожаберганову).

Fig. 4. Electron microscopy of the camelpox virions: *a)*, strain M-96; *b)*, isolate M-2020. Microphotograph, negative staining with 2% phosphotungstic acid solution, magnification $\times 150\ 000$ (according to Kozhabergenov N.S.).

бое значение в экспериментальной работе. Так, чистая культура изолированного вируса представляет научный интерес при исследовании его филогенеза и эволюции путём изучения биологических, молекулярно-генетических свойств и в перспективе является биологическим резервом, который может быть широко использован при разработке средств диагностики и профилактики заболевания. Для выделения чистой культуры применяются чувствительные биологические системы (лабораторные модели животных, клеточные культуры и куриные эмбрионы) в зависимости от тропизма исследуемого инфекционного агента. По данным ли-

тературных источников, РКЭ возраста 11–12 сут являются одной из оптимальных систем для первичного выделения вируса ОВ из патологических материалов [11–13]. В соответствии с этим первичное выделение инфекционного агента проведено нами на куриных эмбрионах путём заражения через ХАО. Установлено, что признаки размножения вируса на отмечались с 3 пассажа. Изолят M-2020 вызывал формирование на ХАО патологических изменений в виде возвышающихся точечных или сплошных поражений в виде узелков белого цвета, отграниченных от окружающей ткани, с геморрагическими очагами в центре. Анало-

гичная в визуальном отношении картина наблюдалась также в работах других авторов [3, 5, 14].

В литературе имеются данные об успешном культивировании CMLPV в организме естественно восприимчивых животных [3], в первичных и перевиваемых культурах клеток почки ягненка (ПЯ), почки телёнка (ПТ-80), кожи плода верблюда (КПВ), фибробластов куриных эмбрионов (ФЭК), почки африканской зелёной мартышки (Vero), почки новорождённого сирийского хомячка (ВНК-21), клетки опухоли шейки матки

(HeLa) [5, 14–17], а также о невосприимчивости к данному патогену всех видов лабораторных животных моделей, включая птиц (*Aves*) [3, 19]. С учётом этих сведений нами изучены репродуктивные свойства казахстанского изолята М-2020 на культуре ПЯ и РКЭ в сравнении с эпизоотическим штаммом М-96 ВОВ, который ранее выделен на территории Казахстана во время вспышки ОВ 1996 г., а также его аттенуированными вариантами. Следует отметить, что эпизоотический штамм М-96 и его репродуктивные свойства

Таблица 2. Показатели биологической активности культуральных и эмбриональных вирусосодержащих суспензий штаммов вируса оспы верблюдов

Table 2. Indicators of the biological activity of cultured and embryonic virus-containing suspensions of CMLPV strains

Наименование штамма Strain name	Уровень пассажа Passage level	Начало проявления ЦПД на бляшках, сут Onset of the CPE manifestation on plaques, day	Срок культивирования, сут Cultivating period, days	Титр вируса, lg ТЦД ₅₀ /см ³ ($X \pm m$) Virus titer, lg TCID ₅₀ /cm ³ ($X \pm m$)	Титр вируса, lg ЭИД ₅₀ /см ³ ($X \pm m$) Virus titer, lg EID ₅₀ /cm ³ ($X \pm m$)
KM-40	I	3	5	5,75 ± 0,14	5,83 ± 0,08
	II	3	5	5,83 ± 0,08	6,00 ± 0,14
	III	3	5	6,00 ± 0,25	6,75 ± 0,14
	IV	3	5	6,75 ± 0,25	6,50 ± 0,25
	V	3	4	6,50 ± 0,25	6,75 ± 0,08
KM-70	I	3	5	5,75 ± 0,14	н.и. n.i.
	II	3	5	5,83 ± 0,08	н.и. n.i.
	III	3	5	6,00 ± 0,14	н.и. n.i.
	IV	3	5	6,75 ± 0,14	н.и. n.i.
	V	3	5	6,50 ± 0,08	н.и. n.i.
M-96	I	3	7	4,75 ± 0,08	5,00 ± 0,12
	II	3	7	4,81 ± 0,14	5,20 ± 0,17
	III	3	7	5,25 ± 0,13	5,50 ± 0,08
	IV	3	6	5,50 ± 0,08	5,75 ± 0,10
	V	3	5	5,50 ± 0,08	6,00 ± 0,08
M-2020	I	3	7	3,00 ± 0,11	3,50 ± 0,12
	II	3	7	3,00 ± 0,08	3,78 ± 0,11
	III	3	7	3,25 ± 0,12	4,00 ± 0,08
	IV	3	6	4,25 ± 0,08	4,50 ± 0,11
	V	3	6	4,50 ± 0,08	4,75 ± 0,08

Примечание. н.и. – не исследовано; ТЦД – тканевая цитопатическая доза; ЭИД – эмбриональная инфицирующая доза.

Note. n.i, not investigated; TCID, tissue culture infectious dose; EID, embryo infectious dose.

Таблица 3. Результаты определения антигенной идентичности выделенного вируса оспы верблюдов со специфической сывороткой в реакции нейтрализации

Table 3. Results of the assesment of the antigenic identity of isolated CMLPV with specific serum in the neutralization test

Сыворотка Serum	Разведение специфической и нормальной сыворотки Dilution of specific and normal sera						Титр антител в реакции нейтрализации Antibody titer in the neutralization test
	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64	
Специфическая Specific	----	----	----	----	----	++++	1 : 32
Нормальная Normal	++++	++++	++++	++++	++++	++++	0

Примечание. «-» – отсутствие цитопатического действия; «+» – наличие цитопатического действия.

Note. «-», no cytopathic effect; «+», presence of cytopathic effect.

подробно изучены Е.А. Булатовым и соавт. [5]. Ими показано, что из 19 испытанных видов клеточных культур и куриных эмбрионов наиболее чувствительными к этому штамму являются первично-трипсинизированные культуры клеток ПЯ и эмбриональной почки ягненка (ЭПЯ), перевиваемые линии Vero, почка овцы (ПО), а также РКЭ. При этом вирус репродуцировался в культурах ПЯ и ЭПЯ в титрах 4,00–5,75 и 4,75–4,86 соответственно; в перевиваемых линиях культур Vero – 4,00–5,50, ПО – 3,75–5,25 lg ТЦД₅₀/см³ и на КЭ в титрах от 4,70 до 6,00 lg ЭИД₅₀/см³. В то время как в клеточных культурах почки камерунских коз (ПКК), почки собаки (МДСК), свиной почки эмбриональной версензированной (СПЭВ) и поджелудочной железы кролика (ПЖК) ЦПД вируса обнаруживалось только в первом (титры 0,5–3,50 lg ТЦД₅₀/см³) пассаже, в культурах лёгкие эмбриона овцы (ЛЭО), кожи эмбриона овцы (КЭО), тестикул ягненка (ТЯ) аналогичный эффект отмечался в первых 2 пассажах (титры 0,25–5,50 lg ТЦД₅₀/см³), то в экспериментах с использованием ПЖК, ПТ-80, тестикул теленка (ТТ) и почки молодого бычка (МДВК) проявление ЦПД вируса не зарегистрировано. Штаммы (М-96 и его аттенуированные варианты КМ-40, КМ-70), использованные нами в экспериментах в качестве контроля, показали высокую инфекционную активность с титром 4,75–6,75 lg ТЦД₅₀/см³, тогда как на обеих системах культивирования это значение для исследуемого изолята М-2020 оказалось существенно более низким (3,00–4,75 lg ТЦД₅₀/см³, $p > 0,05$) по сравнению с другими штаммами. Низкая биологическая активность выделенного варианта вируса может быть связана с такими факторами культивирования, как величина минимальной инфицирующей дозы (МИД), температура инкубирования, способ культивирования, характер питательной среды и т.д. [20].

Заключение

В результате проведённых исследований выделен возбудитель, который идентифицирован как вирус ОВ методом реакции нейтрализации и посредством электронной микроскопии. Данный изолят будет использован в дальнейших исследованиях при разработке вакцинных препаратов с возможностью определения их протективности при контрольном заражении восприимчивых животных. На первом этапе определены репродуктивные свойства выделенного варианта вируса. В настоящее время продолжается изучение его генетических свойств с последующими вакцинацией и депонированием в репозитории возбудителей особо опасных болезней республиканской коллекции микроорганизмов в качестве штамма М-2020 CMLPV.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сатбеков Е.С. Получение и испытание на специфическую активность гипериммунной сыворотки против оспы верблюдов. *Вестник сельскохозяйственной науки*. 1971; (2): 101–4.
2. Трабаев О. Результаты изучения устойчивости вируса оспы верблюдов в различных условиях внешней среды и при воздействии антибиотиков и дезсредств. В кн.: *Труды Алма-Атинского ЗВИ. Том XX: Инфекционные и паразитарные заболевания сельскохозяйственных животных*. Алма-Ата; 1972: 34–5.

3. Садыков Р.Г. Культивирование вируса оспы верблюдов на куриных эмбрионах. *Вирусные болезни сельскохозяйственных животных*. 1970; (1): 1–25.
4. Булатов Е.А., Мамадалиев С.М., Мамбеталиев М. Изучение основных биофизических характеристик вируса оспы верблюдов из штамма «М-96». *Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С. Сейфулина*. 2009; (4): 225–9.
5. Булатов Е.А., Мамадалиев С.М., Мамбеталиев М., Битов Н.Т. О циркуляции вируса оспы верблюдов в Мангистауской области Республики Казахстан в скрытой форме. *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. 2010; (3): 10–3.
6. Султанкулова К.Т., Зайцев В.Л. *Вирус оспы верблюдов: биологические свойства, структура генома и диагностика. Морфология и структура вируса*. Алматы; 2017: 37–40.
7. Сюрин В.Н. *Руководство по ветеринарной вирусологии*. Москва: Колос; 1966.
8. Сергеев В.А. *Размножение вируса животных в клетках ткани*. Москва: Колос; 1966.
9. Marennikova S.S., Shenkman L.S., Shelukhina E.M., Maltseva N.N. Isolation of camel pox virus and investigation of its properties. *Acta virologica*. 1974; 18(5): 423–8.
10. Afonso C.L., Tulman E.R., Lu Z., Zsak L., Sandybaev N.T., Kerembekova Z.U., et al. The genome of camelpox virus. *Virology*. 2002; 295(1): 1–9. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1343>
11. OIE 2019. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019. Chapter 3.9.2. Camelpox*. Paris: World Organisation for Animal Health; 2019: 1665–8.
12. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 1938; 27(3): 493–7. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
13. Tantawi H.H., Saban M.S., Reda I.M., Dahaby H.E. Camel pox virus in Egypt. Isolation and characterization. *Bull. Epizoot. Dis. Africa*. 1974; 22(4): 315–9.
14. Chauhan R.S., Kaushik R.K. Isolation of camel pox virus in India. *Br. Vet. J.* 1987; 143(6): 581–2. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(87\)90050-9](https://doi.org/10.1016/0007-1935(87)90050-9)
15. Marodam V., Nagendrakumar S.B., Tanwar V.K., Thiagarajan D., Reddy G.S., Tanwar R.K., et al. Isolation and identification of camel pox virus. *Indian J. Anim. Sci.* 2006; 76: 326–7.
16. Ramyar H., Hessami M. Isolation, cultivation and characterization of camel pox virus. *Arch. Inst. Razi*. 1972; 24: 13–21.
17. Davies F., Mungai J., Shaw T. Characteristics of a Kenyan camelpox virus. *J. Hyg. (Lond.)*. 1975; 75(3): 381–5. <https://doi.org/10.1017/s002217240002444x>
18. Gitao C.G., Nyaga P.N. Pathogenicity of Camelpox virus strain from Kenya on Camels (*Camelus dromedarius*). *Bull. Anim. Health Prod. Afr.* 1995; 43: 247–51.
19. Klopries M., Wernery U., Karden O.-R. Characterisation of the camel skin cell line Dubca. *Br. Vet. J.* 1995; 151(5): 555–65. [https://doi.org/10.1016/s0007-1935\(05\)80026-0](https://doi.org/10.1016/s0007-1935(05)80026-0)
20. Tantawi H.H., El-Dahaby H., Fanmy L.S. Comparative studies on poxvirus strains isolated from camels. *Acta Virol.* 1978; 22(6): 451–7.

REFERENCES

1. Satbekov E.S. Obtaining and testing for specific activity of hyperimmune serum against camel pox [*Poluchenie i ispytanie na spetsificheskuyu aktivnost' giperimmunnoy syvorotki protiv ospy verbyudov*]. *Vestnik sel'skokhozyaystvennoy nauki*. 1971; (2): 101–4. (in Russian)
2. Trabaev O. Results of the study of the resistance of the camel pox virus in various environmental conditions and under the influence of antibiotics and disinfectants. In: *Proceedings of the Alma-Ata ZVI. Volume XX: Infectious and Parasitic Diseases of Farm Animals [Rezultaty izucheniya ustoychivosti virusa ospy verbyudov v razlichnykh usloviyakh vneshey sredy i pri vozdeystvii antibiotikov i dezozsredstv. V kn.: Trudy Alma-Atinskogo ZVI. Tom XX: Infektsionnye i parazitarnye zabolovaniya sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh]*. Alma-Ata; 1972: 34–5. (in Russian)
3. Sadykov R.G. Cultivation of camel pox virus on chicken embryos [*Kul'tivirovaniye virusa ospy verbyudov na kurinykh embriionakh*]. *Virussye bolezni sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh*. 1970; (1): 1–25. (in Russian)

4. Bulatov E.A., Mamadaliev S.M., Mambetaliev M. Study of the main biophysical characteristics of the camel pox virus from the strain «M-96» [Izuchenie osnovnykh biofizicheskikh kharakteristik virusa ospy verbyudov iz shtamma «M-96»]. *Vestnik nauki Kazakhskogo agrotekhnicheskogo universiteta im. S. Seyfulina*. 2009; (4): 225–9. (in Russian)
5. Bulatov E.A., Mamadaliev S.M., Mambetaliev M., Bitov N.T. Circulation of the camel pox virus in Manghystaus Region, Republic of Kazakhstan, in the latent form [O tsirkulyatsii virusa ospy verbyudov v Mangistauskoy oblasti Respubliki Kazakhstan v skrytoy forme]. *Aktual'nye voprosy veterinarnoy biologii*. 2010; (3): 10–3. (in Russian)
6. Sultankulova K.T., Zaytsev V.L. *Camel Pox Virus: Biological Properties, Genome Structure and Diagnostics. Morphology and Structure of the Virus [Virus ospy verbyudov: biologicheskie svoystva, struktura genoma i diagnostika. Morfologiya i struktura virusa]*. Almaty; 2017: 37–40. (in Russian)
7. Syurin V.N. *Guide to Veterinary Virology [Rukovodstvo po veterinarnoy virusologii]*. Moscow: Kolos; 1966. (in Russian)
8. Sergeev V.A. *Reproduction of Animal Virus in Tissue Cells [Razmnozhenie virusa zivotnykh v kletkakh tkani]*. Moscow: Kolos; 1966. (in Russian)
9. Marennikova S.S., Shenkman L.S., Shelukhina E.M., Maltseva N.N. Isolation of camel pox virus and investigation of its properties. *Acta virologica*. 1974; 18(5): 423–8.
10. Afonso C.L., Tulman E.R., Lu Z., Zsak L., Sandybaev N.T., Kerembekova Z.U., et al. The genome of camelpox virus. *Virology*. 2002; 295(1): 1–9. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1343>
11. OIE 2019. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019. Chapter 3.9.2. Camelpox*. Paris: World Organisation for Animal Health; 2019: 1665–8.
12. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Epidemiol.* 1938; 27(3): 493–7. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
13. Tantawi H.H., Saban M.S., Reda I.M., Dahaby H.E. Camel pox virus in Egypt. Isolation and characterization. *Bull. Epizoot. Dis. Africa*. 1974; 22(4): 315–9.
14. Chauhan R.S., Kaushik R.K. Isolation of camel pox virus in India. *Br. Vet. J.* 1987; 143(6): 581–2. [https://doi.org/10.1016/0007-1935\(87\)90050-9](https://doi.org/10.1016/0007-1935(87)90050-9)
15. Marodam V., Nagendrakumar S.B., Tanwar V.K., Thiagarajan D., Reddy G.S., Tanwar R.K., et al. Isolation and identification of camel pox virus. *Indian J. Anim. Sci.* 2006; 76: 326–7.
16. Ramyar H., Hessami M. Isolation, cultivation and characterization of camel pox virus. *Arch. Inst. Razi*. 1972; 24: 13–21.
17. Davies F., Mungai J., Shaw T. Characteristics of a Kenyan camelpox virus. *J. Hyg. (Lond.)*. 1975; 75(3): 381–5. <https://doi.org/10.1017/s002217240002444x>
18. Gitao C.G., Nyaga P.N. Pathogenicity of Camelpox virus strain from Kenya on Camels (*Camelus dromedarius*). *Bull. Anim. Health Prod. Afr.* 1995; 43: 247–51.
19. Klopries M., Wernery U., Karden O.-R. Characterization of the camel skin cell line Dubca. *Br. Vet. J.* 1995; 151(5): 555–65. [https://doi.org/10.1016/s0007-1935\(05\)80026-0](https://doi.org/10.1016/s0007-1935(05)80026-0)
20. Tantawi H.H., El-Dahaby H., Fanmy L.S. Comparative studies on poxvirus strains isolated from camels. *Acta Virol.* 1978; 22(6): 451–7.

ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

Профессор Георгий Артемьевич ГАЛЕГОВ (к 90-летию со дня рождения)



29 декабря 2021 года одному из ведущих отечественных специалистов в области химиотерапии вирусных инфекций, доктору биологических наук, заведующему лабораторией химиотерапии вирусных инфекций Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России Георгию Артемьевичу Галегову исполнилось 90 лет.

Уже в студенческие годы Георгий Галегов работал на кафедре биохимии 1 Московского ордена Ленина медицинского института (ныне Первого Московского государственного медицинского университета) имени И.М. Сеченова под руководством известных учёных и педагогов – академиков С.Р. Мардашёва, С.С. Дебова и Т.Т. Берёзова. В 1956 г. Г.А. Галегов окончил лечебный факультет этого вуза. Его первая журнальная статья была опубликована в 1958 г. в соавторстве с выдающимся химиком-органиком академиком М.М. Шемякиным. Немногим позже под руководством С.Р. Мардашёва Георгий Артемьевич Галегов выполнил цикл приоритетных исследований по обмену аминокислот в живых системах. Эти публикации на несколько лет опередили зарубежные разработки, и на молодого учёного обратили внимание.

На протяжении 1956–1959 гг. Г.А. Галегов занимал должность старшего лаборанта, а в 1959–1963 гг. – научного сотрудника Института биологической и медицинской химии АМН СССР. Затем он был приглашён

академиком В.М. Ждановым в Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского АМН СССР, и его дальнейшая научная судьба на протяжении почти 6 десятилетий оказалась связанной с этим учреждением. Начав работу в качестве старшего научного сотрудника, Георгий Артемьевич вскоре возглавил лабораторию химиотерапии вирусных инфекций. Одновременно (с 1990 г.) он – руководитель отдела общей вирусологии, в 1999–2012 гг. профессор кафедры послевузовского профессионального образования Московской медицинской академии (ныне Первого Московского государственного медицинского университета) имени И.М. Сеченова.

Профессор Галегов – создатель отечественной научной школы вирусологов-химиотерапевтов. Обладая способностью предсказания клинической перспективности новых химических соединений, направленных на лечение вирусной инфекционной патологии, он за короткое время стал одним из признанных лидеров в области разработки противовирусных препаратов в нашей стране.

В рамках национальной программы под руководством Георгия Артемьевича Галегова осуществлены исследования по направленному ингибированию репродукции вирусов человека на основе применения химически модифицированных нуклеозидов. На экспериментальной модели гриппа доказана высокая противовирусная активность комбинации химиотерапевтических препаратов с различными механизмами действия: производных адамантана (ремантадин и амантадин), интерферона и модифицированных нуклеозидов. Работа возглавляемого Г.А. Галеговым коллектива была оценена премией Совета Министров СССР (1985 г.).

Аналогичные научные изыскания были проведены совместно с академиком АМН В.И. Вотяковым в отношении заболеваний, вызываемых арбовирусами и респираторно-синцитиальным (РС) вирусом. Одним из результатов деятельности в этом направлении стала разработка противовирусного препарата Рибавирин, нашедшего широкое применение в лечении РС-инфекции, вирусного гепатита С, Крымской–Конго геморрагической лихорадки и других инфекций.

Большой вклад Георгий Артемьевич Галегов внёс в разработку средств медикаментозной терапии ВИЧ-инфекции на основе соединений модифицированных нуклеозидов/нуклеотидов – ингибиторов обратной транскриптазы вируса иммунодефицита человека 1 типа (ВИЧ-1). Этому был посвящён цикл экспериментальных работ в 1986–2000 гг. Профессор Галегов – один из создателей препарата Никавир (фосфазид), используемого для лечения ВИЧ-инфекции до настоящего времени. За разработку стратегии получения ингибиторов ВИЧ и создание нового ле-



карственного препарата, внедрение его в клиническую практику учёный в составе авторской группы под руководством академика А.А. Краевского отмечен Государственной премией Российской Федерации в области науки и техники за 2000 г.

При непосредственном участии и руководстве Георгия Артемьевича Галегова на протяжении 1996–2002 гг. были проведены исследования по преодолению лекарственной устойчивости при гриппе и герпесвирусной инфекции человека, доказана высокая противовирусная активность фосфорсодержащих нуклеозидов (нуклеозидтрифосфатов). Г.А. Галеговым и коллегами обнаружена и детально исследована эффективность ДНК-связывающих соединений – новых производных нетропсина. Результаты этих работ (2002–2009 гг.), позволили преодолеть резистентность инфекционных агентов к базовым химиотерапевтическим средствам.

Постоянное совершенствование знаний, логичное научное мышление, целеустремлённость позволили Георгию Артемьевичу представить результаты своего научного труда в виде диссертационных работ на соискание учёной степени кандидата (1963 г., «Исследования в области обмена и биосинтеза β-метиласпарагиновой кислоты»), а затем (в 1971 г.) и доктора биологических наук. С 1976 г. Г.А. Галегов носит учёное звание профессора.

Георгий Артемьевич награждён орденом Трудового Красного Знамени (10984 г.) и медалями. Он – автор и соавтор 46 патентов, зарегистрированных в том числе за пределами Российской Федерации. Учёный является членом специализированного научного Совета по защите докторских диссертаций по вирусологии, эпидемиологии и инфекционным болезням, членом междуведомственного совета по вирусологии РАМН, членом редколлегии отечественных и иностранных научных изданий (включая журнал «Вопросы вирусологии»), членом авторского коллектива по изданию ежегодного «Федерального руководства по использованию лекарственных средств». С 1991 по 2008 гг. он занимал пост председателя проблемной комиссии по химиотерапии и химиопрофилактике вирусных инфекций РАМН, был многолетним экспертом по вирусологии Фармакологического комитета Министерства здравоохранения и социального развития РФ. Перу Г.А. Галегова принадлежат (в т.ч. в соавторстве) свыше 450 научных трудов, опубликованных в отечественной и зарубежной печати. Под его руководством подготовлены 24 кандидата и доктора наук.

Все, кто работал и работает с Георгием Артемьевичем, знают его как человека разносторонних дарований, мудрого педагога, сочетающего высокий профессионализм с огромной работоспособностью, скромностью, доброжелательностью к окружающим. Г.А. Галегов – выдающийся исследователь, десятилетиями сохраняющий и развивающий лучшие традиции, заложенные его учителями.

Не перестают вызывать удивление и уважение компетентность учёного, его основательность и глубина, высокая организованность, принципы отношения к делу. Доброе имя, непререкаемый авторитет и огромную благодарность коллег Г.А. Галегов заслужил огромными знаниями, самоотверженным трудом, беззаветной преданностью и служением науке.

Сотрудники и коллеги искренне поздравляют Георгия Артемьевича с юбилеем и желают крепкого здоровья, дальнейших профессиональных успехов, благополучия и счастья!

Редколлегия журнала "Вопросы вирусологии"

Problems
of Virology

Voprosy
Virusologii