



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

5

Том 67 • 2022

Volume 67 • Issue 5 • 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 издании 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, 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 (Приказ Минобрнауки России от 12.12.2016 N 1586), как входящий в международную реферативную базу данных и систем цитирования Scopus) 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)

3.3.6 Фармакология, клиническая фармакология (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
публикации оферты
(<https://www.virusjour.elpub.ru>).

Подписано в печать 30.10.2022.
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.

5

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., член-корр. РАН)

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., акад. 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., акад. РАН; Новосибирск, Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Чвала И.А. (к.в.н.; Владимир, Россия)

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

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

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

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

Яшкулов К.Б. (к.м.н., Элиста, Россия)

МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

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

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

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

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

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

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

Oxford J. (DSc; London, UK)

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

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

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

Titov L.P. (MD, PhD, Dr. Sci., Prof., RAS Full Member Minsk, Republic of Belarus)

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

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

Webby R. (PhD; Memphis, USA)

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

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media. Certificate of registration PI no. FS77-77676

ISSN 0507-4088 (Print)
ISSN 2411-2097 (Online)
DOI prefix: 10.36233

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

Abstract Journals, AIDS & Cancer Research, Biocontrol News and Information, Biological Sciences, Chemical Abstracts, CrossRef, EBSCOhost Biological Abstracts, EBSCOhost Wildlife & Ecology Studies Worldwide, Elsevier BV Scopus, Elsevier BV EMBASE, Index Medicus, Excerpta Medica, Index Veterinarius, MEDLINE, National Library of Medicine PubMed, Parasitology Database, Poultry Abstracts, Review of Medical and Veterinary Entomology, Thomson Reuters Biological Abstracts, Thomson Reuters BIOSIS Previews, Thomson Reuters Science Citation Index Expanded, Thomson Reuters Web of Science, Tropical Diseases Bulletin, Veterinary Science Database, Virology and AIDS Abstracts, Russian Science Citation Index (on the Web of Science platform),

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

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

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

Full texts of issues of the journal are available on:

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

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

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

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

<https://www.ebsco.com>

PUBLISHER:

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

Head of the Editorial and Publishing Department: *Olga V. Osokina*

EDITORIAL OFFICE:

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

Head of Editorial Office:

Anna L. Neverova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

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

When the author submits an article to the Editorial Board, he/she accepts the terms and conditions of the public offer agreement (<https://www.virusjour.elpub.ru;>)

Signed to the press on October 30, 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

5

Volume 67 · 2022

EDITORIAL BOARD

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

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

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

Scientific editor: **Zaberezhny 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. – RAS Full Member, 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 Full 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

РЕДАКЦИОННАЯ КОНЦЕПЦИЯ

Львов Д.К., Альховский С.В., Жирнов О.П.

130 лет вирусологии* 357

ОБЗОРЫ

Демин М.В., Тихомиров Д.С., Туполева Т.А., Филатов Ф.П.Устойчивость к противовирусным препаратам у вирусов человека из подсемейства *Betaherpesvirinae*. 385**Бахрушина Е.О., Михел И.Б., Кондратьева В.М., Демина Н.Б., Гребенникова Т.В.***In situ* гели как современный способ интраназальной доставки вакцин* 395

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Парамонова Н.М., Чепур С.В., Первак М.О., Мясников В.А., Тюнин М.А., Ильинский Н.С., Каневский Б.А., Смирнова А.В.Электронно-микроскопическое исследование неокортекса сирийских хомяков (*Mesocricetus auratus*) при инфекции вируса SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Coronavirinae*: *Betacoronavirus*: *Sarbecovirus*) 403**Бинятова А.С., Юнасова Т.Н., Ильясова Т.Н., Саркисян К.А., Фадейкина О.В., Мовсесянц А.А.**

Анализ качества комбинированной отечественной вакцины для профилактики кори, краснухи и паротита. 414

Карташов М.Ю., Свиринов К.А., Кривошеина Е.И., Чуб Е.В., Терновой В.А., Кочнева Г.В.

Распространенность и молекулярно-генетическая характеристика вирусов парентеральных гепатитов В, С и D у ВИЧ-положительных лиц в Новосибирской области 423

Ленева И.А., Смирнова Д.И., Карташова Н.П., Грачева А.В., Иванова А.В., Глубокова Е.А., Корчевая Е.Р., Панкратов А.А., Трунова Г.В., Хохлова В.А., Свитич О.А., Зеерев В.В., Файзулов Е.Б.

Сравнительное изучение Ухань-подобного и омикрон-подобного вариантов SARS-CoV-2 в экспериментальных животных моделях 439

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

Аманова Ж.Т., Саметова Ж.Ж., Булатов Е.А.Адаптация вируса оспы овец (Poxviridae: *Capripoxvirus*: *Sheeppox virus*) к линии клеток почки африканской зелёной мартышки и оценка его иммунобиологических свойств 450

CONTENTS

EDITORIAL CONCEPT

Lvov D.K., Alkhovsky S.V., Zhirnov O.P.130th anniversary of virology* 357

REVIEWS

Demin M.V., Tikhomirov D.S., Tupoleva T.A., Filatov F.P.Resistance to antiviral drugs in human viruses from the subfamily *Betaherpesvirinae*. 385**Bakhrushina E.O., Mikhel I.B., Kondratieva V.M., Demina N.B., Grebennikova T.V.***In situ* gels as a modern method of intranasal vaccine delivery* 395

ORIGINAL RESEARCHES

Paramonova N.M., Chepur S.V., Pervak M.O., Myasnikov V.A., Tyunin M.A., Kanevskij B.A., Ilinskii N.S., Smirnova A.V.An electron microscopic study of neocortex of Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Coronavirinae*: *Betacoronavirus*: *Sarbecovirus*) 403**Binyatova A.S., Unasova T.N., Iliasova T.N., Sarkisyan K.A., Fadeikina O.V., Movsesyants A.A.**

Quality analysis of a combined domestic vaccine for the prevention of measles, rubella and mumps 414

Kartashov M.Yu., Svirin K.A., Krivosheina E.I., Chub E.V., Ternovoi V.A., Kochneva G.V.

Prevalence and molecular genetic characteristics of parenteral hepatitis B, C and D viruses in HIV positive persons in the Novosibirsk region 423

Leneva I.A., Smirnova D.I., Kartashova N.P., Gracheva A.V., Ivanina A.V., Glubokova E.A., Korchevaya E.R., Pancratov A.A., Trunova G.G., Khokhlova B.A., Svitich O.A., Zverev V.V., Faizuloev E.B.

Comparative study of Wuhan-like and Omicron-like variants of SARS-CoV-2 in experimental animal models. 439

TO HELP THE VIROLOGIST

Amanova Zh.T., Sametova Zh.Zh., Bulatov Ye.A.Adaptation of the sheep pox virus (Poxviridae: *Capripoxvirus*: *Sheeppox virus*) to African green monkey kidney cell line and evaluation of its immunobiological properties 450

РЕДАКЦИОННАЯ КОНЦЕПЦИЯ

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-140>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



130 лет вирусологии

Львов Д.К., Альховский С.В., Жирнов О.П.

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

130 лет назад, в 1892 г., нашим великим соотечественником Дмитрием Иосифовичем Ивановским (1864–1920) открыт новый вид патогенов – вирусы. Вирусы существуют с момента зарождения жизни на Земле и на протяжении более 3 млрд лет по мере эволюции биосферы включены в межпопуляционные взаимодействия с представителями всех царств жизни: архей, бактерий, простейших, водорослей, грибов, растений, беспозвоночных и позвоночных животных, позднее включая вид *Homo sapiens* (*Hominidae*, *Homininae*).

Открытие Д.И. Ивановского положило начало новой науке – вирусологии, бурное развитие которой в XX в. было связано с борьбой с новыми и возвращающимися (emerging-reemerging) инфекциями, эпидемии (эпизоотии) и пандемии (панзоотии) которых создавали угрозу национальной и глобальной биобезопасности (клещевой и другие энцефалиты, геморрагические лихорадки, грипп, оспа, полиомиелит, ВИЧ, парентеральные гепатиты, коронавирусные и другие инфекции). Фундаментальные исследования свойств вирусов заложили основу для разработки эффективных методов диагностики, вакцинопрофилактики и противовирусных лечебных препаратов. Отечественные вирусологи продолжают занимать ведущие позиции по некоторым приоритетным направлениям современной вирусологии, в частности по вакцинологии, мониторингу формирования популяционного генофонда вирусов в процессе эволюции в различных экосистемах и ряду других направлений. Осмысленное сочетание теоретических подходов изучения эволюции вирусов с инновационными методами исследований их молекулярно-генетических свойств и создание на этой основе новых поколений вакцин и противовирусных препаратов обеспечат существенное снижение последствий грядущих пандемий (панзоотий), возможность возникновения которых в будущем чрезвычайно высока. В обзоре представлены основные этапы становления и развития вирусологии как науки в России с акцентом на наиболее значимых достижениях отечественных вирусологов в борьбе с вирусными инфекционными заболеваниями человека и животных.

Ключевые слова: вирусология; Д.И. Ивановский; оспа; полиомиелит; новые инфекции; возвращающиеся инфекции; грипп; клещевой энцефалит; арбовирусы; ВИЧ; парентеральные гепатиты; COVID-19; вакцины

Для цитирования: Львов Д.К., Альховский С.В., Жирнов О.П. 130 лет вирусологии. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(5): 357-384. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-140>

Для корреспонденции: Львов Дмитрий Константинович, академик РАН, профессор, д-р мед. наук, заведующий отделом экологии вирусов с научно-практическим центром по экологии и эпидемиологии гриппа, Институт вирусологии имени Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия. E-mail: dk_lvov@mail.ru

Участие авторов: Львов Д.К. – разработка концепция, обобщение материала, написание и редактирование статьи; Альховский С.В. – написание и редактирование статьи; Жирнов О.П. – написание и редактирование статьи.

Финансирование. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ, проект № 20-04-60154.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Поступила 03.09.2022
Принята в печать 04.10.2022
Опубликована 31.10.2022

REVIEW ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-140>

130th anniversary of virology

Dmitry K. Lvov, Sergey V. Alkhovsky, Oleg P. Zhirnov

D.I. Ivanovsky Institute of Virology of N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology of Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia

130 years ago, in 1892, our great compatriot Dmitry Iosifovich Ivanovsky (1864–1920) discovered a new type of pathogen – viruses. Viruses have existed since the birth of life on Earth and for more than three billion years, as the biosphere evolved, they are included in interpopulation interactions with representatives of all kingdoms of life: archaea, bacteria, protozoa, algae, fungi, plants, invertebrates, and vertebrates, including the *Homo sapiens* (*Hominidae*, *Homininae*).

Discovery of D.I. Ivanovsky laid the foundation for a new science – virology. The rapid development of virology in the 20th century was associated with the fight against emerging and reemerging infections, epidemics (epizootics) and pandemics (panzootics) of which posed a threat to national and global biosecurity (tick-borne and other encephalitis, hemorrhagic fevers, influenza, smallpox, poliomyelitis, HIV, parenteral hepatitis, coronaviral and other infections). Fundamental research on viruses created the basis for the development of effective methods of diagnostics, vaccine prophylaxis, and antiviral drugs. Russian virologists continue to occupy leading positions in some priority areas of modern virology in vaccinology, environmental studies of zoonotic viruses, studies of viral evolution in various ecosystems, and several other areas. A meaningful combination of theoretical approaches to studying the evolution of viruses with innovative methods for studying their molecular genetic properties and the creation of new generations of vaccines and antiviral drugs on this basis will significantly reduce the consequences of future pandemics or panzootics. The review presents the main stages in the formation and development of virology as a science in Russia with an emphasis on the most significant achievements of soviet and Russian virologists in the fight against viral infectious diseases.

Keywords: *virology; D.I. Ivanovsky; smallpox; poliomyelitis; emerging infections; reemerging infections; influenza; tick-borne encephalitis; arboviruses; HIV; parenteral hepatitis; COVID-19; vaccines*

For citation: Lvov D.K., Alkhovsky S.V., Zhirnov O.P. 130th anniversary of virology. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(5): 357–384. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-140>

For correspondence: Lvov D.K., Academician RAS, Head of Department of Ecology of Viruses with Scientific Center of Ecology and Epidemiology of Influenza, D.I. Ivanovsky Institute of Virology of N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology of Ministry of Health of Russian Federation, 123098, Moscow, Russia. E-mail: dk_lvov@mail.ru

Information about the authors:Lvov D.K., <https://orcid.org/0000-0001-8176-6582>Alkhovsky S.V., <https://orcid.org/0000-0001-6913-5841>Zhirnov O.P., <https://orcid.org/0000-0002-3192-8405>

Contribution: Lvov D.K. – developing a concept, summarizing the material, writing and editing an article; Alkhovsky S.V. – writing and editing an article; Zhirnov O.P. – writing and editing an article.

Funding. The work was partially funded by Russian Foundation for Basic Research, project 20-04-60154.

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

Received 03 September 2022

Accepted 04 October 2022

Published 31 October 2022

Введение

В основу сложившейся системы изучения инфекционной патологии положен этиологический принцип: вызывающие её возбудители изучаются тремя науками – бактериологией, вирусологией, микологи-ей, объединёнными в общее понятие «микробиология». По инициативе ведущих вирусологов середины XX в. Виктора Михайловича Жданова (1914–1986), Джозефа Мельника (Joseph Melnick, США, 1914–2001), Питера Уайлди (Peter Wildy, Великобритания, 1920–1987) и Нильса Окер-Блома (Nils Oker-Blom, Финляндия, 1919–1995) была организована вирусологическая секция Международного союза

микробиологических обществ (International Union of Microbiology Societies – IUMS), конгрессы которого проводятся 1 раз в 3 года. Вирусологическая часть этих конгрессов является наиболее активной и многочисленной.

В современной классификации вирусы представляют отдельный, но формально не выделенный аналог домена (domain) – Viruses, наряду с тремя главными доменами живой природы: археями (Archaea), бактериями (Bacteria) и эукариотами (Eukarya). Внутри домена Viruses вирусы объединены в шесть основных надцарств (realm), 10 царств (kingdom), 17 типов (phylum), 65 отрядов (order), 233 семейства (family)

и 2606 родов (genus), включающих более 10 тыс. описанных видов (species)¹.

Рождение вирусологии

Эмпирический период развития вирусологии относится к середине XIX в., когда Эдвард Дженнер (Edward Jenner, 1729–1823) использовал экссудат от инфицированных оспой коров для иммунизации людей от натуральной оспы, а Луи Пастер (Louis Pasteur, 1822–1895) за 14 лет до открытия первого вируса животных разработал первую антирабическую вакцину.

Период зарождения вирусологии как науки продолжался в последнее десятилетие XIX в., и в этом процессе выдающаяся роль принадлежит учёным, работавшим на модели вируса табачной мозаики (ВТМ, TMV), по современной классификации принадлежащего к роду *Tobamovirus* семейства *Virgaviridae*: германскому химику Адольфу Майеру (A. Mayer, 1843–1942), русскому ботанику Дмитрию Иосифовичу Ивановскому (1864–1920) и голландскому бактериологу Мартину Бейеринку (Martinus Willem Beijerinck, 1851–1931). А. Майер дал название болезни табака и установил её инфекционную природу [1]. Д.И. Ивановский в 5-летнем цикле работ, начатом в 1887 г., впервые показал, что речь идёт о двух различных заболеваниях с грибковой и неизвестной этиологией. Результаты своих первых экспериментов 28-летний учёный опубликовал в журнале «Сельское хозяйство и лесоводство» под названием «О двух болезнях табака» [2], а также в трудах Императорской академии наук Санкт-Петербурга на немецком языке [3] в 1892 г. Дальнейшее развитие идеи о новой биологической форме жизни получило в его докторской диссертации «Мозаичная болезнь табака» [4].

Д.И. Ивановский первым выявил и сформулировал основной комплекс признаков, характерных для новой неизвестной формы жизни:

- 1) способность размножаться только в живом организме – растении, листьях табака (облигатный паразитизм);
- 2) в отличие от микробов неспособен размножаться на обычном бесклеточном питательном агаре;
- 3) имеет корпускулярную природу внутриклеточного агента (*contagium vivum fixum*);
- 4) обладает инфекционной природой биологического существа (контагиозность – заразность);
- 5) имеет малый размер и способность проникать через микробные фарфоровые фильтры (фильтрующий-инфекционный агент).

Голландский учёный М. Бейеринк, сделавший ряд сходных наблюдений 6 лет спустя после публикации Д.И. Ивановским результатов в 1892 г., признавал приоритет результатов русского учёного, о чём он написал в своём известном письме к Д.И. Ивановскому в 1899 г. [5, 6]: «Подтверждаю, что приоритет опыта с фильтрованием через свечи (свечи Шамберлана. – *Примеч. авт.*), как я теперь убедился, принадлежит господину Ивановскому. При написании моей работы

я не знал ни об опытах господина Ивановского, ни господина Половцева».

В отличие от русского учёного голландец в своих работах допускал ошибочную интерпретацию своих результатов, считая агент болезни табака растворимым ядом (*contagium vivum fluidum*). На основании этой ошибочной идеи М. Бейеринк предложил неточный термин «вирус» (жидкий яд) для обозначения нового неизвестного инфекционного агента, но этот ошибочный термин прижился в научной литературе и используется в настоящее время в публичном лексиконе [7].

Таким образом, открытие нового корпускулярного по своей природе инфекционного агента как новой формы жизни по праву признано во всём мире за русским учёным Д.И. Ивановским. 50 лет спустя первый нобелевский лауреат в области вирусологии Венделл Стенли (W. Stanley) писал, что «будет справедливым признать Ивановского отцом новой науки – вирусологии, причём его право на славу растёт с годами и его отношение к вирусам должно рассматриваться в том же свете, как мы смотрим на отношение Пастера и Коха к бактериям» [8].

Имя Д.И. Ивановского занимает видное место в истории российской науки. По уровню признания его идей и их влияния на развитие отечественной и мировой науки его имя находится в одном ряду с такими выдающимися учеными России, как М.В. Ломоносов, И.И. Мечников, И.П. Павлов, Д.И. Менделеев, Н.И. Вавилов, К.Э. Циолковский и др. Благодаря гениальности Д.И. Ивановского Россия стала родиной вирусологии на все времена, и историческую память об этом ярком имени и событии необходимо беречь и возвышать для будущих поколений России, начиная, безусловно, со школьной программы.

Признавая мировое значение открытий Д.И. Ивановского и важность вирусологической науки в государстве, Правительство СССР в 1950 г. приняло Постановление об увековечивании его памяти и учредило премию имени Д.И. Ивановского. Сегодня об этой премии в России забыли. Возможно, пришло время возродить её теперь уже под эгидой Российской академии наук и, возможно, учредить престижную международную премию имени Д.И. Ивановского, а также выпустить почтовую марку в честь 130-летия первой основополагающей научной статьи Д.И. Ивановского в 1892 г., давшей отсчёт новой отрасли знаний – науки «вирусология».

Так началось становление вирусологии как науки, завершившееся в конце последней декады XIX в. первым описанием вирусных инфекций животных – ящура немецким учёным Фридрихом Лёффлером (F. Loeffler, 1852–1915) [9] и людей – жёлтой лихорадки американским военным врачом Уолтером Ридом (W. Reed, 1851–1902) [10].

Развитие вирусологии – история новых и возвращающихся инфекций

Вновь открытые вирусные инфекции растений, животных и человека на этапе их изучения следует отне-

¹Current ICTV Taxonomy Release. Taxonomy Browser. Available at: <https://ictv.global/taxonomy>.

сти к так называемым новым и вновь возникающим (emerging – reemerging) инфекциям [11, 12]. Особенно важно изучение эволюции возбудителей этих инфекций, которую следует рассматривать как историю экологии вида. Экология, по формулировке создателя этой науки (1866) Эрнста Геккеля (Ernst Heinrich Haeckel, 1834–1919), изучает взаимодействие на популяционном уровне видов между собой и их средой обитания [13]. Позднее концепция была расширена понятием о мультивидовых сообществах – экосистемах [14–16]. Стало очевидным, что эти взаимодействия протекают на молекулярно-генетическом уровне в процессе формирования популяционного генофонда в рамках экосистемы [17]. Характер этих взаимодействий и их последствия кодируются единым защищённым популяционным генофондом видов [18]. Период его формирования у вирусов протекает на протяжении десятков, сотен, тысяч, миллионов лет, тесно взаимодействуя с элементами биосферы в имеющихся условиях среды обитания. Так сформировалось направление молекулярной экологии вирусов.

Результаты изучения вируса жёлтой лихорадки из экологической группы арбовирусов показали способность (и необходимость) к межтаксонной трансмиссии возбудителя от членистоногих переносчиков (Arthropoda) (паукообразных (Arachnoidea) клещей и насекомых (Insecta), двукрылых (Diptera) – комаров, москитов, мокрецов) позвоночным хозяевам (Vertebrata) разных таксонов (Reptilia, Amphibia, Aves, Mammalia) к. Явление межтаксонной передачи вирусов в процессе их эволюции привело, в частности, к переходу зоонозных вирусов в популяции *Homo sapiens* с формированием всех инфекционных болезней человека, превратившихся в зооантропонозы и антропонозы.

Со временем выяснилось, что вирусы поражают все элементы биосферы – археи (Archea), бактерии (Bacteria), простейших (Protozoa), водоросли (Algae), растения (Plantae), грибы (Fungi), беспозвоночных (Invertebrata) и позвоночных (Vertebrata), животных (Animalia) и человека, появившегося существенно позднее [19, 20]. Этот процесс занял порядка 3,5 млрд лет и был связан с эволюцией среды обитания вирусов и их хозяев – биосферы. Важнейшими этапами стали появление прокариот в архее, эукариот в протерозое, зарождение основных типов животных в кембрии, возникновение рыб в силуре, земноводных в девоне, пресмыкающихся в карбоне – юре, насекомоядных млекопитающих и птиц в меловом периоде мезозоя, летучих мышей в третичном периоде кайнозоя, грызунов в палеоцене. Все эти события предшествовали появлению человека. Первые представители отряда приматов появились в палеоцене. Останки первых предков человека (семейство человекообразных – Pongidae) отнесены к олигоцену. Гоминиды (семейство людей – Hominidae) появились в плиоцене, а гоминины (подсемейство Homininae, род *Homo*) установлены в плейстоцене четвертичного периода. Предки *H. sapiens* с начала современного периода начали взаимодействовать с популяциями

вирусов животных. Одомашнивание животных, начавшееся 10–20 тыс. лет назад, существенно активизировало переход вирусов животных в популяцию людей [17, 21]. Продолжающаяся в природных экосистемах эволюция вирусов в результате формирования популяционных генофондов создаёт условия для постоянной угрозы появления новых генетических кластеров, способных к переходу в популяции людей, и возникновения тем самым новых инфекций. Процесс межпопуляционного взаимодействия вирусов и их хозяев в меняющихся условиях среды обитания определяет изменения популяционного генофонда с его адаптацией к этим изменениям. Это вызывает необходимость проведения системного мониторинга основных закономерностей, обеспечивающих сохранение вирусов в биосфере [11, 12, 17–22].

Отечественная вирусология по прошествии 130 лет с момента описания Д.И. Ивановским первого возбудителя вирусной инфекции продолжает занимать, используя инновационные технологии, ведущие позиции по ряду приоритетных направлений современной вирусологии, в частности по изучению эволюции возбудителей новых и возвращающихся инфекций, представляющих глобальную угрозу биобезопасности населения и окружающей среды. Новые и возвращающиеся инфекции (emerging – reemerging infections) – «дремлющий вулкан», который порой пробуждается. Вирусы, прежде всего с респираторным путём передачи (вирусы гриппа, оспы, коронавирусы), в обозримом будущем еще «покажут зубы» населению нашей планеты.

Годы работы Д.И. Ивановского были золотым веком Санкт-Петербургского университета, где работала блестящая плеяда учёных: Д.И. Менделеев, А.М. Бутлеров, В.В. Докучаев, И.М. Сеченов и его непосредственные научные руководители – А.С. Фаминцын и А.Н. Бекетов. Это было время общего расцвета России, оборванного событиями 1917 г. и последующей Гражданской войной. Искры отечественной вирусологии лишь теплились на этом пепелище. С конца 1920–1930 гг. отечественная вирусология постепенно возродилась.

Вирус натуральной оспы (Poxviridae: Orthopoxvirinae: Orthopoxvirus)

В 1920-е гг. в стране, как и повсеместно в мире, возникли тяжёлые эпидемии, вызванные вирусом натуральной оспы (*Variola major virus*), – до 200 тыс. случаев в год, а летальность достигала 40–60%. Для массовой иммунизации было реализовано производство вакцины, создана система обязательных прививок, что привело к ликвидации заболеваемости в 1936 г. В 1958 г. на XI ассамблее Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) В.М. Жданов предложил создать глобальную программу ликвидации натуральной оспы в мире. Более 1,5 млрд доз вакцин были безвозмездно переданы нашей страной для реализации программы, которой руководил блестящий американский эпидемиолог Дональд Гендерсон (D. Henderson). Ориентировочная стоимость кампании по эрадика-

ции натуральной оспы оценивается в 300 млн долл., а число спасённых за этот период жизней составило около 50 млн, т. е. 6 долл. за человеческую жизнь [23]. Многие отечественные вирусологи приняли участие в реализации программы, прежде всего С.С. Мареникова, С.Н. Щелкунов впервые секвенировал геном вируса натуральной оспы [24]. Последний случай заболевания зафиксирован в октябре 1977 г. в Сомали [25, 26]. Однако на тот момент была ликвидирована лишь заболеваемость натуральной оспой среди людей. В природе оставалось множество очагов – от тропических пустынь до субарктической тундры, генетически близких вирусов, в основном связанных на протяжении миллионов лет с грызунами [17].

Очевидно, что возможен возврат проникновения вируса, как это, по крайней мере, трижды происходило в прошлом [17, 27–30]. Тревогу вызывают участвовавшие в последние годы массивные вспышки оспы обезьян в Африке [31–35]. Исследования показали, что природным резервуаром вируса являются грызуны – по крайней мере 4 вида белок (Rodentia: Sciuridae): *Funisciurus lemniscates*, *F. anerythrus*, *Heliosciurus rufobranium* и *H. gambianus*. У этих животных установлено носительство при бессимптомном течении болезни [36]. Обезьяны родов *Cercopithecus*, *Colobus* и *Cercocebus* выполняют роль промежуточных хозяев и основного источника заболевания людей. В 2003 г. десятки случаев заболевания людей возникли в ряде штатов США. Клиническая картина была легче, чем в африканских вспышках [37–39]. Большинство заболевших заразились от грызунов, степных собачек *Synomys ludovicianus*, которых содержат в качестве домашних животных. Перед продажей они имели контакт с импортированными из Африки грызунами и циветтами, многие из которых погибли.

В Бразилии, Индии, Пакистане регистрируются вспышки среди домашних животных и контактирующих с ними людей, вызываемые зоонозными осповирусами, связанными с грызунами [40]. Расчёты показали, что эволюционно близкие к вирусу натуральной оспы виды оспы верблюдов и африканских гололапых песчанок выделились из единого предка около 4 тыс. лет назад [30].

В 2022 г. произошло пандемическое распространение оспы обезьян. С 1 января по 1 сентября 2022 г., по данным ВОЗ, лабораторно подтверждено более 50 тыс. случаев в 101 стране [41], тогда как в африканских странах за весь период наблюдения (с 1970 по 2007 г.) зарегистрировано 4522 случая в 9 странах, 72 случая в США. Зарегистрировано 3 летальных исхода (все в Африке), это всего лишь 0,006% (как при сезонном гриппе), по сравнению со средней летальностью 9,8%, наблюдавшейся в предыдущих африканских вспышках. В Российской Федерации сообщалось лишь о двух случаях (июль–сентябрь 2022 г.). Единичные случаи в мире регистрировали в январе–апреле с резким ростом в июне–июле. 99,5% случаев заболеваний зарегистрированы у мужчин, из них 60% – мужчины, практикующие секс

с мужчинами, 41% – ВИЧ-позитивные. Клинические симптомы – генерализованная сыпь по всему телу (81%), лихорадка (50%), сыпь на гениталиях (41%), инкубационный период 7–21 суток (чаще 12 суток). Генетически вирус относится к западноафриканской кладе.

Для диагностики используется ПЦР (полимеразная цепная реакция). Продолжительность заболевания 2–4 недели [41]. Для лечения и профилактики рекомендован синтезированный в 1996 г. цидофовир (ациклический фосфатный аналог цитидин-5'-монофосфата) [42, 43]. Препарат эффективен, но нефротоксичен и требует контроля за функционированием почек. Разработаны липофильные, более эффективные и менее токсичные аналоги – гексациклоксипропилцидофосфат. В США синтезирован препарат ST-246, обеспечивающий 50%-ный защитный эффект в отношении вируса натуральной оспы (при концентрации 0,067 мкМ) и оспы обезьян (при концентрации < 0,04 мкМ) [44]. В опытах на обезьянах показана 100%-ная защита от натуральной оспы при однократной пероральной дозе 10 мг/кг в течение 14 дней, что эквивалентно пероральной дозе 400 мг 1 раз в день в течение 2 недель у человека.

Использование в критической ситуации живых противоспепных вакцин вызовет тяжёлые осложнения у 25% привитых, поэтому разработаны вакцины 3-го и 4-го поколения Imvamune (Bavarian Nordic, Германия), Асам 2000, IMVAMUNE и др., не дающие серьёзных поствакцинальных осложнений [45–47].

Все перечисленные факты определяют теоретическую возможность повторения пандемической ситуации за счёт выплеска из того или иного природного резервуара вируса натуральной оспы или родственного ему. Такое развитие событий привело бы к катастрофическим последствиям, поскольку через 40 лет после прекращения в мире вакцинации население практически не имеет противоспепного иммунитета [48]. Нельзя исключать использование этой группы вирусов в террористических целях. Это определяет необходимость иметь в государственном резерве необходимые запасы безопасных и эффективных препаратов для лечения и профилактики [49].

Вакцины, противовирусные препараты

Пионерами исследований по бешенству в России были Илья Ильич Мечников (1845–1916), Николай Федорович Гамалея (1859–1949). В 1886 г. в Одессе была открыта вторая в мире после парижской Пастеровская антирабическая станция, а к 1935 г. в стране их были уже сотни. Разработаны новые вакцины [50], проводятся мониторинг распространения вируса и молекулярно-генетический анализ циркулирующих штаммов [51].

К исследованиям в стране по арбовирусам мы вернёмся позднее. А здесь вновь укажем на величайшие достижения вирусологов по разработке вакцин против тяжелейших вирусных инфекций, унёсших миллионы человеческих жизней [23, 52–56].

В конце 1930-х гг. в США и Франции были разработаны вакцины против жёлтой лихорадки, в 1942 г.

в Англии – первая антигриппозная вакцина. Сотни миллионов детей в мире сохраняют здоровье и жизни в результате вакцинации против кори, краснухи, паротита [23, 52–54]. В разработку технологии отечественных вакцин против детских инфекций внесли вклад А.А. Смородинцев (1901–1986), М.П. Чумаков (1909–1993), О.Г. Анджапаридзе (1920–1996), В.В. Зверев, Н.В. Юминова и сотни сотрудников возглавляемых ими коллективов.

Глобальная пандемия полиомиелита определила необходимость разработки вакцины для борьбы с этим тяжёлым заболеванием. В 1953 г. Джонатаном Солком (J. Salk, 1914–1995) была создана инактивированная, а в 1956 г. Альбертом Сэбиным (Albert Sabin, 1907–1993) – живая аттенуированная вакцина для перорального применения. Особенно велик в нашей стране вклад в эти исследования А.А. Смородинцева и М.П. Чумакова, возглавившего в 1955 г. Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов Академии медицинских наук (АМН) СССР. В беспримерно короткие сроки было налажено крупномасштабное производство вакцины из ослабленных штаммов А. Сэбина, и в условиях контролируемого эпидемиологического опыта проведено изучение её эффективности и безопасности. К 1960 г. была ликвидирована эпидемическая ситуация в стране. Крупные партии вакцины были бесплатно переданы Японии и ряду других стран, где также была резко снижена заболеваемость. В этой беспрецедентной работе активное участие принимали совсем молодые, ставшие затем академиками вирусологи Сергей Григорьевич Дроздов (1929–2016), Василий Андреевич Лашкевич (1927–2018), Сослан Григорьевич Дзагуров (1925–1985), Борис Федорович Семёнов (1929–2010), Марина Константиновна Ворошилова (1922–1986) и многие другие. В 1988 г. ВОЗ приняла решение о глобальной ликвидации заболеваемости полиомиелитом [57]. В России это заболевание не регистрируется с 1 июля 2002 г., за исключением нескольких завозных случаев. Однако в последнее время в ряде сопредельных стран в связи с прерыванием процесса вакцинации ситуация заметно ухудшилась.

Блестящие результаты достигнуты отечественными исследователями по разработке, изучению эффективности и безопасности и массовому производству вакцин против коронавируса SARS-CoV-2. Основные разработчики – Александр Леонидович Гинцбург, Денис Юрьевич Логунов из Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии (НИЦЭМ) имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России и Сергей Владимирович Борисевич из 48-го Центрального НИИ Минобороны России удостоены Государственной премии и высших правительственных наград. Вакцина «Спутник-V» была первой зарегистрированной в мире вакциной для борьбы с COVID-19 [58].

Зарегистрированная 11 августа 2020 г. вакцина «Спутник V» разработана на платформе двух нереплицирующихся аденовирусных векторов человека

(HAdV-26 и HAdV-5) в НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России. Вторая отечественная вакцина (рекомбинантные пептиды), «ЭпиВакКорона» из ГНЦВБ «Вектор», не получила широкого распространения. Третья отечественная вакцина, «КовиВак» из Федерального научного центра исследований и разработки иммунобиологических препаратов (ФНЦИРИП) имени М.П. Чумакова, зарегистрированная 19 февраля 2021 г. (инактивированная на клетках Vero с адьювантом Al-OH), изготовлена по принципу разработанной в 1963 г. культуральной вакцины против клещевого энцефалита (КЭ). За рубежом разработаны Pfizer (зарегистрирована 2 декабря 2020 г., РНК-вакцина в липосомальных капсулах), Moderna (18 декабря 2020 г., РНК-вакцина в липосомальных капсулах), Astra-Zeneca (30 декабря 2020 г., нереплицирующийся аденовирусный вектор шимпанзе), Janssen (27 февраля 2021 г., нереплицирующийся аденовирусный вектор человека HAdV26), инактивированные вакцины с адьювантом Al-OH Covaxin (Индия, 3 января 2021 г.), QazVac (Казахстан, 13 января 2021 г.), CoronaVac (Китай, 6 февраля 2021 г.), Sinofarm (Китай, 25 февраля 2021 г.) [23]. Вакцины существенно снизили заболеваемость и летальность и являются, по сути, единственным высокоэффективным средством борьбы с различными генетическими вариантами COVID-19.

В представленных материалах, в частности, очевидна роль вакцинации в борьбе с вирусными инфекциями. Успех этой борьбы определяется в каждом случае наличием безопасной и эффективной вакцины. Внедрение вакцин является величайшим достижением человечества и отражает успех в борьбе за продолжительность и качество жизни.

Вакцинология как наука оформилась в последние десятилетия и занимается разработкой вакцин, изучает их безопасность и эффективность [23, 53]. В XX в. ожидаемая продолжительность жизни возросла с 32 до 69 лет, главным образом за счёт снижения детской смертности [23]. Национальный календарь прививок в РФ (приказ Министерства здравоохранения РФ от 6 декабря 2021 г. № 1122н) включает (указаны вирусные инфекции): гепатит В – в первые часы жизни, 1 мес., 6 мес.; полиомиелит – 3 мес., 4,5 мес. (инактивированная), 6 мес. (оральная), 18 мес., 20 мес., 6 лет, 14 лет (оральная); корь, краснуха, эпидемический паротит – 12 мес. (живые аттенуированные вакцины)². Категории граждан, подлежащих обязательной вакцинации против вирусных инфекций: бешенство – лица высокого риска (ветеринары, егеря); КЭ – лица проживающие и посещающие эндемичные территории; жёлтая лихорадка – визитёры эндемичных территорий; гепатит А – лица, проживающие и посещающие эндемичные террито-

²Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.12.2021 № 1122н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям и порядка проведения профилактических прививок».

рии; SARS-CoV-2 – группы риска, военнослужащие, призывники³.

После открытия вируса КЭ начиная с 1937 г. на протяжении более 80 лет отечественные вирусологи проводили исследования по разработке и усовершенствованию вакцин против этой инфекции, в 1937–1959 гг. из мозга инфицированных белых мышей (поствакцинальные энцефалиты, 1 : 20 000) [59, 60]. С 1960 г. под руководством М.П. Чумакова организовано крупномасштабное производство культуральной инактивированной вакцины [61, 62]. Изучение в условиях контролируемого эпидемиологического опыта показало её безопасность и высокую эффективность (95–98%) [63]. В Российской Федерации в настоящее время разрешены к применению «Вакцина клещевого энцефалита культуральная очищенная концентрированная инактивированная сухая» (КЭ-Москва) и «Клещ-Э-Вак» производства ФГБНУ «ФНЦИРИП имени М.П. Чумакова» РАН (Россия), «ЭнцеВир» и «Энце-Вир НЭО детский» производства ФГУП НПО «Микроген» Минздрава России (Россия), «ФСМЕ-Иммун» и «ФСМЕ-Иммун Джуниор» производства Pfizer Inc. (Австрия), «Энцепур» и «Энцепур детский» производства GSK Vaccines GmbH (Германия). Схема вакцинации: первые две дозы вводят с интервалом 1–7 месяцев, третью дозу через год с последующими ревакцинациями каждые 3 года. Отечественные вакцины эффективны против всех генотипов вируса КЭ и вируса омской геморрагической лихорадки (ОГЛ), на эндемичной территории должно быть вакцинировано 80–95% населения⁴ [63–65].

Вирусы, в особенности РНК-содержащие, имеют высокую природную изменчивость, которая, как правило, опережает производственные возможности общества по созданию актуальных вакцин. В медицинской повестке стоит вопрос о разработке универсальных вакцин широкого противовирусного спектра действия, направленного на консервативные вирусные белки или их универсальные (консервативные) домены, либо использование вирусных эпитопов, специфичных для формирования консервативного клеточного иммунитета в реципиентном макроорганизме. Такие вакцины, как ожидается, будут закрывать медицинскую брешь в случае возникновения новых опасных вариантов (генотипов) семейств вирусов с высокой потенциальной угрозой для людей, таких как вирусы птичьего гриппа, новых коронавирусов, оспы, крымской-конго геморрагической лихорадки (ККГЛ), Эбола и др. Пока такие вакцины не разработаны, но наука находится на пороге создания подобных препаратов, и во всем мире идут интенсивные

поисковые исследования в этом направлении, в частности, с применением технологии моноклональных антител для создания универсальных препаратов.

В настоящее время формируется новое направление в химиотерапии по созданию лекарств нового типа, направленных не на сам вирус, а на факторы клетки-хозяина, необходимые вирусу для размножения. Такой подход отличается от классического принципа «волшебной пули», направленного на избирательное поражение инфекционного агента, который выдвинул ещё в прошлом веке известный немецкий учёный Пауль Эрлих при поиске и создании специфических средств лечения сифилиса [66]. Это новое направление, которое интенсивно развивается последние 15 лет, базируется на знаниях молекулярных механизмов взаимодействия вирусов с клетками-мишенями и понимании молекулярных основ патогенеза вирусных заболеваний [67–70]. Процесс формирования таких необходимых базовых знаний молекулярного характера приобретает в последние годы ускоренное развитие благодаря применению в вирусологии методов протеомики, геномики, кинетики и редактирования генома [68, 71]. В отличие от лекарств (вирусной «волшебной пули»), направленных непосредственно на сам вирус, агенты клеточного патогенетического типа будут иметь широкий спектр противовирусной активности и практически не давать возможности патогену сформировать лекарственную резистентность к патогенетическому препарату, направленному на клеточную мишень. Ничтожна вероятность формирования лекарственной резистентности патогенов к препаратам клеточных мишеней, которая может иметь место только при длительном хроническом применении лекарственной терапии и только для некоторых классов специфических клеточно-направленных препаратов. Клеточно-направленные средства в дополнение к ингибированию размножения вируса позволят ингибировать или блокировать ключевые факторы в патогенезе вирусной болезни, лежащие в основе её тяжелого течения, и тем самым обуславливать высокий бинарный (противовирусный и патогенетический) эффект лечения и предотвращения осложнённых форм болезни. В последние годы уже созданы первые кандидатные агенты данного типа клеточно-направленных лекарств, которые находятся на стадии клинических испытаний. К таким пилотным препаратам можно отнести антитела – антагонисты клеточного рецептора CCR5 на модели вируса ВИЧ-1 [72, 73]; циклоспорины, способные ингибировать экспорт вирусных РНК из ядра для вируса гриппа [74]; антитела против клеточного рецептора клаудина 1 и окклюдина, способные ингибировать вирус гепатита С [75, 76]; иминосакхара, нарушающие работу клеточных гликозидаз и ведущие к аномальному гликозилированию вирусных белков, показали эффективность против вирусов ВИЧ [77]; ингибиторы клеточного белка теплового шока (HSP70) демонстрировали эффективность против вирусов SARS-CoV-2, Эбола, ККГЛ [70]; ингибиторы биосинтеза клеточных нуклеозидов, как, например, ин-

³Приложение № 2 к Приказу Министерства здравоохранения Российской Федерации от 06.12.2021 № 1122н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям и порядка проведения профилактических прививок».

⁴Профилактика клещевого вирусного энцефалита. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.3.2352-08.

гибитор фермента дегидрооротатдегидрогеназы [78]; ингибиторы клеточных протеаз, участвующих в активации оболочечных вирусов, показали высокую эффективность против вирусов гриппа, коронавирусов [69, 79–81]. Разработка и усовершенствование форм доставки препаратов данного класса позволят создать надёжный резерв эффективных противовирусных лекарств широкого противовирусного спектра действия.

Парентеральные гепатиты В (Hepadnaviridae: *Orthohepadnavirus*) и С (Flaviviridae: *Hepacivirus*)

Огромный ущерб здоровью населения и экономике страны наносит заболеваемость вирусными гепатитами В и С с парентеральным путём заражения. Отечественные вирусологи внесли существенный вклад в разработку комплекса мер по диагностике, профилактике и лечению вирусных гепатитов: Виталий Александрович Ананьев (1921–2003), Ефим Александрович Пакторис (1920–1994), Елена Северьяновна Кетиладзе (1919–1991), Михаил Суменович Балаян (1933–2000), Михаил Иванович Михайлов, Евгений Иванович Самохвалов и многие другие.

Использование генно-инженерных вакцин против гепатита В, вызываемого вирусом гепатита В (Hepadnaviridae: *Orthohepadnavirus*), демонстрирует ещё один пример высокой эффективности вакцинации. По официальным данным, суммарное количество больных хроническим вирусным гепатитом В (носителей HBsAg) в РФ лежит в пределах 1–3 млн человек [82, 83]. Для лечения применяются нуклеозиды в форме трифосфата, избирательно подавляющие активность вирусной ДНК-полимеразы ламивудин. Наблюдается устойчивость вирусов к его действию. Ежегодно в мире около 100 тыс. человек умирает от молниеносных форм гепатита В, около 500 тыс. – от острой инфекции, около 700 тыс. – от цирроза печени и около 300 тыс. – от гепатоцеллюлярной карциномы. Профилактика гепатита В одновременно решает проблему сопутствующего гепатита дельта (D) [82, 84].

В июне 1996 г. был издан совместный приказ Минздрава России и Госсанэпиднадзора № 226179 «О введении профилактических прививок против гепатита В» с вводом вакцинации в календарь профилактических прививок. Предусматривалась обязательная вакцинация всех новорождённых по схеме 0–1–6 месяцев, всех подростков в возрасте 13–14 лет, всех медицинских работников. В России имеется широкий спектр генно-инженерных вакцин, как отечественных, так и зарубежных. Все они безопасны и высокоэффективны. Через 3 месяца после завершения курса вакцинации у 95–97% привитых определяются антитела в защитной концентрации (> 10 мМЕ/мл). Определённой проблемой являются эскейп-мутанты по рге-S- и S-гену, способные избегать воздействия антител [83, 85]. Вместе с тем гепатит В является вакциноуправляемой инфекцией.

Отметим, что семейство Hepadnaviridae состоит из двух родов – *Avihepadnavirus* (вирусы гепатита

В уток, журавлей) и *Orthohepadnavirus*, куда, помимо вируса гепатита В человека (HBV), входят также вирусы гепатита сурков (WHV – woodchuck hepatitis virus), берингийских сусликов (ASHV – arctic squirrel hepatitis virus), сусликов (GSHV – ground squirrel hepatitis virus), шерстистых обезьян (WMHBV – woolly monkey hepatitis B virus) [86].

Вирус парентерального гепатита С (Flaviviridae: *Hepacivirus*) относится к числу социально значимых инфекционных вирусных заболеваний. В мире вирусом заражено 150–170 млн человек, в РФ – порядка 2 млн [87]. Высокий уровень заболеваемости, склонность к формированию хронических форм с последующим циррозом и гепатокарциномой, отсутствие вакцины, генетическое разнообразие, сложность и малоэффективность лечения дорогостоящими противовирусными препаратами определяют серьёзность проблемы его изучения [82, 87–89]. Установлены по крайней мере 9 генотипов, уровень дивергенции между которыми может достигать 15–25%: 1 (1a, 1b, 1c), 2 (2a, 2b, 2k), 3 (3a, 3c, 3d, 3e, 3f), 4 (4a, 4b, 4c, 4d), 5 (5a), 6 (6a, 6b), 7 (7a, 7ab, 7cd), 8, (8a), 9 (9a) [87, 90]. В Институте вирусологии в масштабах страны проведено изучение распространения генотипов вируса гепатита С («ласковый убийца»), остановлено повсеместное доминирование наиболее патогенного генотипа 1b [91], охарактеризован неизвестный ранее генотип 2k [92].

Вирус иммунодефицита человека (Retroviridae: *Lentivirus*)

Начиная со второй половины 1980-х гг. ряд вирусологических групп немедленно включился в разработку возникшей в мире пандемии ВИЧ-инфекции: Виктор Михайлович Жданов, Отар Георгиевич Анджапаридзе (1920–1996), Вадим Валентинович Покровский, Марина Ридовна Бобкова, Леонид Викторович Урываев, Алла Григорьевна Букринская, Мансур Магомедович Гараев и многие другие исследователи. Серьёзный вклад в исследования внёс коллектив, созданный Львом Степановичем Сандахчиевым (1933–2000), организовавшим в тайге под Новосибирском крупный вирусологический центр «Вектор».

Через два года после регистрации первого случая заболевания в США в 1981 г. вирус (HIV-1, human immunodeficiency virus, Retroviridae: *Lentivirus*), изолированный нобелевским лауреатом Люком Монтанье (L. Montagnier), стал причиной пандемии, медленно, но неуклонно нарастающей в мире. По данным молекулярно-генетических исследований, первые встречи человека с вирусом в Африке относятся к 1920–1930-м гг. и происходили по меньшей мере трижды. В РФ с начала эпидемии в 1996 г. доминирует вариант подтипа А, но встречаются варианты подтипа В и других подтипов, а также рекомбинанты А/В и А/С [93, 94]. Распространённость инфицирования возросла с 2001 по 2010 г. на 50%. В РФ проводится молекулярно-генетический мониторинг циркулирующих генетических вариантов вируса, что облегчает принятие решений при выборе препаратов для лече-

ния [93]. Использование комбинаций существующих (> 30) антиретровирусных препаратов (ингибиторы проникновения, нуклеозидные и нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы, ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы, ингибиторы интегразы, протеазы) позволяет существенно продлить жизнь инфицированных [95]. Разрабатываются подходы к эрадикации и функциональному лечению (трансплантация стволовых клеток, генная терапия и др.). ВИЧ-инфекция – ещё один пример развития пандемии в результате трансмиссии вируса от животных к человеку. Дымчатые мангобеи и другие виды обезьян, за исключением шимпанзе, переносят инфекцию без клинических явлений иммунодефицита и служат природным резервуаром данной группы ретровирусов.

Вирусные болезни домашних животных

Огромны достижения отечественных вирусологов в изучении вирусных болезней домашних животных (Василий Николаевич Сюрин, Михаил Иванович Гулюкин, Тарас Иванович Алипер, Алексей Дмитриевич Забережный, Алексей Михайлович Гулюкин и многие другие). Особенно актуальна проблема африканской чумы свиней [96, 97], пестивирусов [98] и других вирусов (более 150), имеющих ветеринарное значение. Помимо африканской (АЧС, *Asfarviridae: Asfivirus*) и классической (КЧС, *Flaviviridae: Pestivirus*) чумы свиней, существенное значение в патологии свиней имеют вирусные гастроэнтериты, вызываемые коронавирусами (*Coronaviridae*), реовирусами (*Reoviridae*) и др. (всего более 20). Наиболее опасными заболеваниями для крупного рогатого скота являются ящур (этиологический агент принадлежит семейству *Picornaviridae*), болезнь синего языка (возбудитель – реовирус), чума КРС (*Paramyxoviridae*), эпизоотический лейкоз (*Retroviridae*), ринотрахеит (*Herpesviridae*), диарея КРС (*Flaviviridae*) – всего более 10. Для лошадей наиболее значимы африканская чума лошадей (*Reoviridae*), восточный и западные энцефалиты (*Togaviridae*), инфекционная анемия (*Retroviridae*), артериит (*Arteriviridae*), ринопневмония (*Herpesviridae*) – всего более 24. Для собак и кошек опасны чума плотоядных (*Paramyxoviridae*) и др. – всего более 12. Домашних птиц поражают более 25 вирусов из 12 семейств. Рыбы в аквакультуре подвержены инфицированию вирусами по крайней мере трёх различных семейств (*Birnaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae*). Для пчёл известны шесть патогенных вирусов из семейств *Iflaviridae* и *Dicistroviridae*.

Вирусы гриппа и ОРВИ

В СССР в 1930–1940-х гг. XX в. были широко развернуты исследования по вирусам гриппа, включая вирусы гриппа А (*Orthomyxoviridae: Alphainfluenzavirus: Alphainfluenzavirus influenzae*; субтипы А(Н1N1), А(Н1N1pdm09), А(Н3N2)) и В (*Orthomyxoviridae: Betainfluenzavirus: Betainfluenzavirus influenzae*). К комплексу вирусов – возбудителей острых респираторных заболеваний относятся и многие другие РНК-содержащие вирусы: коронавирусы (*Coronaviridae:*

Alphacoronavirus), парамиксовирусы (*Paramyxoviridae: Orthorubulavirus* – вирусы парагриппа 2-го и 4-го типов; *Respirovirus* – вирусы парагриппа 1-го и 3-го типов; *Orthopneumovirus* – респираторно-синцитиальный вирус человека; *Metapneumovirus* – метапневмовирус человека), ряд риновирусов (*Picornaviridae: Enterovirus*; более 152 серотипов) и др. К ним также относится ряд ДНК-содержащих вирусов: боксавирусы (*Parvoviridae: Bocaparvovirus*), аденовирусы (*Adenoviridae: Mastadenovirus*; семь видов, включающие 54 серотипа: HAdV-A (12, 18, 31), HAdV-B (37, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50), HAdV-C (1, 2, 5, 6), HAdV-D (8-10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54), HAdV-E (4), HAdV-A (40, 41), HAdV-G (52)). Таким образом, сезонный комплекс возбудителей острых респираторных заболеваний (ОРВИ) включает десятки одновременно циркулирующих вирусов (более 200 генетических групп из 6 семейств и 10 родов), с трудом различающихся по клинической картине. Их дифференциация возможна лишь при лабораторной диагностике, прежде всего с помощью ОТ-ПЦР (полимеразная цепная реакция обратной транскрипции). В 2019 г. ВОЗ выступила с инициативой глобальной стратегии по борьбе с гриппом в период 2019–2030 гг., направленной на усиление эпидемиологического надзора и подготовку к будущей пандемии. В частности, важная роль отводится исследованиям по изучению особенностей циркуляции вирусов гриппа и их свойств, механизмов изменчивости и восприимчивости, минимизации рисков развития тяжёлых форм, разработке новых диагностических тест-систем и лекарственных препаратов. В РФ эти задачи реализуются системами опорных баз по стране, курируемых Институтом гриппа Минздрава России в Санкт-Петербурге и Центром экологии и эпидемиологии гриппа (ЦЭЭГ) Института вирусологии имени Д.И. Иванова ФГБУ «НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России с опорными базами территориальных управлений и центрами гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора в европейской части, на Урале, в Сибири и на Дальнем Востоке.

Существенный вклад в изучение фундаментальных свойств вирусов гриппа и других ОРВИ, разработку методов диагностики и профилактики внесли многие отечественные ученые: В.М. Жданов, В.Д. Смородинцев, В.Д. Соловьев, А.С. Горбунова, Л.Я. Закстельская, Р.С. Дрейзин, в последние годы Н.В. Каверин, Г.А. Галегов, Ф.И. Ершов, О.И. Киселев, С.С. Ямникова, М.Ю. Щелканов, Л.В. Колобухина, Е.И. Бурцева и многие другие [99–104].

Семейство *Orthomyxoviridae* включает шесть родов, три из которых – А, В и С – передаются респираторным путём и вызывают ежегодные сезонные эпидемические вспышки среди людей. Вирусы родов *Thogotovirus* и *Quarantavirus*, представителей которых мы выделили на территории РФ, передаются восприимчивым позвоночным животным и человеку через укусы иксодовых и аргасовых клещей. Вирусы рода *Isavirus* вызывают болезни рыб.

Особую опасность представляют вирусы гриппа А. Они широко распространены в биосфере, особенно среди птиц (18 известных субтипов), а по последним данным – в океанском планктоне. Таким образом, грипп А является зооантропонозом с убиквитарным распространением. На протяжении миллионов лет, возможно, с мелового периода мезозойской эры, шло формирование популяционного генофонда этих вирусов в результате межпопуляционных взаимодействий вирусов и птиц [17]. Сегментированный геном создаёт условия для рекомбинации генов в случае одно-временной репликации двух и более вирусов в одном организме. Возникающие реассортанты, обеспечивая высокую степень изменчивости, могут иметь различные биологические и антигенные свойства, что обеспечивает в случае включения в популяционный генофонд оптимальные условия для процветания популяции и возникновения панзоотий и пандемий [17].

Природные очаги вирусов гриппа А широко распространены и в настоящее время, в том числе на территории РФ. Обследование нами территории Северной Евразии выявило циркуляцию среди птиц 15 из 18 известных вирусов гриппа А, в том числе субтипа H5, с которым связана возникшая в 2003 г. тяжелейшая панзоотия среди домашних птиц [105]. Погибли и были уничтожены сотни миллионов птиц. Заражались и гибли люди. В апреле 2005 г. во время весенней миграции вдоль Джунгарского миграционного русла вирус проник в Казахстан и Западную Сибирь с возникновением эпизоотий среди домашних птиц на обширной территории РФ, а затем и других стран. В апреле 2008 г. другой генетический кластер вируса проник с мигрирующими птицами на территорию Приморского края, распространившись далее на север. Таким образом, в Северной Евразии циркулируют два генетических кластера вируса гриппа А(H5N1). Смертность людей от вируса А(H5N1) достигает 53% [106]. В мире выявлено 864 случая среди людей в 18 странах Юго-Восточной Азии, Египте. Вирус продолжает циркулировать в природных биоценозах на территории РФ. С 2014 г. по настоящее время выявлено 79 случаев среди людей, заразившихся вирусом гриппа птиц А(H5N6), со смертностью 43% [106]. С 2013 г. по настоящее время выявлено 1568 случаев (летальность 39%) заболевания людей вирусом гриппа птиц А(H7N9). Вирус возник в результате реассортации вирусов гриппа птиц. Он был занесён на территорию РФ дикими птицами в период весенней миграции с формированием природных очагов инфекции. Затем во время осенней миграции вирус был занесён из азиатской тундры на тихоокеанское побережье Америки, а впоследствии по миграционным руслам за 2–3 года проник в центральную и восточную часть континента. С 2015 г. по настоящее время выявлено 74 случая с летальностью 2,7% заболевания людей, заразившихся вирусами гриппа птиц А(H3N8) и А(H7N4), протекавшие без летальных исходов. Заражение людей вирусами гриппа птиц происходило в результате тесного контакта с больными птицами. Трансмиссии вируса гриппа птиц от человека к че-

ловеку не установлено, однако такую возможность в будущем нельзя исключить. Необходимо заблаговременное изготовление кандидатов в вакцинные штаммы для использования при будущих гриппозных пандемиях. К настоящему времени биоинженеры уже сконструировали порядка 20 вакцинных штаммов ко всем известным генетическим клэйдам вируса H5 и другим зоонозным вирусам гриппа [107]. Наличие этих штаммов не предотвратит катастрофу, но минимизирует последствия.

Среди диких птиц обычно циркулируют низковирулентные штаммы. Но после проникновения в популяции домашних птиц эти штаммы трансформируются в высоковирулентные, в частности, за счёт замены в позиции 627 белка PB2 глутамина на лизин [108].

Аминокислотные остатки, определяющие рецептор-связывающий сайт (PСС), различны для рецепторов человеческого, свиного и птичьего типов. Клеточный рецептор для вирусов гриппа А представлен двумя основными типами ковалентной связи терминального остатка нейраминовой кислоты со следующим моносахаридом в составе сиалогликанов: α -2,6 для PСС гемагглютинина (HA) эпидемических штаммов и α -2,3 для PСС HA штаммов вирусов птиц [100, 109].

Ежегодные эпидемии гриппа уносят 200–500 тыс. жизней. Переболевает от 5 до 10% населения при летальности 0,01–0,02%. А в периоды появления нового пандемического варианта гибнут миллионы. В пандемию испанки в 1918–1919 гг. вирус А(H1N1) уничтожил до 100 млн человек при летальности около 0,5%. Все вирусы гриппа А млекопитающих произошли от птиц. В обозримом будущем вполне вероятно возникновение новых пандемических вариантов. Необходим дальнейший генетический мониторинг в мире за циркуляцией вируса гриппа.

С самого начала распространения нового пандемического вируса А(H1N1pdm09), являющегося рекомбинантом вируса человека, птиц и свиней, он обладал смешанным типом α -2,6- и α -2,3-специфичности и более высокой вирулентностью в сравнении с сезонным гриппом А(H1N1) [110]. Вскоре после развития пандемии в РФ в 2009 г. нами были изолированы штаммы от летальных случаев с первичной вирусной пневмонией с аминокислотными заменами в рецептор-связывающем сайте гемагглютинина HA1 аспарагиновой кислоты (D) на глицин (G) или аспарагин (N), что привело к замене рецепторной специфичности к эпителиальным клеткам респираторного тракта на α -2,3 и проникновению вируса в нижние отделы респираторного тракта – альвеолы и бронхиолы с быстрым развитием летальной пневмонии [110, 111]. Схожие данные получены за рубежом [112–114]. Передача таких мутантов от человека к человеку пока не установлена. Среди пациентов, у которых были выявлены мутанты, летальность достигала 60% [101]. Дальнейшие экспериментальные исследования на хорьках показали возможность такого рода развития событий, что может иметь катастрофические последствия по числу жертв и экономическому ущербу

[115, 116]. Как видно из изложенного, грипп должен быть отнесён к зооантропонозам.

Важнейшим направлением в борьбе с гриппом является синтез противовирусных препаратов – процесс длительный (до двух десятков лет) и дорогой (миллиарды долларов). Весьма перспективен, в частности, балоксавир (Baloxavir Marboxil), разработанный к 2018 г. фирмой Roche, блокирующий на ранней стадии репликацию вируса за счёт ингибирования эндонуклеазы полимеразного комплекса [117]. Препарат нужен в качестве резерва. Широко применяемый в 1966–2010 гг. ремантадин (ингибитор функций белка M2, формирующего в клеточной мембране вирус-специфические ионные каналы), синтезированный отечественными специалистами (Г.А. Галегов, С.А. Гиллер, Я.Ю. Полис, М.Ю. Лидак, М.К. Индулен, А.А. Смородинцев, В.И. Ильенко и др.) вышел из строя, поскольку вирусная популяция приобрела к нему резистентность за счёт аминокислотных замен в белке M2 – S31N, а также A30V и V27A. Проводятся исследования по преодолению возможности резистентности к препаратам – производным адамантана [118]. В настоящее время для раннего лечения гриппа используются внедрённый в 1999 г. ингибитор нейраминидазы, связанной с фиксацией вирусов на клеточной поверхности, осельтамивир (Тамифлю), занамивир (Реленза) и перамивир. К этим препаратам также в единичных случаях обнаруживается резистентность за счёт аминокислотных замен H274Y к осельтамивиру и Q136K – к занамивиру. Проводится постоянный молекулярно-генетический мониторинг появления резистентности [111, 119].

С начала 2000-х гг. зарегистрированы три независимых случая появления новых зооантропонозных коронавирусов (Coronaviridae: *Betacoronavirus*) человека, обладающих эпидемическим и пандемическим потенциалом [120, 121]. Первая эпидемическая вспышка инфекции тяжёлого острого респираторного синдрома (ТОРС, SARS), вызванная новым коронавирусом SARS-CoV (подрод *Sarbecovirus*), началась в КНР осенью 2002 г. [122]. За два года зарегистрировано более 8000 случаев с 774 летальными исходами (летальность 4–11%). Второй случай появления нового патогенного коронавируса человека связан с эпидемической вспышкой ближневосточного респираторного синдрома (MERS), зарегистрированного осенью 2012 г. в Саудовской Аравии. Вирус, вызвавший вспышку ТОРС (MERS-CoV), относится к подроду *Merbecovirus* [123]. К 2020 г. завозные спорадические случаи и эпидемические вспышки, затрагивающие до нескольких десятков человек, зарегистрированы в 27 странах. Всего зарегистрировано более 2,5 тыс. случаев заболевания и около 900 смертей. В основном заражение человека ТОРС (MERS-CoV) происходит от верблюдов, которые являются промежуточными хозяевами для вируса [123]. Третья вспышка, вызванная вирусом SARS-CoV-2, быстро переросшая в пандемию, возникла в декабре 2019 г. в г. Ухань, провинция Хубей, КНР [124]. К 1 сентября 2022 г. в мире, по данным ВОЗ, зарегистрировано 600 366 479 слу-

чаев SARS-CoV-2 с 6 460 493 летальными исходами (общая летальность 1,1%). В России соответственно 19 771 113 и 384 787 случаев (общая летальность 1,9%).

Появление вируса SARS-CoV-2 и вызванная им пандемия продемонстрировали необходимость контроля зоонозных вирусов в природных резервуарах до преодоления ими межвидового (межтаксонного) барьера и выплеска в человеческую популяцию. Основным природным резервуаром SARS-подобных коронавирусов являются подковоносые летучие мыши (*Rhinolophus* spp.), широко распространённые в Азии, Европе и Северной Африке. Ареал подковоносов захватывает и южные регионы России, включая Северный Кавказ и Крым [125]. В Юго-Восточной Азии (в частности, в Китае) SARS-подобные вирусы были обнаружены у 23 различных видов подковоносов [126]. Наиболее близкие к SARS-CoV-2 вирусы летучих мышей были найдены у некоторых видов подковоносов в китайской провинции Юньнань, а также в Таиланде и Лаосе [127–130]. В результате масштабных исследований в России также были найдены два новых вида SARS-подобных коронавирусов, названные Хоста-1 (по первому обнаружению в пещере Хоста 1) и Хоста-2, циркулирующие в популяциях подковоносов на северном побережье Чёрного моря (субтропическая зона Краснодарского края) [131]. Хоста-1 и Хоста-2 формируют отдельную филогенетическую ветвь (вместе с вирусами, ранее найденным в Болгарии (штамм BtCoV/BM48-31/2008) и Кении (штамм Bt-KY72)). С вирусами SARS-CoV и SARS-CoV-2 Хоста-1 и Хоста-2 имеют схожесть от 60 до 96% по разным белкам [131].

Тропизм коронавируса к клеткам тканей животных, которых они могут инфицировать, определяется поверхностным гликопротеидом S, который несёт специальный рецептор-связывающий домен (RBD) [132]. SARS-CoV и SARS-CoV-2 в качестве клеточного рецептора используют ангиотензин-конвертирующий фермент 2 (ACE2) [133]. Большинство известных вирусов летучих мышей не способны связывать ACE2 человека или других животных, и их рецептор остаётся неизвестным [134]. Однако некоторые азиатские штаммы вирусов летучих мышей, несмотря на значительные отличия в последовательности RBD от SARS-CoV-2, способны связывать ACE2-рецептор и использовать его для проникновения в клетку [128, 135–138]. В Лаосе были обнаружены штаммы, обладающие практически идентичной SARS-CoV-2 последовательностью RBD, один из которых (BANAL-52) имеет только две аминокислотные замены и связывает ACE2-рецептор человека практически с той же эффективностью, что и SARS-CoV-2 [130]. Структура рецептор-связывающего мотива белка S вирусов Хоста-1 и Хоста-2 имеет сходство с вирусами SARS-CoV и SARS-CoV-2. Эксперименты *in vitro* продемонстрировали способность вирусов Хоста-1 и Хоста-2 связывать и использовать для проникновения в клетку ACE2-рецептор летучих мышей; вирус Хоста-2 также эффективно связывает ACE2-рецептор

человека. Полученные результаты в сочетании с данными для других SARS-подобных вирусов летучих мышей свидетельствуют о том, что способность связывать ACE2-рецептор человека появляется в природном резервуаре в разных генетических линиях естественным путём и является древним эволюционным свойством данной группы коронавирусов. Эволюционные процессы (антигенный дрейф, рекомбинации и геномные перестройки), приводящие к формированию новых, потенциально патогенных вариантов коронавирусов, активно происходят во всех частях их ареала.

Важным открытием последних лет можно считать обнаружение в геноме вирусов гриппа и коронавирусов дополнительных протяжённых открытых рамок трансляции – так называемых амбиполярных генов [139–142]. Это новый тип вирусных генов, которые имеют все функциональные элементы, характерные для экспрессии данных генетических рамок как трансляционных генов [139, 142, 143]: стартовые AUG (или альтернативный CUG-кодон), трансляционные стоп-кодона [144], канонические последовательности Козака (Kozak element [145]), присутствие в начале гена типичных по вторичной структуре сайтов посадки рибосом (IRES – internal ribosome entry site [146]). Отличительной особенностью обнаруженных генов служит их амбиполярная локализация в геноме вируса: позитивно-полярная в вирусе гриппа (имеющего негативно-полярный геном) [147] и негативно-полярная у коронавирусов (имеющих, как известно, позитивно-полярный геном) [142, 148, 149]. Продукты трансляции данных генов в инфицированных клетках пока не идентифицированы, но имеются данные о формировании иммунного клеточного ответа к белковым продуктам амбиполярных генов или к их специфическим доменам в организме, инфицированном вирусом гриппа, что указывает на экспрессию данных генов в жизненном цикле вирусов в макроорганизме [150–152]. В случае доказательства экспрессии белков – продуктов амбиполярных генов в вирусном инфекционном процессе встанет вопрос об изменении классификации семейств ортомиксо- и коронавирусов и их (или их отдельных родов) отнесения к вирусным семействам с амбиполярной стратегией генома [142]. В настоящее время к таким амбиполярным вирусам отнесены 4 рода: флебо-, тоспо-, арена- и буньявирусы [153].

Арбовирусы

Исключительный вклад в развитие вирусологии внесли исследования арбовирусов. Арбовирусы – экологическая группа зоонозных вирусов, передающихся путём биологической трансмиссии восприимчивым позвоночным кровососущими членистоногими переносчиками – иксодовыми (Ixodidae, 6 подсемейств и 14 родов) и аргасовыми (Argasidae, 5 родов) клещами и насекомыми: комарами (Diptera, Culicidae), москитами (Psychodidae: *Phlebotomus*), мокрецами (Diptera, Heleidae).

Первые исследования по арбовирусам проведены в конце XIX в., когда кубинский энтомолог С. Finlay

и сотрудники американской военной миссии во главе с W. Reed доказали вирусную природу и трансмиссивную передачу комарами *Aedes aegypti* вируса жёлтой лихорадки [10]. Термин arthropod-borne (передаваемые членистоногими) введён в 1942 г. В 1963 г. международный подкомитет по вирусной номенклатуре ввёл термин arbovirus. Известны более 500 арбовирусов, более 100 из них способны вызывать заболевания людей и животных, в том числе протекающие с высокой летальностью: эпидемические вспышки геморрагических лихорадок и энцефалитов. В ряде случаев внезапно возникающие эпидемии арбовирусов влияли на ход военных действий.

Начало исследований арбовирусов в Советском Союзе относится к началу 1930-х гг., когда военный врач-невропатолог А. Панов вместе с коллегами А. Шаповалом и Д. Красновым описали на Дальнем Востоке сезонный эпидемический энцефалит с высокой летальностью. Они обозначили заболевание как «весенне-летний энцефалит» и предположили, что он вызван неизвестным вирусом. Ими было отмечено некоторое сходство инфекции с «осенне-летними энцефалитами» (японский энцефалит (ЯЭ) и энцефалит Сент-Луис), известными в то время, а также высказано предположение, что это может быть токсическая форма гриппа [154]. Однако этиология заболевания и пути его передачи оставались неизвестными. Для изучения этой новой инфекции Наркомздравом СССР в 1937–1940 гг. была организована серия экспедиций. Экспедиции включали специалистов из разных научных организаций: вирусологов (Л. Зильбер, А. Смородинцев, М. Чумаков, Е. Левкович, А. Шеболдаева, А. Шубладзе), бактериологов (В. Соловьев, Н. Рыжков), паразитологов (Е. Павловский, А. Гуцевич, Б. Померанцев, А. Мончадский, А. Скрынник), клиницистов (А. Панов, А. Шаповал, З. Финкель) и др. В течение лета 1937 г. членами экспедиции из крови, цереброспинальной жидкости и секционного материала были изолированы около 30 штаммов нового вируса [155]. Несколько штаммов также были изолированы от клещей *Ixodes persulcatus*, и их способность передавать вирус при укусе была показана экспериментально. Один из выделенных штаммов (Софьин) использовался для экспериментального заражения макак, у которых развились клинические симптомы энцефалита, схожие с наблюдаемыми у людей [156–159]. Таким образом, этиологический агент весенне-летнего энцефалита, который теперь известен как КЭ, был выделен и изучен. Вирус КЭ (ВКЭ) стал первым арбовирусом, открытым советскими вирусологами. Различные аспекты экологии, эпидемиологии и патогенеза ВКЭ интенсивно изучались в последующие годы. Разработана первая вакцина против КЭ на основе препарата мозговых тканей мышей, инфицированных штаммом Софьин. Дальнейшие исследования показали, что ВКЭ также распространён в европейской части СССР и европейских странах, где его основным переносчиком является клещ *I. ricinus*. По современной классификации ВКЭ принадлежит виду *Tick-borne encephalitis virus* (Flaviviridae: *Flavivi-*

rus). Во время экспедиций несколько штаммов вируса ЯЭ, также принадлежащего роду *Flavivirus*, но передающегося комарами, были выделены от пациентов на Дальнем Востоке в 1938 г. во время хасанских событий. Это было первое доказательство циркуляции вируса ЯЭ на территории СССР [160, 161]. Однако после вспышки 1938 г. случаев ЯЭ на территории СССР в последующие годы не было зарегистрировано.

Открытие ВКЭ как этиологического агента весенне-летнего энцефалита дало мощный толчок для изучения схожих инфекций на всей территории СССР. В последующие годы несколько крупных вирусологических центров были организованы в составе АМН СССР: Институт вирусологии (1944), Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов (1950), а также вирусологические лаборатории на базе медицинских институтов и противочумных станций. Учёные из этих центров приняли активное участие в изучении различных аспектов арбовирусов, распространённых на территории страны. Интенсивные исследования по различным направлениям проблемы КЭ продолжались в настоящее время [162].

Многие участники первых экспедиции стали впоследствии известными вирусологами и основали собственные вирусологические школы. Наиболее выдающимся из них является Михаил Петрович Чумаков, который позднее возглавил Институт вирусологии АМН СССР (1950–1954), а затем созданный по его инициативе Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР (1955–1972). М.П. Чумаков организовал многочисленные экспедиции, направленные на поиск этиологических агентов и изучение природно-очаговых (преимущественно арбовирусных) инфекций. Из впервые описанных им арбовирусов особо важное значение имеют возбудители клещевых геморрагических лихорадок – ОГЛ и ККГЛ.

В начале 1940-х гг. в нескольких сельских регионах Омской области (Юго-Западная Сибирь) была зарегистрирована вспышка заболевания, которую местные врачи обозначали как «атипичная туляремия», «безжелтушный лептоспироз», «омская весенне-летняя лихорадка». Вирусная этиология болезни, названной омской геморрагической лихорадкой (ОГЛ), была установлена в результате работы группы специалистов из Омского медицинского института и вирусологов в составе комплексной экспедиции под руководством М.П. Чумакова в 1947 г. [163]. Из крови больных ими были выделены более 40 штаммов вируса, названного вирусом ОГЛ (ВОГЛ). Несколько штаммов также были изолированы из клещей *D. reticulatus*, собранных в эндемичных районах [164]. Экология, эпидемиология и патогенез ВОГЛ были подробно изучены в последующие годы. По современной классификации ВОГЛ принадлежит виду *Omsk hemorrhagic fever virus* рода *Flavivirus* (Flaviviridae) и входит в антигенный комплекс ВКЭ.

В июне 1944 г. в сельских районах севера Крымского полуострова возникла вспышка лихорадочного заболевания, сопровождаемого геморрагическими проявлениями (острый инфекционный капиллярный токсико-

коз). В общей сложности было зарегистрировано более 200 случаев. Этиология заболевания, названного крымской геморрагической лихорадкой (КГЛ), была установлена в результате работы экспедиции под руководством М.П. Чумакова. Было предположено, что инфекция передается клещами *Hyalomma marginatum* (ранее *H. plumbeum*), которые широко распространены и очень многочисленны в регионе, где произошла вспышка. Вирусная этиология и зоонозный характер инфекции были выявлены при заражении волонтеров кровью больных и суспензией клещей *H. marginatum*, собранных с зайцев. Заражающий материал предварительно фильтровали через мелкопористый фарфоровый фильтр. Первые штаммы вируса ККГЛ были изолированы от пациента в Узбекистане (штамм Ходжа) и из сыворотки пациента и от нимфы *H. marginatum* в Астраханской области (штамм Дроздов) сотрудниками Института полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР (А. Бутенко) в 1963–1967 гг. [165, 166]. Позднее было показано, что вирус КГЛ идентичен вирусу Конго, изолированному от больных с геморрагической лихорадкой в Заире (Конго, Африка), и он получил своё современное название – ККГЛ [167]. В последующие годы различные аспекты экологии, эпидемиологии, патогенеза и клиники ККГЛ подробно изучались на базе Института вирусологии АМН СССР, Института полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР, Государственного исследовательского центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Новосибирск) и в других научных центрах СССР [15]. Вирус ККГЛ является одним из типовых видов наировирусов и относится к виду *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus* рода *Orthonairovirus* семейства *Nairoviridae*. Специфического лечения ККГЛ не разработано, хотя есть свидетельства о некоторой эффективности рибавирина [168].

В течение весны и лета 1962 г. М. Чумаков вместе с Е. Либковой из Института вирусологии в Братиславе (Словакия, бывш. Чехословакия) исследовали вспышку лихорадочного заболевания (кемеровская лихорадка) в Кемеровской области (Западная Сибирь). Новый вирус, названный вирусом Кемерово, был изолирован из крови пациентов и клещей *I. persulcatus*, собранных в районе, где возникла вспышка [169, 170]. Антигенно схожие с вирусом Кемерово вирусы Трибеч и Липовник были позднее изолированы от клещей *I. ricinus* в Чехословакии [171, 172]. На основе морфологии вириона вирусы были отнесены к роду *Orbivirus* семейства *Reoviridae*.

В период 1930–1969 гг. арбовирусы изучались в основном как этиологические агенты новых инфекций человека. Обследование членистоногих переносчиков и позвоночных хозяев в природных очагах важных инфекций человека часто приводило к изоляции других арбовирусов. Так, А. Бутенко (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР) впервые в СССР изолировал штаммы вируса Западного Нила (ВЗН) (Flaviviridae: *Flavivirus*) и вируса Дхори (Orthomyxoviridae: *Thogotovirus*) от клещей *Hyalomma marginatum* во время обследования природных оча-

гов ККГЛ в Астраханской области в 1964 г. В общей сложности к концу 1960-х гг. семь арбовирусов были открыты или описаны на территории СССР: вирусы КЭ и ЯЭ, ККГЛ и ОГЛ, ВЗН, Дхори и Кемерово. В это же время начал формироваться системный экологический подход, основанный на концепции популяционных взаимодействий между видами вирусов, членистоногих переносчиков и позвоночных хозяев и окружающей средой. Перед вирусологами государством была поставлена задача создания системы исследований по природным очагам возбудителей зоонозных, в том числе арбовирусных инфекций.

Наиболее важными позвоночными животными – природными резервуарами для арбовирусов являются птицы (Aves), грызуны (Rodentia) и летучие мыши (Chiroptera). Более 200 известных арбовирусов экологически связаны с птицами. В некоторых случаях птицы являются основным позвоночным хозяином, а в некоторых служат для вируса эффективным амплификатором. Роль птиц в циркуляции арбовирусов определяется несколькими факторами, прежде всего высокой численностью и плотностью популяций в местах гнездований (для птиц водного и околоводного комплекса), отдыха и зимовок; сезонными миграциями с трансконтинентальным переносом вирусов и переносчиков (клещей), гнездованием в норах [173]. Исходя из этого, для углублённого изучения зоонозных вирусов, связанных с птицами, в СССР были организованы Всесоюзный орнитологический комитет с координационным советом по миграции птиц и медицинской орнитологии и Всесоюзный центр экологии вирусов и противозидемической защиты граждан и армии. Всесоюзный орнитологический комитет располагался на базах Института биологии биологического отделения АН СССР (руководитель В.Д. Ильичев) и Института вирусологии АМН СССР (руководитель Д.К. Львов). Всероссийский центр экологии вирусов был основан на базе Института вирусологии имени Д.И. Ивановского АМН СССР с широкой сетью опорных баз во всех регионах СССР⁵. Эти две структуры разработали объединённую программу исследований и дважды в год проводили конференции с обсуждением планов и полученных результатов. Такая организация в некоторых чертах и подходах была схожа с американской системой Epidemic Intelligence Service Центра по борьбе с инфекционными заболеваниями CDC [174, 175].

Была разработана теоретическая база проведения мониторинга в различных экосистемах с использованием методов молекулярной экологии. Методологический подход предусматривал меридиональное зондирование территории СССР и некоторых сопредельных стран со сбором полевых материалов с последующим комплексным лабораторным обследо-

ванием. Таким образом, была обследована территория Северной Евразии площадью более 15 млн км². Зонды проходили через ландшафтные пояса Арктики, Субарктики (тундры), тайги, лиственных лесов, степей и пустынь в пределах 18 физико-географических стран с уникальными экосистемами. Изолированы и изучены сотни штаммов вирусов, в том числе и ранее неизвестных видов. Выявлена этиологическая роль выделенных вирусов в патологии человека, описаны неизвестные ранее инфекции, определена потенциальная опасность возникновения эпидемических ситуаций в различных ландшафтных поясах СССР, сделан прогноз ареала некоторых видов вновь открытых инфекций в мире.

Территориальные опорные базы, расположенные практически во всех регионах СССР, возглавили энергичные профессионалы, в короткие сроки сформировавшие научные коллективы специалистов: вирусологов, зоологов, арахноэнтомологов, способных проводить комплексные полевые и лабораторные исследования. Почти все руководители в процессе работы защитили докторские, а остальные специалисты – кандидатские диссертации: И. Виноград (Львов, Украина), И. Воинов (Минск, Беларусь), П. Скоферца (Кишинев, Молдавия), Ф. Карась (Бишкек, Киргизстан), Т. Пак, М. Костюков (Душанбе, Таджикистан), С. Каримов (Алма-Ата, Казахстан), Н. Мирзоева (Баку, Азербайджан), В. Закарян (Ереван, Армения), М. Курбанов (Ашхабад, Туркменистан), А. Мелиев (Ташкент, Узбекистан), В. Злобин (Иркутск), Ф. Бусыгин (Омск), Г. Леонова (Владивосток), А. Тимофеева (Южно-Сахалинск) и др.

Таким образом, в СССР проводились исследования по выявлению биологического фона, подобного радиационному. Это были перманентные манёвры по прогнозу и снижению последствий чрезвычайных эпидемических ситуаций природного и искусственного происхождения. Системные исследования зоонозных вирусов в соответствии с разработанной программой начались в 1969 г. В 1984 г. программа приобрела статус государственной в рамках работы учрежденного Всероссийского центра по экологии вирусов и особо опасных и слабоизученных инфекций на базе Института вирусологии имени Д.И. Ивановского АМН СССР (руководитель Д.К. Львов) [176]. Основной целью программы были исследование разнообразия и распространения зоонозных вирусов и выявление угроз, которые они представляют для биобезопасности государства в качестве возбудителей новых и возвращающихся инфекций. Программа включала изучение их экологии и эволюционных процессов, протекающих в природных резервуарах. Экспедиции проводились сотрудниками Всесоюзного центра экологии вирусов совместно с локальными организациями и опорными базами. Отдельная часть программы была посвящена арбовирусам, циркулирующим в высоких широтах Северной Евразии [177, 178]. Также необходимо отметить подпрограмму по изучению экологии вирусов гриппа в природных биотомах, включая субтипы А(Н5N1) и А(Н1N1pdm09) [161].

⁵Организация эколого-эпидемиологического мониторинга территорий Российской Федерации с целью противозидемической защиты населения и войск: методические рекомендации. М.: МЗ РФ, Федеральное управление медико-биологических и экстремальных проблем, НИИ вирусологии, 1993.

В результате этой масштабной работы были изолированы повсеместно распространённые в ландшафтных зонах тундры, тайги и лиственных лесов штаммы вирусов, переносимых комарами, включая вирусы группы калифорнийского энцефалита (вид *California encephalitis orthobunyavirus*) и группы вируса Батаи (вид *Bunyamwera orthobunyavirus*) рода *Orthobunyavirus*, семейства *Peribunyaviridae* [179]. Вирусы калифорнийского энцефалита связаны с летними случаями менингита и менинго-энцефалита. Впервые была показана и изучена циркуляция и значение в патологии человека и животных на территории СССР, Финляндии и Швеции вируса Синдбис (*Sindbis virus, SINV*) – возбудителя карельской лихорадки и вируса Гета (*Getah virus, GETV*) рода *Alphavirus*, семейства *Togaviridae* [180].

Одним из важнейших объектов исследований в рамках эколого-вирусологических исследований в Заполярье являлась система «клещи *Ixodes (Ceratices) uriae* – колониальные морские птицы». В 1969–1974 гг. сотни штаммов были изолированы от клещей *Ix. uriae*, собранных в колониях морских птиц на побережьях Охотского, Берингова и Баренцева морей. С 1 м² поверхности гнездовья удавалось собрать до 7 тыс. клещей (все фазы метаморфоза – личинки, нимфы, имаго), из которых выделяли до 100 штаммов семи различных вирусов. Установлено циркумпольное распространение природных очагов в Северном и Южном полушариях. Изолированные штаммы были классифицированы в основном как новые для науки буньявирусы, флавивирусы и орбивирусы, часто только на основе морфологии вириона, поскольку их антигенные связи с другими вирусами в то время не были выявлены. Среди них впервые открытые буньявирусы Сахалин (*Sakhalin virus, SAKHV*) и Парамушир (*Paramushir virus, PRV*), которые позднее сформировали вид *Sakhalin orthonairovirus* рода *Orthonairovirus*, семейства *Nairoviridae* [181]. Несколько новых вирусов (Залив Терпения, Командоры, Рукутама) были описаны и позднее отнесены к виду *Uukuniemi phlebovirus* рода *Phlebovirus*, семейства *Phenuiviridae* [182].

Новый флавивирус Тюлений (*Tyuleniy virus, TYUV*) и близкий к нему вирус Кама из Татарстана были впервые изолированы и позднее стали типовыми представителями группы клещевых флавивирусов морских птиц (род *Flavivirus*, семейство *Flaviviridae*) [183]. Распространение и экологические особенности вирусов Охотский (*Okhotsky virus, OKHV*) и Анива (*Aniva virus, ANIV*), двух впервые описанных вирусов вида *Great Island virus* (род *Orbivirus*, семейство *Reoviridae*) были изучены в деталях [184].

Множество новых вирусов были открыты при исследовании территории Центральной Азии и Закавказья. Впервые описан вирус Иссык-Куль (*Issyk-Kul virus, ISKV*), этиологический агент лихорадки Иссык-Куль, ассоциированный с летучими мышами (*Vespertilionidae*) и их аргасовыми клещами [185]. Заболевание лихорадкой Иссык-Куль протекает с тяжёлыми клиническими явлениями и последующим двухмесячным периодом реконвалесценции. Новые

вирусы Тамды (*Tamdy virus, TAMV*) и Бурана (*Burana virus, BURV*), вызывающие спорадические случаи лихорадки, были изолированы от клещей *Hyalomma* spp., собранных на козах и коровах в пустынных биоценозах [186]. Несколько новых вирусов (Арташат, Чим, Герань) были впервые изолированы от аргасовых клещей, собранных в норах грызунов. Морфологические исследования отнесли их к неклассифицированным буньявирусам. В недавних работах перечисленные вирусы классифицированы как разные виды рода *Orthonairovirus* семейства *Nairoviridae* [187]. Впервые изолированный из аргасовых клещей вирус Карши (*Karshi virus, KARV*), родственный вирусу Ройял-Фарм (Афганистан), относится к комплексу КЭ и вызывает спорадические случаи лихорадочного заболевания у людей. В Средней Азии был впервые изолирован новый флавивирус Сокулук (*Sokuluk virus, SOKV*), экологически связанный с летучими мышами *Vespertilio pipistrellus* и родственный вирусу летучих мышей Ентеббе из Африки [188]. В Киргизии из аргасовых клещей, собранных в гнездовых норах птиц, изолирован новый вирус Тюлек (*Tyulek virus, TYKV*), позднее отнесённый к роду *Qaranjavirus* семейства *Orthomyxoviridae*. Это краткий список наиболее примечательных новых вирусов, открытых в результате реализации программы.

Главные результаты, полученные при реализации этих программ, обобщены в специальном Атласе распространения природно-очаговых инфекций в Российской Федерации, изданном в 2001 г., и ряде других книг [161, 189]. Заключительная стадия этих исследований состояла в определении генетических характеристик и классификации изолированных вирусов с использованием современных методов анализа геномов на основе высокопроизводительного секвенирования (NGS). В результате были определены новые виды и роды зоонозных вирусов. Всего на данный момент установлено более 80 видов зоонозных вирусов, принадлежащих 12 различным семействам, циркулирующим на территории Северной Евразии.

Реализация программы проводилась при активном международном сотрудничестве, прежде всего с вирусологами из США и ВОЗ. В качестве примера: Д.К. Львов в разные периоды был советником Американского национального комитета по арбовирусам, членом международного комитета по изучению арбовирусов в высоких широтах, координатором от советской стороны по исследованиям экологии гриппа в рамках кооперации США и СССР, экспертом ВОЗ и председателем комитета по медицинским наукам и здравоохранению Тихоокеанской научной ассоциации.

Реализация программы была признана столь успешной и важной, что многие её участники были удостоены Государственной премии в области наук и технологий в 1999 г. Лист номинантов включал учёных Института вирусологии имени Д.И. Ивановского РАМН: А. Бутенко (за диагностику и идентификацию изолированных штаммов), С. Гайдамович (за внедрение новых методов изучения биологических свойств вирусов), В. Грома-

шевский (за изоляцию вирусов и их идентификацию), П. Дерябин (за формирование коллекции штаммов и вирусов), С. Клименко (за электронную микроскопию вирусов), Л. Колобухина (за изучение клиники инфекции), С. Львов (за исследование вирусов в высоких широтах, полевая работа), Д.К. Львов (руководитель программы, орнитология, полевая работа). Трое учёных (Д.К. Львов, С. Клименко, В. Злобин) были избраны членами АМН СССР (в настоящее время отделение РАН).

Практическая реализация программы продолжилась и позже. В начале текущего столетия на юге России произошло резкое обострение эпидемиологической ситуации по лихорадке Западного Нила (ЛЗН). Наблюдалась высокая смертность (до 10% заболевших). В 6-летних комплексных исследованиях в Астраханской и Волгоградской областях и в Калмыкии расшифрованы особенности циркуляции возбудителя ВЗН, его молекулярно-генетические характеристики, установлены механизмы формирования стабильных природных очагов с участием птиц, домашних животных, комаров и клещей [190]. В последние годы ареал ВЗН значительно расширился, захватывая Воронежскую, Саратовскую, Ростовскую области и Краснодарский край. Случаи ЛЗН в 2022 г. были зарегистрированы в Москве. Параллельно событиям на юге России, казалось бы, при загадочных обстоятельствах вспышка ЛЗН также с высокой смертностью в 1999 г. возникла в Нью-Йорке (США) и его окрестностях. За короткий срок вспышка ЛЗН охватила всю Америку за счёт распространения вируса по основным миграционным руслам перелётных птиц: атлантическому, миссисипскому, центральному и тихоокеанскому. Родина ВЗН – Африка. Вирус не мог быть занесён на американский континент естественным путём последние 80 млн лет со времени разделения Пангеи в меловом периоде мезозоя. В Америке вирус мог попасть с заражёнными комарами в трюмах кораблей из портов Средиземного или Чёрного морей. Так, неосмотрительное или криминальное поведение человека включает мощные природные механизмы, создающие опасные эпидемические ситуации. Результаты филогенетического анализа геномов показали близость эпидемических штаммов из России и США. Но они существенно отличаются от штаммов, изолированных в предшествующие годы в отсутствие эпидемических вспышек. Таким образом, эпидемические ситуации, возможно, обусловлены изменением генетических свойств вирусной популяции в процессе эволюции вируса в природном резервуаре. Изучение арбовирусных и других зоонозных вирусных инфекций, имеющих не только социальное, но и военно-медицинское значение, активно проводится в мире.

Арбовирусные инфекции (зоонозы, зооантропонозы) являются прообразом других инфекций человека, проделавших путь за последние 10 тыс. лет от зоонозов в зооантропонозы и антропонозы [17]. Огромное влияние на изучение арбовирусных инфекций, как и других зоонозов, оказала разработанная Е.Н. Павловским доктрина о природной очаговости инфекции [191]. Исследователи арбовирусов должны, помимо вирусологии, иметь существенные знания по арах-

ноэнтомологии, зоологии, климатологии и другим смежным наукам. Отечественные и зарубежные исследователи подвергали свою жизнь и здоровье реальной угрозе, работая в природных очагах подчас неизвестных инфекций. Имена блестящих исследователей, работавших на всех континентах, вписаны в историю изучения арбовирусов: в США (С. Calisher, J. Casals, R. Chamberlain, W. Downs, S. Halstead, D. Gubler, N. Karabatsos, J. Le Duc, T. Monath, F. Murphy, W. Reeves, R. Shope, W. Sudia, R. Taylor, R. Tesh, M. Turrel, T. Work и др.), Канаде (H. Artsob, C. Chastel и др.), Бразилии (O. Causey, O. Lopes, F. Pinheiro, Travassos da Rosa и др.), Венесуэле (J. Navarro и др.), Египте (M. Darwish и др.), ЮАР (R. Kokernot, B. McIntosh, K. Smithburn, R. Swanepoel и др.), Франции (P. Brech, C. Hannoun и др.), Англии (D. Bishop, C. Ross, J. Woodale, H. Reid, J. Porterfield и др.), Норвегии (T. Traavik и др.), Чехословакии (V. Bardos, M. Gresikova, H. Libikova, J. Rehacek и др.) Югославии (V. Vesenjaj-Hirjan, A. Gligic и др.), Финляндии (M. Brummer-Korvenkontio, N. Oker-Blom и др.), Индии (K. Pavri, C. Dandawate, K. Banerjee и др.), Южной Кореи (H. Lee, S. Yun и др.), Малайзии (S. Lam и др.), КНР (B. Chen, H. Huang, Y.-X. Li, H. Liu и др.), Японии (A. Hotta, A. Igarashi, N. Kitaoka, K. Morita и др.), Австралии (Y. Aaskov, R. Doherty, J. Mackenzie, Y. Marshall и др.), Новой Зеландии (J. Miles и др.). Ежегодные международные конференции давали возможность получения экспресс-информации об активности природных и зооантропонозных очагов, а взаимные визиты способствовали обмену штаммов вирусов для пополнения государственных коллекций. Миллионные эпидемии лихорадок денге и О'Ньонг-Ньонг, десятки, а порой и сотни тысяч больных жёлтой лихорадкой, венесуэльским, западным, восточным, японским, клещевым, долины Муррей, калифорнийским, Росио, Сент-Луис энцефалитами, лихорадками Рифт-Валли, москитной, ЛЗН, ККГЛ и др. – вот далеко не полный перечень опасных для человека и домашних животных арбовирусных инфекций [192]. Диагностика затрудняется огромным генетическим разнообразием возбудителей. Отсутствие специфических средств лечения, а нередко и профилактических вакцин объясняет заинтересованность ВОЗ, работников науки и практического здравоохранения в проблеме, имеющей также ветеринарное, военно-медицинское, природоохранное значение [192]. Важная общебиологическая закономерность заключается в особой опасности для биологических видов, включая человека, встречи с возбудителем, с которым этот вид в силу экологической разобщённости ранее не встречался («встреча незнакомцев»).

Современные подходы геномного анализа в вирусологии

Новые технологии геномного анализа (массовое параллельное секвенирование, next generation sequencing – NGS), которые развиваются с конца XX в., активно используются в различных областях вирусологии. По современным оценкам, число известных се-

годня вирусов составляет менее 0,01% от глобального вирусного многообразия (англ. *virodiversity*) [193, 194]. Отчасти это связано с тем, что классические вирусологические методы применимы только к вирусам, которые возможно изолировать на лабораторной модели (клеточные культуры или лабораторные животные). Если вирус невозможно выделить на используемой модели, то он остается невидимым для исследователя. С этим связано относительно небольшое число известных на сегодняшний день вирусов (всего около 10 тыс. видов). В последние годы с развитием технологии NGS появилась возможность генетически описывать вирусы путём анализа виroma и транскриптома их хозяина, что привело к значительному сдвигу в понимании многообразия вирусного мира, его эволюции и роли вирусов в биосфере [195]. Анализ виромов различных видов животных, членистоногих и проб окружающей среды позволил выявить сотни и тысячи новых вирусов, включая эволюционно близкие к известным патогенам человека или представляющие новые дивергентные клады [196, 197]. Учитывая эффективность NGS как метода геномного анализа, анализ виroma рассматривается как перспективный метод мониторинга зоонозных инфекций в природных резервуарах, позволяя выявить весь спектр циркулирующих вирусов и их генетических вариантов. Разработаны эффективные подходы для диагностики инфекций на основе NGS. Во время текущей пандемии COVID-19 полногеномное секвенирование штаммов SARS-CoV-2 проводится буквально в режиме реального времени, позволяя своевременно отслеживать появление и распространение новых вариантов вируса с использованием подходов молекулярной эпидемиологии. Вместе с тем такой подход, несмотря на большие возможности, не позволяет определить биологические и антигенные свойства обнаруженных вирусов. Поэтому классические вирусологические методы, опирающиеся на изоляцию штамма на лабораторной модели, остаются основой современной вирусологии.

Руководства по вирусологии

Для преодоления отечественного информационного дефицита в 2008 и 2013 гг. изданы два русскоязычных руководства, обобщающие информацию по вирусам и вирусным инфекциям человека (более 150) и животных (свыше 150). Дан анализ места вирусов в биосфере, экологии вирусов по их структурным компонентам, стратегии генома, взаимодействию с клетками. Описаны семейства вирусов, патогенных для человека и животных. Охарактеризованы противовирусный иммунитет, химиотерапия вирусных инфекций, лабораторная диагностика и иммунопрофилактика, вирусологические и молекулярно-генетические методы [198].

Роль Института вирусологии имени Д.И. Ивановского АМН СССР в развитии отечественной и мировой вирусологии

В развитии отечественной вирусологии трудно переоценить роль Института вирусологии имени Д.И. Ивановского, учреждённого Постановлением

Совета Народных Комиссаров от 30 июня 1944 г. № 797 «Об учреждении Академии медицинских наук СССР (АМН)», в состав которой вошёл и Институт вирусологии. Имя основоположника вирусологии Д.И. Ивановского было присвоено институту Постановлением Совета Министров СССР № 4344 от 19 октября 1950 г. В институте на протяжении 16 лет работал ученик Д.И. Ивановского, Е.И. Туревич, реализовавший преемственность исследований. В это же время работал член-корреспондент АН СССР В.Л. Рыжков (вирусные болезни растений). Первым директором института был назначен профессор Анатолий Тимофеевич Кравченко, который через 6 лет был переведён научным руководителем крупного вирусологического центра Министерства обороны СССР. Первым заместителем директора по науке стал академик АМН СССР Лев Александрович Зильбер, организовавший впоследствии крупный отдел вирусологии в НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи АМН СССР. Некоторое время директором Института вирусологии был академик АМН СССР Анатолий Александрович Смородинцев, позднее организовавший Институт гриппа в Ленинграде. Одним из первых заместителей директора по науке был академик АМН СССР Валентин Дмитриевич Соловьев, со временем возглавивший вирусологический отдел в ИЭМ. В период пятилетнего руководства Института вирусологии академиком АМН СССР Михаилом Петровичем Чумаковым существенно возросли связи с периферическими научными и практическими учреждениями, что привело к проведению крупных комплексных экспедиционных исследований и созданию системы подготовки кадров вирусологов. В 1955 г. М.П. Чумаков возглавил созданный им Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР (ИПВЭ), получивший позднее его имя. Затем Институт вирусологии возглавил академик АМН СССР Павел Николаевич Косяков. Возник центр по гриппу, объединивший 19 опорных баз по стране, впоследствии трансформировавшийся в Центр ВОЗ. С 1961 по 1987 г. Институт вирусологии возглавлял академик Виктор Михайлович Жданов, превративший институт в современный научный центр, широко известный в мире. Была создана школа молекулярной вирусологии, начали функционировать 6 центров ВОЗ по проблемам гриппа, арбовирусов, экологии вирусов, герпеса, вирусных гепатитов, СПИДа. Впервые стал выпускаться журнал «Вопросы вирусологии». В.М. Жданов сплотил ряд лабораторий для изучения ВИЧ-инфекции, были выделены первые в стране штаммы, послужившие основой для разработки отечественных диагностических тест-систем и проведения фундаментальных исследований. В содружестве с исследователями Института молекулярной биологии В.А. Энгельгардта РАН и Центрального института эпидемиологии был разработан отечественный анти-ВИЧ-препарат фосфазид (Никовир). Разработка удостоена Государственной премии РФ в области науки и техники (профессор Георгий Артемьевич Галегов) [99]. Были налажены устойчивые связи с вирусологами из более чем 30 стран ми-

ра в Америке, Европе, Азии, Австралии. Огромное значение в Институте вирусологии всегда уделялось подготовке кадров. Здесь в аспирантуре получили подготовку будущие директора академических институтов: академик РАМН Борис Федорович Семёнов возглавил впоследствии Институт вакцин и сывороток имени И.М. Мечникова, академик АМН СССР Отар Георгиевич Анджапаридзе был директором Института вирусных препаратов, академик АМН СССР Сослан Григорьевич Дзагуров был директором Института стандартизации и контроля медицинских и биологических препаратов имени Л.А. Тарасевича, исследования кори возглавлял академик АМН СССР Петр Григорьевич Сергиев, оставаясь директором Института медицинской паразитологии и тропической медицины имени Е.И. Марциновского. Академик АМН СССР Оганес Вагаршакович Бароян был учёным секретарем Института вирусологии, а затем назначен директором ИЭМ. Таким образом, Институт вирусологии был «инкубатором» директоров НИИ страны, чрезвычайно активно велась подготовка кадров для научных и практических учреждений через аспирантуру, стажировку и в процессе совместных комплексных исследований – кафедре вирусологии. С 1987 по 2016 г. директором Института вирусологии был избран академик АМН СССР – РАМН – РАН Дмитрий Константинович Львов, который до этого времени на протяжении 19 лет был заместителем директора по научной работе. В 2016 г. Институт вирусологии прекратил своё существование в качестве самостоятельного учреждения и был включён в состав НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России.

Заключение

Отечественная вирусология по прошествии 130 лет со времени описания Д.И. Ивановским первого возбудителя вирусной инфекции продолжает занимать ведущие позиции по ряду приоритетных направлений, в частности по изучению формирования и эволюции популяционного генофонда возбудителей новых и возвращающихся инфекций, представляющих национальную и глобальную угрозу биобезопасности населения и среды обитания. Осмысленное сочетание теоретических подходов к изучению эволюции вирусов с инновационными методами исследования молекулярно-генетических свойств вирусов и создание на этой основе новых поколений вакцин и противовирусных препаратов обещает существенную минимизацию последствий грядущих пандемий. Возможность возникновения в обозримом будущем чрезвычайных эпидемических ситуаций остаётся высокой. «Мудрость не должна полагаться на непредвиденное» (Эдгар По).

ЛИТЕРАТУРА

- Mayer A. Über die Mosaikkrankheit des Tabaks. *Die Landwirtsch. Versuchs-stationen*. 1886; 32: 451–67.
- Ивановский Д.И. О двух болезнях табака. Табачная пепелица, мозаичная болезнь. *Сельское хозяйство и лесоводство*. 1892; ССІХХ(2): 104–21.
- Iwanowski D. Über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze. *St. Petersburg Acad. Imp. Sci. Bull.* 1892; 35: 67–70.
- Ивановский Д.И. Мозаичная болезнь табака. *Труды Варшавского Университета*. 1892; (6): 49–72.
- Beijerinck M.W. Über ein contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter. *Verhandelingen der Koninklyke Akademie van Wetenschappen te Amsterdam*. 1898; 65(5): 1–22.
- Beijerinck M.W. Bemerkung zu dem Aufsatz von Herrn Iwanowsky über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung II*. 1899; (5): 310–1.
- Жирнов О.П., Георгиев Г.П. Д.И. Ивановский — первооткрыватель вирусов как новой формы биологической жизни. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2017; 72(1): 84–6. <https://doi.org/10.15690/vramn810>
- Stanley W.M. Soviet studies on viruses. *Science*. 1944; 99(2564): 136–8. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.99.2564.136>
- Loeffler F., Frosch P. Summarischer bericht über die ergebnisse der untersuchungen der Kommission zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche. *Dtsch Medizinische Wochenschrift*. 1897; 23(39): 617. <https://doi.org/10.1055/S-0029-1205172>
- Reed W. Recent researches concerning the etiology, propagation, and prevention of yellow fever, by the united states army commission. *J. Hyg. (Lond.)* 1902; 2(2): 101–19. <https://doi.org/10.1017/s0022172400001856>
- Львов Д.К. Рождение и развитие вирусологии – история изучения новых и возвращающихся инфекций. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(S1): 5–20.
- Львов Д.К. Значение вновь возникающих инфекций в биобезопасности. *Вопросы вирусологии*. 2002; 47(5): 4–7.
- Haeckel E. *Generelle Morphologie der Organismen. Allgemeine Grundzüge der organischen Formen-Wissenschaft, mechanisch begründet durch die von Charles Darwin reformirte Descendenz-Theorie*. Berlin; 1866.
- Fisher R. *The Genetical Theory of Natural Selection*. Oxford: Clarendon Press; 1930.
- Mettler L.E., Gregg T.G. *Population Genetics and Evolution*. Trenton: Prentice-Hall; 1969.
- Williamson M. *The Analysis of Biological Populations*. London; 1972.
- Львов Д.К., Гулюкин М.И., Забережный А.Д., Гулюкин А.М. Формирование популяционного генофонда потенциально угрожающих биобезопасности зоонозных вирусов. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(5): 243–58.
- Lvov D.K. Influenza A virus – a sum of populations with a common protected gene pool. In *Sov. Med. Rev. Virol.* 1987; 2: 15–37.
- Mahy B.W., Lvov D.K. *Concepts in Virology: From Ivanovsky to the Present*. Switzerland: Harwood Academic Publisher GmbH; 1993.
- Жданов В.М., Львов Д.К., Забережный А.Д. Место вирусов в биосфере. *Вопросы вирусологии*. 2012; 57(S): 21–32.
- Жданов В.М., Львов Д.К. *Экология возбудителей инфекций*. М.: Медицина; 1984.
- Львов Д.К., Борисевич С.В., Альховский С.В., Бурцева Е.И. Актуальные подходы к анализу вирусных геномов в интересах биобезопасности. *Инфекционные болезни. Новости. Лечение. Обучение*. 2019; 8(2): 96–101. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-12012>
- Слома И.О. *Общая вакцинология*. Минск; 2022.
- Щелкунов С.Н., Маренникова С.С., Блинов В.М., Ресенчук С.М. Полная кодирующая последовательность генома вируса оспы. *Доклады Академии Наук СССР*. 1993; 328: 629–32.
- Henderson D.A. Smallpox eradication – the final battle. *J. Clin. Pathol.* 1975; 28(11): 843–9. <https://doi.org/10.1136/JCP.28.11.843>
- Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. *Smallpox and its eradication*. Geneva: WHO; 1988.
- Львов Д.К., Зверев В.В., Гинцбург А.Л., Пальцев А.М. Натуральная оспа – дремлющий вулкан. *Вопросы вирусологии*. 2008; 53(4): 4–8.
- Щелкунов С.Н. Возможен ли возврат оспы? *Молекулярная медицина*. 2011; (4): 36–41.
- Shchelkunov S.N. How long ago did smallpox virus emerge? *Arch. Virol.* 2009; 154(12): 1885–71. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0536-0>
- Щелкунов С.Н., Щелкунова Г.А. Нужно быть готовыми к возврату оспы. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(5): 206–14. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-206-214>
- Ladnyj I.D., Ziegler P., Kima E. A human infection caused by monkeypox virus in basankusu territory, democratic Republic of the Congo. *Bull. World Health Organ.* 1972; 46(5): 593–7.

32. Huhn G.D., Bauer A.M., Yorita K., Graham M.B., Sejvar J., Likos A., et al. Clinical characteristics of human monkeypox, and risk factors for severe disease. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 41(12): 1742–51. <https://doi.org/10.1086/498115>
33. Chastel C. Human monkeypox. *Pathol. Biol. (Paris)*. 2009; 57(2): 175–83. <https://doi.org/10.1016/J.PATBIO.2008.02.006>
34. Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kitalu N.K., Kinkela T.L., et al. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the democratic Republic of Congo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010; 107(37): 16262–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005769107>
35. Nakazawa Y., Emerson G.L., Carroll D.S., Zhao H., Li Y., Reynolds M.G., et al. Phylogenetic and ecologic perspectives of a monkeypox outbreak, Southern Sudan, 2005. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(2): 237–45. <https://doi.org/10.3201/eid1902.121220>
36. Khodakevich L., Szczeniowski M., Manbu-ma-Disu, Jezek Z., Marennikova S., Nakano J., et al. The role of squirrels in sustaining monkeypox virus transmission. *Trop. Geogr. Med.* 1987; 30: 115–22.
37. Guarner J., Johnson B.J., Paddock C.D., Shieh W.J., Goldsmith C.S., Reynolds M.G., et al. Monkeypox transmission and pathogenesis in prairie dogs. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10(3): 426–31. <https://doi.org/10.3201/eid1003.030878>
38. Emerson G.L., Li Y., Frace M.A., Olsen-Rasmussen M.A., Khristova M.L., Govil D., et al. The phylogenetics and ecology of the orthopoxviruses endemic to North America. *PLoS One*. 2009; 4(10): e7666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007666>
39. CDC Update: Multistate Outbreak of Monkeypox – Illinois, Indiana, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin. *MMWR*. 2003; 52(27): 642–6.
40. Борисевич С.В., Маренникова С.С., Стомба Л.Ф., Петров А.А., Кратков В.Т., Мехлай А.А. Оспа буйволов. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(5): 200–4. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-5-200-204>
41. WHO. Report 1. Multi-Country Outbreak of Monkeypox; 2022.
42. De Clercq E. Cidofovir in the treatment of poxvirus infections. *Antiviral. Res.* 2002; 55(1): 1–13. [https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(02\)00008-6](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(02)00008-6)
43. Quenelle D.C., Collins D.J., Wan W.B., Beadle J.R., Hostetler K.Y., Kern E.R. Oral treatment of cowpox and vaccinia virus infections in mice with either lipid esters of Cidofovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48(2): 404–12. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.2.404-412.2004>
44. Smith S.K., Olson V.A., Karem K.L., Jordan R., Hruby D.E., Damon I.K. In vitro efficacy of ST246 against smallpox and monkeypox. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(3): 1007–12. <https://doi.org/10.1128/AAC.01044-08>
45. Kennedy J.S., Greenberg R.N. IMVAMUNE: Modified Vaccinia Ankara Strain as an Attenuated Smallpox Vaccine. *Expert Rev. Vaccines*. 2009; 8(1): 13–24. <https://doi.org/10.1586/14760584.8.1.13>
46. Hatch G.J., Graham V.A., Bewley K.R., Tree J.A., Dennis M., Taylor I., et al. Assessment of the protective effect of imvamune and Acam2000 vaccines against aerosolized monkeypox virus in cynomolgus macaques. *J. Virol.* 2013; 87(14): 7805–15. <https://doi.org/10.1128/JVI.03481-12>
47. Vollmar J., Arndt N., Eckl K.M., Thomsen T., Petzold B., Mateo L., et al. Safety and Immunogenicity of IMVAMUNE, a promising candidate as a third generation smallpox vaccine. *Vaccine*. 2006; 24(12): 2065–70. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.11.022>
48. Hammarlund E., Lewis M.W., Hansen S.G., Strelow L.I., Nelson J.A., Sexton G.J., et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat. Med.* 2003; 9(9): 1131–7. <https://doi.org/10.1038/NM917>
49. Методические указания МУ 3.3.1 2044-06. Проведение вакцинопрофилактики натуральной оспы. М.; 2006.
50. Елаков А.Л. Антирабические вакцины, применяемые в Российской Федерации, и перспективы их совершенствования. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(2): 107–14. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-102>
51. Зайкова О.Н., Гребенникова Т.В., Лосич М.А., Елаков А.Л., Гулюкин А.М., Метлин А.Е. Сравнительная молекулярно-генетическая характеристика изолятов вируса бешенства (Rabies Lyssavirus, Lyssavirus, Rhabdoviridae), циркулировавших на территории Российской Федерации в период с 1985 по 2016 год. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(1): 41–8. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-41-48>
52. Зверев В.В., Юминова Н.В. Вакцинопрофилактика вирусных инфекций от Э. Дженнера до настоящего времени. *Вопросы вирусологии*. 2012; (S1): 33–42.
53. Медуницын Н.В. *Вакцинология*. М.; 2010.
54. Костинов М.П. *Вакцинация взрослых – от стратегии к тактике*. М.: Группа МДВ; 2020.
55. Борисевич С.В., Хромов Е.Н., Ковтун А.Л., ред. *Неэндемические и экзотические вирусные инфекции: этиология, диагностика и профилактика*. М.; 2014.
56. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., ред. *Санитарная охрана территории Российской Федерации в современных условиях*. Саратов: Буква; 2014.
57. Сертификация ликвидации полиомиелита: Материалы XV совещания Европейской региональной комиссии по сертификации. Копенгаген; 2002.
58. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatullin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., et al. Safety and immunogenicity of an Ad26 and Ad5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: Two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020; 396(10255): 887–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
59. Каган Н.В. Экспериментальные материалы к иммунизации мышей против весенне-летнего (клещевого) энцефалита препаратами живого и убитого вируса. *Архив биологических наук*. 1939; 56(2): 97–111.
60. Пеньевская М.А. Специфическая профилактика клещевого энцефалита. В кн.: Злобин В.И., ред. *Клещевой энцефалит в XXI веке*. М.: Наука; 2021: 422–53.
61. Чумаков М.П., Львов Д.К., Сарманова Е.С., Найдич К.М., Чумаков Н.Ф. Сравнительное изучение эпидемиологической эффективности прививок мозговой и культуральной вакцины против клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии*. 1963; 8(3): 307–15.
62. Левкович Е.Н., Засухина Г.Д. Тканевые культуральные вакцины против клещевого энцефалита. *Вестник Академии медицинских наук СССР*. 1960; (1): 53–7.
63. Львов Д.К. *Иммунопрофилактика клещевого энцефалита*. М.; 1965.
64. Воробьева М.С., Щербинина М.С. Современный концентрированные антигенные культуральные вакцины для иммунопрофилактики клещевого энцефалита. В кн.: Злобин В.И., ред. *Клещевой энцефалит в XXI веке*. М.: Наука; 2021: 409–21.
65. Карганова Г.Г. Генетическая вариабельность вируса клещевого энцефалита: фундаментальные и прикладные аспекты. В кн.: Львов Д.К., Урываев Л.В., ред. *Изучение эволюции вирусов в рамках проблем биобезопасности и социально-значимых инфекций*. М.; 2011: 190–9.
66. Ehrlich P. Chemotherapeutic studies on trypanosomes Ehrlich 1907. *J. Roy. Inst. Pub. Heal.* 1907; (15): 449–56.
67. De Chasse B., Meyniel-Schicklin L., Aublin-Gex A., André P., Lotteau V. New horizons for antiviral drug discovery from virus-host protein interaction networks. *Curr. Opin. Virol.* 2012; 2(5): 606–13. <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2012.09.001>
68. Kumar N., Sharma S., Kumar R., Tripathi B.N., Barua S., Ly H., et al. Host-directed antiviral therapy. *Clin. Microbiol. Rev.* 2020; 33(3): e00168-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00168-19>
69. Zhirnov O.P., Klenk H.D., Wright P.F. Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza. *Antiviral. Res.* 2011; 92(1): 27–36. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2011.07.014>
70. Tampere M., Pettke A., Salata C., Wallner O., Koolmeister T., Cazares-Körner A., et al. Novel broad-spectrum antiviral inhibitors targeting host factors essential for replication of pathogenic RNA viruses. *Viruses*. 2020; 12(12): 1423. <https://doi.org/10.3390/V12121423>
71. Zhirnov O.P. Molecular targets in the chemotherapy of coronavirus infection. *Biochemistry. (Mosc.)*. 2020; 85(5): 523–30. <https://doi.org/10.1134/S0006297920050016>
72. Roche M., Salimi H., Duncan R., Wilkinson B.L., Chikere K., Moore M.S., et al. A common mechanism of clinical HIV-1 resistance to the CCR5 antagonist maraviroc despite divergent resistance levels and lack of common Gp120 resistance mutations. *Retrovirology*. 2013; 10: 43. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-43>

73. Lieberman-Blum S.S., Fung H.B., Bandres J.C. Maraviroc: A CCR5-receptor antagonist for the treatment of HIV-1 infection. *Clin. Ther.* 2008; 30(7): 1228–50. [https://doi.org/10.1016/S0149-2918\(08\)80048-3](https://doi.org/10.1016/S0149-2918(08)80048-3)
74. Ma C., Li F., Musharrafieh R.G., Wang J. Discovery of cyclosporine A and its analogs as broad-spectrum anti-influenza drugs with a high in vitro genetic barrier of drug resistance. *Antiviral Res.* 2016; 133: 62–72. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2016.07.019>
75. Shimizu Y., Shirasago Y., Kondoh M., Suzuki T., Wakita T., Hanada K., et al. Monoclonal antibodies against occludin completely prevented hepatitis C virus infection in a mouse model. *J. Virol.* 2018; 92(8): e02258-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.02258-17>
76. Yamashita M., Iida M., Tada M., Shirasago Y., Fukasawa M., Nagase S., et al. Discovery of anti-claudin-1 antibodies as candidate prevented hepatitis C virus infection. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2015; 353(1): 112–8. <https://doi.org/10.1124/JPET.114.217653>
77. Dwek R.A., Bell J.I., Feldmann M., Zitzmann N. Host-targeting oral antiviral drugs to prevent pandemics. *Lancet.* 2022; 399(10333): 1381–2. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00454-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00454-8)
78. Zheng Y., Li S., Song K., Ye J., Li W., Zhong Y., et al. A broad antiviral strategy: Inhibitors of human DHODH pave the way for host-targeting antivirals against emerging and re-emerging viruses. *Viruses.* 2022; 14(5): 928. <https://doi.org/10.3390/V14050928>
79. Bojkova D., Bechtel M., McLaughlin K.M., McGreig J.E., Klann K., Bellinghausen C., et al. Aprotinin inhibits SARS-CoV-2 replication. *Cells.* 2020; 9(11): 2377. <https://doi.org/10.3390/CELLS9112377>
80. Жирнов О.П., Бокова Н.О., Исаева Е.И., Воробьева И.В., Малышев Н.А. Патогенетическое лечение гриппа с помощью аэрозольной формы апротинина, ингибитора протеаз. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2015; (4): 59–64.
81. Redondo-Calvo F.J., Padín J.F., Muñoz-Rodríguez J.R., Serrano-Oviedo L., López-Juárez P., Porras Leal M.L., et al. Aprotinin treatment against SARS-CoV-2: A randomized phase III study to evaluate the safety and efficacy of a pan-protease inhibitor for moderate COVID-19. *Eur. J. Clin. Invest.* 2022; 52(6): e13776. <https://doi.org/10.1111/EJC.13776>
82. Шахгильдян И.В., Михайлов М.И., Онищенко Г.Г. *Парентеральные вирусные гепатиты (эпидемиология, диагностика, профилактика)*. М.; 2003.
83. Михайлов М.И. Аспекты изучения гепатита В на современном этапе. В кн.: Львов Д.К., Урываев Л.В., ред. *Изучение эволюции вирусов в рамках проблем биобезопасности и социально-значимых инфекций*. М.; 2011: 77–87.
84. Исаева О.В., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Дельта-подобные вирусы (Kolmioviridae: Deltavirus) животных и происхождение вируса гепатита D (Hepatitis D Virus) человека. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(5): 340–5. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-78>
85. Wei N.C., Chong J.O. Hepatitis B virus mutants: an overview. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2002; 17(Suppl. 4): S497–9. <https://doi.org/10.1046/J.1440-1746.17.S4.17.X>
86. Mason W.S., Gerlich W.H., Taylor J.M., Kann M., Mizokami T., Loeb D., et al. Family Hepadnaviridae. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press; 2011: 445–55.
87. Дерябин П.Г., Шахгильдян И.В. Гепатит С: Фундаментальные и прикладные проблемы. В кн.: Львов Д.К., Урываев Л.В., ред. *Изучение эволюции вирусов в рамках проблем биобезопасности и социально-значимых инфекций*. М.; 2011: 88–98.
88. Соколова Т.М. Вирус гепатита С (Flaviviridae: Hepacivirus: Hepacivirus C): Регуляция сигнальных реакций врожденного иммунитета. *Вопросы вирусологии.* 2021; 65(6): 307–16. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-6-1>
89. Alter M.J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13(17): 2436–41. <https://doi.org/10.3748/WJG.V13.I17.2436>
90. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(Pt. 11): 3173–88. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.80401-0>
91. Львов Д.К. Вирусный гепатит С – «ласковый убийца». *Российский гастроэнтерологический журнал.* 1995; (1): 4–6.
92. Lvov D.K., Samokhvalov E.I., Tsuda F., Selivanov N.A., Okamoto H., Stakhanova V.M., et al. Prevalence of hepatitis C virus and distribution of its genotypes in Northern Eurasia. *Arch. Virol.* 1996; 141(9): 1613–22. <https://doi.org/10.1007/bf01718286>
93. Урываев Л.В., Бобкова М.Р., Лаповок И.А. ВИЧ-Инфекция – вызов человечеству. Есть ли шансы победить заболевание. *Вопросы вирусологии.* 2012; (S1): 104–26.
94. Бобкова М.Р. *Латентность ВИЧ*. М.: Человек; 2021.
95. Ожмегова Е.Н., Бобкова М.Р. Лекарственная устойчивость ВИЧ: Прежние и современные тенденции. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(3): 193–205. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-113>
96. Алипер Т.И., Забережный А.Д., Гребенникова Т.В. Африканская чума свиней в Российской Федерации. *Вопросы вирусологии.* 2012; (S1): 127–36.
97. Власова Н.Н., Верховский О.А., Алипер Т.И., Капустина О.В., Алексеев К.П., Южаков А.Г. и др. Проблемы специфической профилактики Африканской чумы свиней. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(3): 206–16. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-117>
98. 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. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-96>
99. Галегов Г.А., Андропова В.Л., Колобухина Л.В., Львов Д.К. Специфическая лекарственная терапия распространённых и социально значимых вирусных инфекций человека. *Вопросы вирусологии.* 2012; 57(S1): 180–98.
100. Gambaryan A.S., Tuzikov A.B., Piskarev V.E., Yamnikova S.S., Lvov D.K., Robertson J.S., et al. Specification of receptor-binding phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: non-egg-adapted human H1 and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6'-sialyl (N-acetyl)lactosamine. *Virology.* 1997; 232(2): 345–50. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8572>
101. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Бовин Н.В., Малышев Н.А., Чукалин А.Г., Колобухина Л.В. и др. Корреляция между рецепторной специфичностью штаммов пандемического вируса гриппа A(H1N1)Pdм09, изолированных в 2009–2011 Гг., структурой рецепторсвязывающего сайта и вероятностью развития летальной первичной вирусной пневмонии. *Вопросы вирусологии.* 2012; 57(1): 14–20.
102. Каверин Н.В., Руднева И.А., Тимофеева Т.А., Игнатьева А.В. Антигенная структура гемагглютинаина вируса гриппа А. *Вопросы вирусологии.* 2012; 57(S1) 148–58.
103. Ершов Ф.И. Современный арсенал противовирусных препаратов. *Вопросы вирусологии.* 2012; (S1): 169–79.
104. Яцышина С.Б., Мамошина М.В., Шипулина О.Ю., Подколзин А.Т., Акимкин В.Г. Анализ циркуляции коронавирусов человека. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(5): 267–76. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-5-3>
105. Львов Д.К. Популяционные взаимодействия в биологической системе: вирус гриппа А – дикие и домашние птицы – люди; причины и последствия проникновения на территорию России высоковирулентного вируса гриппа А/H5N1. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии.* 2006; 83(3): 96–100.
106. WHO. Avian Influenza Weekly Update N852. Human Infection with Influenza A/H5 Virus; 2022.
107. WHO. Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness; 2017.
108. Suarez D.L. Influenza A virus. In: *Avian Influenza*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.; 2009: 1–22.
109. Matrosovich M.N., Gambaryan A.S., Teneberg S., Piskarev V.E., Yamnikova S.S., Lvov D.K., et al. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology.* 1997; 233(1): 224–34. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8580>
110. Львов Д.К., Яшкулов К.Б., Прилипов А.Г., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Шляпникова О.В. и др. Обнаружение аминокислотных замен аспарагиновой кислоты на глицин и аспарагин в рецепторсвязывающем сайте гемагглютинаина в вариантах в вариантах пандемического вируса гриппа А/H1N1sw от больных с летальным исходом и со среднетяжелой формой заболевания. *Вопросы вирусологии.* 2010; 55(3): 15–8.
111. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Прилипов А.Г., Колобухина Л.В., Малышев Н.А. и др. Распространение нового пандемического вируса гриппа А(H1N1)v в России. *Вопросы вирусологии.* 2010; 55(3): 4–9.

112. Kilander A., Rykkvin R., Dudman S.G., Hungnes O. Observed association between the HA1 mutation D222G in the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus and severe clinical outcome, Norway 2009-2010. *Euro Surveill* 2010; 15(9): 19498. <https://doi.org/10.2807/ese.15.09.19498-en>
113. Mak G.C., Au K.W., Tai L.S., Chuang K.C., Cheng K.C., Shiu T.C., et al. Association of D222G substitution in haemagglutinin of 2009 pandemic influenza A (H1N1) with severe disease. *Eur. Surveill.* 2010; 15(14): 19534.
114. Puzelli S., Facchini M., Spagnolo D., De Marco M.A., Calzoletti L., Zanetti A., et al. Transmission of hemagglutinin D222G mutant strain of pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16(5): 863–5. <https://doi.org/10.3201/eid1605.091815>.
115. Herfst S., Schrauwen E.J., Linster M., Chutinimitkul S., de Wit E., Munster V.J., et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science*. 2012; 336(6088): 1534–41. <https://doi.org/10.1126/science.1213362>
116. Imai M., Watanabe T., Hatta M., Das S.C., Ozawa M., Shinya K., et al. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature* 2012; 486(7403): 420–8. <https://doi.org/10.1038/nature10831>
117. Hayden F.G., Sugaya N., Hirotsu N., Lee N., de Jong M.D., Hurt A.C., et al. Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. *N. Engl. J. Med.* 2018; 379(10): 913–23. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716197>
118. Гараев Т.М., Одноров А.И., Кириллова Е.С., Бурцева Е.И., Финногенова М.П., Мукашева Е.А. и др. Производные адамантана, способные ингибировать репродукцию резистентного к римантадину штамма вируса гриппа А(H1N1)Pdm09 (Influenza A Virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae). *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(1): 16–20. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-16-20>
119. Richman D.D. Antiretroviral drug resistance: mechanisms, pathogenesis, clinical significance. *Antiviral Chemother.* 1996; 4: 383–95.
120. Львов Д.К., Альховский С.В. Истоки пандемии COVID-19: Экология и генетика коронавирусов (Betacoronavirus: Coronaviridae) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (подрод Sarbecovirus), MERS-CoV (подрод Merbecovirus). *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(2): 62–70.
121. Львов Д.К., Альховский С.В., Колобухина Л.В., Бурцева Е.И. Этиология эпидемической вспышки COVID-19 в г. Ухань (провинция Хубэй, Китайская Народная Республика), ассоциированной с Вирусом 2019-nCoV (Nidovirales, Coronaviridae, Coronavirinae, Betacoronavirus, подрод Sarbecovirus): Уроки эпидемии SARS-CoV. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(1): 6–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-6-15>
122. Drosten C., Gunther S., Preiser W., van der Werf S., Brodt H.R., Becker S., et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348(20): 1967–76. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030747>
123. Haagmans B.L., Al Dhahiry S.H.S., Reusken C.B.E.M., Raj V.S., Galiano M., Myers R., et al. Middle east respiratory syndrome coronavirus in dromedary camels: an outbreak investigation. *Lancet Infect. Dis.* 2014; 14(2): 140–5. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70690-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70690-X)
124. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(8): 727–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
125. Леншин С.В., Ромашин А.В., Вышемирский О.И., Львов Д.К., Альховский С.В. Летучие мыши субтропической зоны Краснодарского края России как возможный резервуар зоонозных вирусных инфекций. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(2): 112–22. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-41>
126. Fan Y., Zhao K., Shi Z.L., Zhou P. Bat coronaviruses in China. *Viruses.* 2019; 11(3): 210. <https://doi.org/10.3390/v11030210>.
127. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020; 579(7798): 270–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
128. Zhou H., Ji J., Chen X., Bi Y., Li J., Wang Q., et al. Identification of novel bat coronaviruses sheds light on the evolutionary origins of SARS-CoV-2 and related viruses. *Cell.* 2021; 184(17): 4380–91. e14. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2021.06.008>
129. Zhou H., Chen X., Hu T., Li J., Song H., Liu Y., et al. A novel bat coronavirus closely related to SARS-CoV-2 contains natural insertions at the S1/S2 cleavage site of the spike protein. *Curr. Biol.* 2020; 30(11): 2196–203.e3. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2020.05.023>
130. Temmam S., Pasteur I., Vongphayloth K., Salazar E.B., Munier S., Bonomi M. Coronaviruses with a SARS-CoV-2-like receptor-binding domain allowing ACE2-mediated entry into human cells isolated from bats of Indochinese peninsula. 2021. Preprint. <https://doi.org/10.21203/RS.3.RS-871965/V1>
131. Alkhovsky S., Lenshin S., Romashin A., Vishnevskaya T., Vyshemirsky O., Bulycheva Y., et al. SARS-like coronaviruses in Horseshoe bats (Rhinolophus Spp.) in Russia, 2020. *Viruses.* 2022; 14(1): 113. <https://doi.org/10.3390/V14010113>
132. de Groot R.J., Baker S.C., Baric R., Enjuanes L., Gorbalenya A.E., Holmes K.V., et al. Family coronaviridae. In: King A.M., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier: London; 2012: 806–28.
133. Li W., Moore M.J., Vasllieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature.* 2003; 426(6965): 450–4. <https://doi.org/10.1038/nature02145>
134. Ren W., Qu X., Li W., Han Z., Yu M., Zhou P., et al. Difference in receptor usage between Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) coronavirus and SARS-like coronavirus of bat origin. *J. Virol.* 2008; 82(4): 1899–907. <https://doi.org/10.1128/jvi.01085-07>
135. Ge X.Y., Li J.L., Yang X.L., Chmura A.A., Zhu G., Epstein J.H., Mazet J.K., et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature.* 2013; 503(7477): 535–8. <https://doi.org/10.1038/nature12711>
136. Hu B., Zeng L.P., Yang X.L., Ge X.Y., Zhang W., Li B., et al. Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the Origin of SARS coronavirus. *PLoS Pathog.* 2017; 13(11): e1006698. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006698>
137. Lau S.K.P., Feng Y., Chen H., Luk H.K.H., Yang W.H., Li K.S.M., et al. Severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus ORF8 protein is acquired from SARS-Related coronavirus from greater horseshoe bats through recombination. *J. Virol.* 2015; 89(20): 15332–47. <https://doi.org/10.1128/jvi.01048-15>
138. Ge X.Y., Wang N., Zhang W., Hu B., Li B., Zhang Y.Z., et al. Coexistence of multiple coronaviruses in several bat colonies in an abandoned mineshaft. *Virol. Sin.* 2016; 31(1): 31–40. <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3713-9>
139. Zhirnov O.P., Poyarkov S.V., Vorob'eva I.V., Safonova O.A., Malyshev N.A., Klenk H.D. Segment NS of influenza A virus contains an additional gene NSP in positive-sense orientation. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2007; 414(1): 127–33. <https://doi.org/10.1134/S1607672907030106>
140. Zhirnov O.P., Vorobjeva I.V., Saphonova O.A., Poyarkov S.V., Ovcharenko A.V., Anhan D., et al. Structural and evolutionary characteristics of HA, NA, NS and M genes of clinical influenza A/H3N2 viruses passaged in human and canine cells. *J. Clin. Virol.* 2009; 45(4): 322–33. <https://doi.org/10.1016/J.JCV.2009.05.030>
141. Zhirnov O.P., Poyarkov S.V. Novel negative sense genes in the RNA genome of coronaviruses. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2021; 496(1): 27–31. <https://doi.org/10.1134/S1607672921010130>
142. Zhirnov O. Ambisense polarity of genome RNA of orthomyxoviruses and coronaviruses. *World J. Virol.* 2021; 10(5): 256–63. <https://doi.org/10.5501/WJ.V.10.15.256>
143. Zhirnov O.P., Akulich K.A., Lipatova A.V., Usachev E.V. Negative-sense virion RNA of segment 8 (NS) of influenza a virus is able to translate in vitro a new viral protein. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2017; 473(1): 122–7. <https://doi.org/10.1134/S1607672917020090>
144. Kearse M.G., Wilusz J.E. Non-AUG translation: A new start for protein synthesis in eukaryotes. *Genes Dev.* 2017; 31(17): 1717–31. <https://doi.org/10.1101/GAD.305250.117>
145. Acevedo J.M., Hoermann B., Schlimbach T., Teleman A.A. Changes in global translation elongation or initiation rates shape the proteome via the Kozak sequence. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 4018. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-22330-9>
146. Kolekar P., Pataskar A., Kulkarni-Kale U., Pal J., Kulkarni A. IRESPred: web server for prediction of cellular and viral internal

- ribosome entry site (IRES). *Sci. Rep.* 2016; 6: 27436. <https://doi.org/10.1038/SREP27436>.
147. Zhirnov O.P. Unique bipolar gene architecture in the RNA genome of influenza A virus. *Biochem.* 2020; 85(3): 387–92. <https://doi.org/10.1134/S0006297920030141>
 148. Woo P.C.Y., Huang Y., Lau S.K.P., Yuen K.Y. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses.* 2010; 2(8): 1805–20. <https://doi.org/10.3390/V2081803>
 149. Bartas M., Volná A., Beaudoin C.A., Poulsen E.T., Červeň J., Brázda V., et al. Unheeded SARS-CoV-2 proteins? A deep look into negative-sense RNA. *Brief. Bioinform.* 2022; 23(3): bbac045. <https://doi.org/10.1093/BIB/BBAC045>
 150. Zhong W., Reche P.A., Lai C.C., Reinhold B., Reinherz E.L. Genome-wide characterization of a viral cytotoxic T lymphocyte epitope repertoire. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(46): 45135–44. <https://doi.org/10.1074/JBC.M307417200>
 151. Hickman H.D., Mays J.W., Gibbs J., Kosik I., Magadán J.G., Takeda K., et al. Correction: influenza A virus negative strand RNA is translated for CD8 + T cell immunosurveillance. *J. Immunol.* 2018; 201(7): 2187. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1801100>
 152. Zhirnov O.P., Konakova T.E., Anhlan D., Stephan L., Isaeva E.I. Cellular immune response in infected mice to NSP protein encoded by the negative strand Ns RNA of influenza A virus. *Microbiol. Indep. Res. J.* 2019; (6), 28–36.
 153. Nguyen M., Haenni A.L. Expression strategies of ambisense viruses. *Virus Res.* 2003; 93(2): 141–50. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(03\)00094-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(03)00094-7)
 154. Панов А.Г. Клиника весенне-летних энцефалитов. *Невропатология и психиатрия.* 1938; 7(6): 18–32.
 155. Левкович Е.Н., Шубладзе А.К., Чумаков М.П., Соловьев В.Д., Шеболдаева А.Д. Этиология весенне-летнего энцефалита. *Архив биологических наук.* 1938; 52(2): 162–82.
 156. Зильбер Л.А., Левкович Е.Н., Шубладзе А.К., Чумаков М.П., Соловьев В.Д., Шеболдаева А.Д. Этиология весенне-летнего энцефалита. *Архив биологических наук.* 1938; 52(1): 162–83.
 157. Зильбер Л.А. Весенний (весенне-летний) эндемический клещевой энцефалит. *Архив биологических наук.* 1939; 56(2): 9–37.
 158. Шубладзе А.К., Сердюкова Г.В. Клещ Ixodes Persulcatus, как переносчик таежного энцефалита. *Архив биологических наук.* 1939; 56(2): 121–31.
 159. Смородинцев А.А. Итоги трехлетней работы советской медицины по изучению весенне-летнего (таежного, клещевого, эпидемического) энцефалита. *Архив биологических наук.* 1939; 56(2): 38–58.
 160. Логинова Н.В., Дерябин П.Г., Вашкова В.В. Биологическая характеристика коллекционных штаммов вирусов группы японского энцефалита. *Вопросы вирусологии.* 2015; 61(1): 17–20.
 161. Lvov D.K., Shchelkanov M.Y., Alkhovsky S.V., Deryabin P.G. *Zoonotic Viruses of Northern Eurasia: Taxonomy and Ecology.* London: Elsevier Academic Press; 2015.
 162. Злобин В.И., ред. *Клещевой энцефалит в XXI веке.* М.: Наука; 2021.
 163. Чумаков М.П. К итогам экспедиции института неврологии по изучению Омской геморрагической лихорадки (ОГЛ). *Вестник АМН СССР.* 1948; (2): 19–26.
 164. Чумаков М.П., Беляева А.П., Гагарина А.В., Славина Н.С. Выделение и изучение штаммов возбудителя омской геморрагической лихорадки. В кн.: *Эндемические вирусные инфекции (геморрагические лихорадки). Труды института полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР. Том 7.* М.; 1965: 327–44.
 165. Бутенко А.М., Чумаков М.П., Башкирцев В.Н. Выделение и изучение астраханского штамма «Дроздов» вируса Крымской геморрагической лихорадки и материалы по серодиагностике этой инфекции. В кн.: *Материалы 15 научной сессии Института полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР. Выпуск 3.* М.; 1968: 88–90.
 166. Чумаков М.П., Смирнова С.Е., Шалунова Н.В., Мартьянова Л.И., Флеер Т.П., Садыкова В.Д. и др. Выделение и изучение вируса из крови больного крымской геморрагической лихорадкой в Самаркандской области Узбекской ССР: Штамм Ходжа. В кн.: Чумаков М.П., ред. *Вирусные геморрагические лихорадки. Крымская геморрагическая лихорадка, Омская геморрагическая лихорадка, геморрагическая лихорадка с почечным синдромом. Труды Института полиомиелита и вирусных энцефалитов Академии медицинских наук СССР.* М.; 1971: 21–9.
 167. Simpson D.I., Knight E.M., Courtois G., Williams M.C., Weinbren M.P., Kibukamusoke J.W. Congo virus: a hitherto undescribed virus occurring in Africa. I. Human isolations – clinical notes. *East Afr. Med. J.* 1967; 44(2): 86–92.
 168. Колобухина Л.В., Львов Д.К. Крымская-Конго геморрагическая лихорадка. В кн.: Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных.* М.: МИА; 2013: 772–9.
 169. Chumakov M.P. Report on the isolation from ixodes persulcatus ticks and from patients in Western Siberia of a virus differing from the agent of tick-borne encephalitis. *Acta Virol.* 1963; 7: 82–3.
 170. Chumakov M.P., Sarmanova E.S., Bychkova M.V., Bannova G.G., Pivanova G.P., Karpovich L.G., et al. Identification of Kemerovo tick-borne fever virus and its antigenic independence. *Fed. Proc. Transl. Suppl.* 1964; 23: 852–4.
 171. Gresikova M. Kemerovo virus infection. In: Beran G., ed. *Hanbook Series in Zoonoses, Section B, Viral.* Boca Raton: CRC Press; 1981.
 172. Libikova H., Rehacek J., Somogyiova J. Viruses related to the Kemerovo virus in ixodes ricinus ticks in Czechoslovakia. *Acta Virol.* 1965; 9: 76–82.
 173. Львов Д.К., Ильичев В.Д., ред. *Миграция птиц и перенос возбудителей инфекции.* М.: Наука; 1979.
 174. Goodman R.A., Bauman C.F., Gregg M.B., Videtto J.F., Stroup D.F., Chalmers N.P. Epidemiologic field investigations by the centers for disease control and epidemic intelligence service, 1946–87. *Public Heal. Rep.* 1990; 105(6): 604–10.
 175. Langmuir A.D. The epidemic intelligence service of the center for disease control. *Public Heal. Rep.* 1980; 95(5): 470–7.
 176. Lvov D.K. Ecological soundings of the former USSR territory for natural foci of arboviruses. *Sov. Med. Rev. Virol.* 1993; 5: 1–47.
 177. Львов С. Д. Арбовирусы в высоких широтах. В кн.: Львов Д.К., Клименко С.М., Гайдамович С.Я. *Арбовирусы и арбовирусные инфекции.* М.: Медицина; 1989.
 178. Lvov S.D. Natural virus foci in high latitudes of Eurasia. *Sov. Med. Rev. E. Virol. Rev.* 1993; 5: 137–85.
 179. Львов С.Д., Громашевский В.Л., Канев Э.Ф., Богоявленский Г.В., Остроушко Т.С., Скворцова Т.М. и др. Циркуляция вирусос групп калифорнийского энцефалита и буньявируса (Bunyaviridae, Bunyavirus) на северо-востоке Русской равнины. *Вопросы вирусологии.* 1991; 36(1): 31–4.
 180. Львов С.Д., Громашевский В.Л., Аристова В.А., Морозова Т.Н., Скворцова Т.М., Гущина Е.А. и др. Выделение штаммов вируса Гета (семейство Togaviridae, род Alphavirus) в Северо-Восточной Азии. *Вопросы вирусологии.* 2000; 45(5): 14–8.
 181. Lvov D.K., Timofeeva A.A., Gromashevski V.L., Chervonsky V.I., Gromov A.I., Tsyarkin Y.M., et al. «Sakhalin» Virus – a new arbovirus isolated from ixodes (Ceraticodes) Putus Pick. – Camb. 1878 Collected on Tuleniy Island, Sea of Okhotsk. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1972; 38(2): 133–8.
 182. Lvov D.K., Timopheeva A.A., Gromashevski V.L., Gostinshchikova G.V., Veselovskaya O.V., Chervonski V.I., et al. «Zaliv Terpeniya» virus, a new Uukuniemi group arbovirus isolated from ixodes (Ceraticodes) putus Pick. – Camb. 1878 on Tyuleniy Island (Sakhalin Region) and Commodore Islands (Kamchatsk Region). *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1973; 41(3): 165–9.
 183. Lvov D.K., Chervonski V.I., Gostinshchikova I.N., Zemit A.S., Gromashevski V.L., Tsyarkin Y.M., et al. Isolation of Tyuleniy virus from ticks ixodes (Ceraticodes) putus Pick.-Camb. 1878 Collected on Commodore Islands. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1972; 38(2): 139–42.
 184. Lvov D.K., Timopheeva A.A., Gromashevski V.L., Tsyarkin Y.M., Veselovskaya O.V., Gostinshchikova G.V., et al. «Okhotskiy» Virus, a new arbovirus of the Kemerovo group isolated from ixodes (Ceraticodes) putus Pick. – Camb. 1878 in the Far East. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1973; 41(3): 160–4.
 185. Lvov D.K., Karas F.R., Timofeev E.M., Tsyarkin Y.M., Vargina S.G., Veselovskaya O.V., et al. «Issyk-Kul» virus, a new arbovirus isolated from bats and argas (Carios) Vespertilionis (Latr., 1802) in the Kirghiz S.S.R. brief report. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1973; 42(2): 207–9.
 186. Lvov D.K., Sidorova G.A., Gromashevsky V.L., Kurbanov M., Skvoztsova L.M., Gofman Y.P., et al. Virus “Tamdy” – a new arbovirus, isolated in the Uzbek S.S.R. and Turkmen S.S.R. from Ticks Hyalomma Asiaticum Asiaticum Schulee et Schlottke, 1929 and Hyalomma Plumbeum Plumbeum Panzer, 1796. *Arch. Virol.* 1976; 51(1–2): 15–21.

187. Alkhovsky S.V., Lvov D.K., Shchetinin A.M., Deriabin P.G., Shchelkanov M.Y., Aristova V.A., et al. Complete genome coding sequences of Artashat, Burana, Caspiy, Chim, Geran, Tamdy, and Uzun-Agach Viruses (Bunyavirales: Nairoviridae: Orthonairovirus). *Genome Announc.* 2017; 5(40): e01098-17. <https://doi.org/10.1128/GENOMEA.01098-17>
188. Lvov D.K., Tsyarkin Y.M., Karas F.R., Timopheev E.M., Gromashevskiy V.L., Veselovskaya O.V., et al. «Sokuluk» virus, a new group B arbovirus isolated from *Vespertilio Pipistrellus* Schreber, 1775, Bat in the Kirghiz S.S.R. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1973; 41(3): 170–4.
189. Львов Д.К., Дерябин П.Г., Аристова В.А., Бутенко А.М., Галкина И.В., Громашевский В.Л. и др. *Атлас распространения возбудителей природно-очаговых вирусных инфекций на территории Российской Федерации.* М.; 2001.
190. Львов Д.Н., Щелканов М.Ю., Джаркенов А.Ф., Галкина И.В., Колобухина Л.В., Аристова В.А. и др. Популяционные взаимодействия вируса Западного Нила (Flaviviridae, Flavivirus) с членистоногими переносчиками, позвоночными животными, людьми в среднем и нижнем поясах дельты Волги, 2001–2006 гг. *Вопросы вирусологии.* 2009; 54(2): 36–43.
191. Павловский Е.Н. *Природная очаговость трансмиссивных болезней в связи с ландшафтной эпидемиологией зооантропонозов.* М.–Ленинград: Наука; 1964.
192. Львов Д.К., Клименко С.М., Гайдамович С.Я. *Арбовирусы и арбовирусные инфекции.* М.: Медицина; 1989.
193. Lipkin W.I., Firth C. Viral surveillance and discovery. *Curr. Opin. Virol.* 2013; 3(2): 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.03.010>
194. Lipkin W.I. The changing face of pathogen discovery and surveillance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013; 11(2): 133–41. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2949>
195. Koonin E.V., Dolja V.V., Krupovic M. Origins and evolution of viruses of eukaryotes: the ultimate modularity. *Virology.* 2015; 479–480: 2–25. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.039>
196. Li C.X., Shi M., Tian J.H., Lin X.D., Kang Y.J., Chen L.J., et al. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *Elife.* 2015; 2015(4): e05378. <https://doi.org/10.7554/eLife.05378>
197. Shi M., Lin X.D., Tian J.H., Chen L.J., Chen X., Li C.X., et al. Redefining the Invertebrate RNA Virosphere. *Nature.* 2016; 540(7634): 539–43. <https://doi.org/10.1038/nature20167>
198. Львов Д.К. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных.* М.: МИА; 2013.
- sion. *J. Hyg. (Lond.)* 1902; 2(2): 101–19. <https://doi.org/10.1017/s0022172400001856>
11. Lvov D.K. Birth and development of virology – the history of emerging-reemerging viral infection investigation. *Voprosy virusologii.* 2012; 57(S1): 5–20. (in Russian)
12. Lvov D.K. The importance of newly emerging infections in biosafety. *Voprosy virusologii.* 2002; 47(5): 4–7. (in Russian)
13. Haeckel E. *Generelle Morphologie der Organismen. Allgemeine Grundzüge der organischen Formen-Wissenschaft, mechanisch begründet durch die von Charles Darwin reformirte Descendenz-Theorie.* Berlin; 1866.
14. Fisher R. *The Genetical Theory of Natural Selection.* Oxford: Clarendon Press; 1930.
15. Mettler L.E., Gregg T.G. *Population Genetics and Evolution.* Trenton: Prentice-Hall; 1969.
16. Williamson M. *The Analysis of Biological Populations.* London; 1972.
17. Lvov D.K., Gulyukin M.I., Zaberezhnyy A.D., Gulyukin A.M. Formation of population gene pools of zoonotic viruses, potentially threatening biosafety. *Voprosy virusologii.* 2020; 65(5): 243–58. (in Russian)
18. Lvov D.K. Influenza A virus – a sum of populations with a common protected gene pool. In *Sov. Med. Rev. Virol.* 1987; 2: 15–37.
19. Mahy B.W., Lvov D.K. *Concepts in Virology: From Ivanovsky to the Present.* Switzerland: Harwood Academic Publisher GmbH; 1993.
20. Zhdanov V.M., Lvov D.K., Zaberezhnyy A.D. The place of viruses in the biosphere. *Voprosy virusologii.* 2012; 57(S): 21–32. (in Russian)
21. Zhdanov V.M., Lvov D.K. *Ecology of Infectious Agents [Ekologiya vozбудiteley infektsiy].* Moscow: Meditsina; 1984. (in Russian)
22. Lvov D.K., Borisevich S.V., Al'khovskiy S.V., Burtseva E.I. Relevant approaches to analysis of viral genomes for biosafety. *Infektsionnye bolezni. Novosti. Lechenie. Obuchenie.* 2019; 8(2): 96–101. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-12012> (in Russian)
23. Stoma I.O. *General Vaccinology [Obshchaya vaktzinologiya].* Minsk; 2022. (in Russian)
24. Shchelkunov S.N., Marennikova S.S., Blinov V.M., Resenchuk S.M. The complete coding sequence of the smallpox virus genome. *Doklady Akademii Nauk SSSR.* 1993; 328: 629–32. (in Russian)
25. Henderson D.A. Smallpox eradication – the final battle. *J. Clin. Pathol.* 1975; 28(11): 843–9. <https://doi.org/10.1136/JCP.28.11.843>
26. Fenner F., Henderson D.A., Arita I., Jezek Z., Ladnyi I.D. *Smallpox and its eradication.* Geneva: WHO; 1988.
27. Lvov D.K., Zverev V.V., Gintsburg A.L., Pal'tsev A.M. Smallpox is a dormant volcano. *Voprosy virusologii.* 2008; 53(4): 4–8. (in Russian)
28. Shchelkunov S.N. Whether re-emergence of smallpox could be? *Molekulyarnaya meditsina.* 2011; (4): 36–41. (in Russian)
29. Shchelkunov S.N. How long ago did smallpox virus emerge? *Arch. Virol.* 2009; 154(12): 1885–71. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0536-0>
30. Shchelkunov S.N., Shchelkunova G.A. We should be prepared to smallpox re-emergence. *Voprosy virusologii.* 2019; 64(5): 206–14. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-206-214> (in Russian)
31. Ladnyj I.D., Ziegler P., Kima E. A human infection caused by monkeypox virus in basankusu territory, democratic Republic of the Congo. *Bull. World Health Organ.* 1972; 46(5): 593–7.
32. Huhn G.D., Bauer A.M., Yorita K., Graham M.B., Sejvar J., Likos A., et al. Clinical characteristics of human monkeypox, and risk factors for severe disease. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 41(12): 1742–51. <https://doi.org/10.1086/498115>
33. Chastel C. Human monkeypox. *Pathol. Biol. (Paris).* 2009; 57(2): 175–83. <https://doi.org/10.1016/J.PATBIO.2008.02.006>
34. Rimoin A.W., Mulembakani P.M., Johnston S.C., Lloyd Smith J.O., Kisalu N.K., Kinkela T.L., et al. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the democratic Republic of Congo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010; 107(37): 16262–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005769107>
35. Nakazawa Y., Emerson G.L., Carroll D.S., Zhao H., Li Y., Reynolds M.G., et al. Phylogenetic and ecologic perspectives of a monkeypox outbreak, Southern Sudan, 2005. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(2): 237–45. <https://doi.org/10.3201/eid1902.121220>
36. Khodakevich L., Szczeniowski M., Manbu-ma-Disu, Jezek Z., Marennikova S., Nakano J., et al. The role of squirrels in sustaining monkeypox virus transmission. *Trop. Geogr. Med.* 1987; 30: 115–22.

REFERENCES

1. Mayer A. Über die Mosaikkrankheit des Tabaks. *Die Landwirtschaftl. Versuchsstationen.* 1886; 32: 451–67.
2. Ivanovskiy D.I. About two diseases of tobacco. Tobacco ash, mosaic disease. *Sel'skoe khozyaystvo i lesovodstvo.* 1892; CCIX(2): 104–21. (in Russian)
3. Iwanowski D. Über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze. *St. Petersburg. Acad. Imp. Sci. Bull.* 1892; 35: 67–70.
4. Ivanovskiy D.I. Mosaic tobacco disease. *Trudy Varshavskogo Universiteta.* 1892; (6): 49–72. (in Russian)
5. Beijerinck M.W. Über ein contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter. *Verhandelingen der Koninklyke Akademie van Wetenschappen te Amsterdam.* 1898; 65(5): 1–22.
6. Beijerinck M.W. Bemerkung zu dem Aufsatz von Herrn Iwanowsky über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abteilung II.* 1899; (5): 310–1.
7. Zhirmov O.P., Georgiev G.P. D.I. Ivanovsky – a pioneer discoverer of viruses, as a new form of biological life. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2017; 72(1): 84–6. <https://doi.org/10.15690/vramn810> (in Russian)
8. Stanley W.M. Soviet studies on viruses. *Science.* 1944; 99(2564): 136–8. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.99.2564.136>
9. Loeffler F., Frosch P. Summarischer Bericht über die ergebnisse der untersuchungen der Kommission zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche. *Dtsch Medizinische Wochenschrift.* 1897; 23(39): 617. <https://doi.org/10.1055/S-0029-1205172>
10. Reed W. Recent researches concerning the etiology, propagation, and prevention of yellow fever, by the united states army commis-

37. Guarner J., Johnson B.J., Paddock C.D., Shieh W.J., Goldsmith C.S., Reynolds M.G., et al. Monkeypox transmission and pathogenesis in prairie dogs. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10(3): 426–31. <https://doi.org/10.3201/eid1003.030878>.
38. Emerson G.L., Li Y., Frace M.A., Olsen-Rasmussen M.A., Khristova M.L., Govil D., et al. The phylogenetics and ecology of the orthopoxviruses endemic to North America. *PLoS One.* 2009; 4(10): e7666. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007666>
39. CDC Update: Multistate Outbreak of Monkeypox – Illinois, Indiana, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin. *MMWR.* 2003; 52(27): 642–6.
40. Borisevich S.V., Marennikova S.S., Stovba L.F., Petrov A.A., Kratkov V.T., Mekhlai A.A. Buffalo pox. *Voprosy virusologii.* 2016; 61(5): 200–4. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-5-200-204> (in Russian)
41. WHO. Report 1. Multi-Country Outbreak of Monkeypox; 2022.
42. De Clercq E. Cidofovir in the treatment of poxvirus infections. *Antiviral. Res.* 2002; 55(1): 1–13. [https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(02\)00008-6](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(02)00008-6)
43. Quenelle D.C., Collins D.J., Wan W.B., Beadle J.R., Hostetler K.Y., Kern E.R. Oral treatment of cowpox and vaccinia virus infections in mice with ether lipid esters of Cidofovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48(2): 404–12. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.2.404-412.2004>.
44. Smith S.K., Olson V.A., Karem K.L., Jordan R., Hruby D.E., Damon I.K. In vitro efficacy of ST246 against smallpox and monkeypox. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53(3): 1007–12. <https://doi.org/10.1128/AAC.01044-08>
45. Kennedy J.S., Greenberg R.N. IMVAMUNE: Modified Vaccinia Ankara Strain as an Attenuated Smallpox Vaccine. *Expert Rev. Vaccines.* 2009; 8(1): 13–24. <https://doi.org/10.1586/14760584.8.1.13>
46. Hatch G.J., Graham V.A., Bewley K.R., Tree J.A., Dennis M., Taylor I., et al. Assessment of the protective effect of imvamune and Acam2000 vaccines against aerosolized monkeypox virus in cynomolgus macaques. *J. Virol.* 2013; 87(14): 7805–15. <https://doi.org/10.1128/JVI.03481-12>
47. Vollmar J., Arndt N., Eckl K.M., Thomsen T., Petzold B., Mateo L., et al. Safety and Immunogenicity of IMVAMUNE, a promising candidate as a third generation smallpox vaccine. *Vaccine.* 2006; 24(12): 2065–70. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.11.022>
48. Hammarlund E., Lewis M.W., Hansen S.G., Strelow L.I., Nelson J.A., Sexton G.J., et al. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat. Med.* 2003; 9(9): 1131–7. <https://doi.org/10.1038/NM917>
49. Methodological guidelines. MU 3.3.1 2044-06. Conducting vaccinoprophylaxis of smallpox. Moscow; 2006. (in Russian)
50. Elakov A.L. Anti-rabies vaccines applied in the Russian Federation and perspectives for their improvement. *Voprosy virusologii.* 2022; 67(2): 107–14. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-102> (in Russian)
51. Zaykova O.N., Grebennikova T.V., Losich M.A., Elakov A.L., Gulyukin A.M., Metlin A.E. Comparative molecular and genetic characterization of rabies viruses (rabies lyssavirus, lyssavirus, rhabdoviridae) circulated in the Russian Federation in 1985-2016. *Voprosy virusologii.* 2020; 65(1): 41–8. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-41-48> (in Russian)
52. Zverev V.V., Yuminova N.V. Vaccines. Prevention of viral infections from E. Jenner to date. *Voprosy virusologii.* 2012; (S1): 33–42. (in Russian)
53. Medunitsyn N.V. *Vaccinology [Vaksinologiya]*. Moscow; 2010. (in Russian)
54. Kostinov M.P. *Adult Vaccination – from Strategy to Tactics [Vaksinatziya vzroslykh – ot strategii k taktike]*. Moscow: Gruppa MDV; 2020. (in Russian)
55. Borisevich S.V., Khromov E.N., Kovtun A.L., eds. *Non-Endemic and Exotic Viral Infections: Etiology, Diagnosis and Prevention [Neendemicheskie i ekzoticheskie virusnye infektsii: etiologiya, diagnostika i profilaktika]*. Moscow; 2014. (in Russian)
56. Onishchenko G.G., Kuttyrev V.V., eds. *Sanitary Protection of the Territories of the Russian Federation in Modern Conditions [Sanitarnaya okhrana territoriy Rossiyskoy Federatsii v sovremennykh usloviyakh]*. Saratov: Bukva; 2014. (in Russian)
57. Certification of poliomyelitis eradication: Fifteenth meeting of the European Regional Certification Commission. Copenhagen; 2002.
58. Logunov D.Y., Dolzhikova I. V., Zubkova O.V., Tukhvatullin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., et al. Safety and immunogenicity of an RAd26 and RAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: Two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet.* 2020; 396(10255): 887–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
59. Kagan N.V. Experimental materials for the immunization of mice against spring-summer (tick-borne) encephalitis with live and killed virus preparations. *Arkhiv biologicheskikh nauk.* 1939; 56(2): 97–111. (in Russian)
60. Pen'evskaya M.A. Specific prevention of tick-borne encephalitis. In: Zlobin V.I., ed. *Tick-Borne Encephalitis in the XXI Century [Kleshchevoy entsefalit v XXI veke]*. Moscow: Nauka; 2021: 422–53. (in Russian)
61. Chumakov M.P., Lvov D.K., Sarmanova E.S., Naydich K.M., Chumakov N.F. Comparative study of the epidemiological effectiveness of brain and culture vaccine vaccinations against tick-borne encephalitis. *Voprosy virusologii.* 1963; 8(3): 307–15. (in Russian)
62. Levkovich E.N., Zasukhina G.D. Tissue culture vaccines against tick-borne encephalitis. *Vestnik Akademii meditsinskikh nauk SSSR.* 1960; (1): 53–7. (in Russian)
63. Lvov D.K. Immunoprophylaxis Of tick-borne encephalitis. Moscow; 1965. (in Russian)
64. Vorob'eva M.S., Shcherbinina M.S. Modern concentrated antigenic culture vaccines for immunoprophylaxis of tick-borne encephalitis In: Zlobin V.I., ed. *Tick-Borne Encephalitis in the XXI Century [Kleshchevoy entsefalit v XXI veke]*. Moscow: Nauka; 2021: 409–21. (in Russian)
65. Karganova G.G. Genetic variability of tick-borne encephalitis virus: fundamental and applied aspects. In: Lvov D.K., Uryvaev L.V., eds. *Studying the Evolution of Viruses within the Framework of Biosafety Problems and Socially Significant Infections [Izucheniye evolyutsii virusov v ramkakh problem biobezopasnosti i sotsial'no-znachimyykh infektsiy]*. Moscow; 2011: 190–9. (in Russian)
66. Ehrlich P. Chemotherapeutic studies on trypanosomes Ehrlich 1907. *J. Roy. Inst. Pub. Heal.* 1907; (15): 449–56.
67. De Chassez B., Meyniel-Schicklin L., Aublin-Gex A., André P., Lotteau V. New horizons for antiviral drug discovery from virus-host protein interaction networks. *Curr. Opin. Virol.* 2012; 2(5): 606–13. <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2012.09.001>
68. Kumar N., Sharma S., Kumar R., Tripathi B.N., Barua S., Ly H., et al. Host-directed antiviral therapy. *Clin. Microbiol. Rev.* 2020; 33(3): e00168-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00168-19>.
69. Zhirnov O.P., Klenk H.D., Wright P.F. Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza. *Antiviral. Res.* 2011; 92(1): 27–36. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2011.07.014>
70. Tampere M., Pettke A., Salata C., Wallner O., Koolmeister T., Cazares-Körner A., et al. Novel broad-spectrum antiviral inhibitors targeting host factors essential for replication of pathogenic RNA viruses. *Viruses.* 2020; 12(12): 1423. <https://doi.org/10.3390/V12121423>
71. Zhirnov O.P. Molecular targets in the chemotherapy of coronavirus infection. *Biochemistry. (Mosc.)* 2020; 85(5): 523–30. <https://doi.org/10.1134/S0006297920050016>
72. Roche M., Salimi H., Duncan R., Wilkinson B.L., Chikere K., Moore M.S., et al. A common mechanism of clinical HIV-1 resistance to the CCR5 antagonist maraviroc despite divergent resistance levels and lack of common Gp120 resistance mutations. *Retrovirology.* 2013; 10: 43. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-43>
73. Lieberman-Blum S.S., Fung H.B., Bandres J.C. Maraviroc: A CCR5-receptor antagonist for the treatment of HIV-1 infection. *Clin. Ther.* 2008; 30(7): 1228–50. [https://doi.org/10.1016/S0149-2918\(08\)80048-3](https://doi.org/10.1016/S0149-2918(08)80048-3)
74. Ma C., Li F., Musharrafieh R.G., Wang J. Discovery of cyclosporine A and its analogs as broad-spectrum anti-influenza drugs with a high in vitro genetic barrier of drug resistance. *Antiviral. Res.* 2016; 133: 62–72. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2016.07.019>
75. Shimizu Y., Shirasago Y., Kondoh M., Suzuki T., Wakita T., Hanada K., et al. Monoclonal antibodies against occludin completely prevented hepatitis C virus infection in a mouse model. *J. Virol.* 2018; 92(8): e02258-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.02258-17>
76. Yamashita M., Iida M., Tada M., Shirasago Y., Fukasawa M., Nagase S., et al. Discovery of anti-claudin-1 antibodies as candidate therapeutics against hepatitis C virus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2015; 353(1): 112–8. <https://doi.org/10.1124/JPET.114.217653>
77. Dwek R.A., Bell J.I., Feldmann M., Zitzmann N. Host-targeting oral antiviral drugs to prevent pandemics. *Lancet.* 2022; 399(10333): 1381–2. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(22\)00454-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)00454-8)

78. Zheng Y., Li S., Song K., Ye J., Li W., Zhong Y., et al. A broad antiviral strategy: Inhibitors of human DHODH pave the way for host-targeting antivirals against emerging and re-emerging viruses. *Viruses*. 2022; 14(5): 928. <https://doi.org/10.3390/V14050928>
79. Bojkova D., Bechtel M., McLaughlin K.M., McGreig J.E., Klann K., Bellinghausen C., et al. Aprotinin inhibits SARS-CoV-2 replication. *Cells*. 2020; 9(11): 2377. <https://doi.org/10.3390/CELLS9112377>.
80. Zhirnov O.P., Bokova N.O., Isaeva E.I., Vorob'eva I.V., Malyshev N.A. Pathogenetic treatment of influenza patients with aerosolized form of aprotinin, a protease inhibitor. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2015; (4): 59–64. (in Russian)
81. Redondo-Calvo F.J., Padín J.F., Muñoz-Rodríguez J.R., Serrano-Oviedo L., López-Juárez P., Porras Leal M.L., et al. Aprotinin treatment against SARS-CoV-2: A randomized phase III study to evaluate the safety and efficacy of a pan-protease inhibitor for moderate COVID-19. *Eur. J. Clin. Invest.* 2022; 52(6): e13776. <https://doi.org/10.1111/ECI.13776>
82. Shakhgil'dyan I.V., Mikhaylov M.I., Onishchenko G.G. *Parenteral Viral Hepatitis (Epidemiology, Diagnosis, Prevention) [Parenteral'nye virusnyye gepatity (epidemiologiya, diagnostika, profilaktika)]*. Moscow; 2003. (in Russian)
83. Mikhaylov M.I. Aspects of the study of hepatitis B at the present stage. In: Lvov D.K., Uryvaev L.V., eds. *Studying the Evolution of Viruses within the Framework of Biosafety Problems and Socially Significant Infections [Izucheniye evolyutsii virusov v ramkakh problem biobezopasnosti i sotsial'no-znachimyykh infektsiy]*. Moscow; 2011: 77–87. (in Russian)
84. Isaeva O.V., Kyuregyan K.K., Mikhaylov M.I. Animal delta-like viruses (Kolmioviridae: deltavirus) and the origin of the human hepatitis D virus (HDV). *Voprosy virusologii*. 2021; 66(5): 340–5. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-78> (in Russian)
85. Wei N.C., Chong J.O. Hepatitis B virus mutants: an overview. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2002; 17(Suppl. 4): S497–9. <https://doi.org/10.1046/J.1440-1746.17.S4.17.X>
86. Mason W.S., Gerlich W.H., Taylor J.M., Kann M., Mizokami T., Loeb D., et al. Family Hepadnaviridae. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. *Virus Taxonomy. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press; 2011: 445–55.
87. Deryabin P.G., Shakhgil'dyan I.V. Hepatitis C: fundamental and applied problems. In: Lvov D.K., Uryvaev L.V., eds. *Studying the Evolution of Viruses within the Framework of Biosafety Problems and Socially Significant Infections [Izucheniye evolyutsii virusov v ramkakh problem biobezopasnosti i sotsial'no-znachimyykh infektsiy]*. Moscow; 2011: 88–98. (in Russian)
88. Sokolova T.M. Hepatitis C virus (Flaviviridae: Hepacivirus: Hepacivirus C): regulation of signaling reactions of innate immunity. *Voprosy virusologii*. 2021; 65(6): 307–16. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-6-1> (in Russian)
89. Alter M.J. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13(17): 2436–41. <https://doi.org/10.3748/WJG.V13.I17.2436>
90. Simmonds P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus – 15 years on. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(Pt. 11): 3173–88. <https://doi.org/10.1099/VIR.0.80401-0>
91. Lvov D.K. Viral hepatitis C is a «gentle killer». *Rossiyskiy gastroenterologicheskyy zhurnal*. 1995; (1): 4–6. (in Russian)
92. Lvov D.K., Samokhvalov E.I., Tsuda F., Selivanov N.A., Okamoto H., Stakhanova V.M., et al. Prevalence of hepatitis C virus and distribution of its genotypes in Northern Eurasia. *Arch. Virol.* 1996; 141(9): 1613–22. <https://doi.org/10.1007/bf01718286>
93. Uryvaev L.V., Bobkova M.R., Lapovok I.A. VICH-Infektsiya – vyzov chelovechestvu. Est' li shansy pobedit' zaboolevanie. *Voprosy virusologii*. 2012; (S1): 104–26. (in Russian)
94. Bobkova M.R. *HIV Latency [Latentnost' VICH]*. Moscow: Chelovek; 2021. (in Russian)
95. Ozhmegova E.N., Bobkova M.R. HIV drug resistance: past and current trends. *Voprosy virusologii*. 2022; 67(3): 193–205. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-113> (in Russian)
96. Aliper T.I., Zaberezhnyy A.D., Grebennikova T.V. African swine fever in Russian Federation. *Voprosy virusologii*. 2012; (S1): 127–36. (in Russian)
97. Vlasova N.N., Verkhovskiy O.A., Aliper T.I., Kapustina O.V., Alekseev K.P., Yuzhakov A.G., et al. Problems of specific prevention of African swine fever. *Voprosy virusologii*. 2022; 67(3): 206–16. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-117> (in Russian)
98. 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. *Voprosy virusologii*. 2022; 67(1): 18–26. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-96> (in Russian)
99. Galegov G.A., Andronova V.L., Kolobukhina L.V., Lvov D.K. Specific and effective drug therapy for widely distributed viral infections of humans. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(S1): 180–98. (in Russian)
100. Gambaryan A.S., Tuzikov A.B., Piskarev V.E., Yamnikova S.S., Lvov D.K., Robertson J.S., et al. Specification of receptor-binding phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: non-egg-adapted human H1 and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6'-sialyl (N-acetyl)lactosamine. *Virology*. 1997; 232(2): 345–50. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8572>
101. Lvov D.K., Shchelkanov M.Yu., Bovin N.V., Malyshev N.A., Chuchalin A.G., Kolobukhina L.V., et al. Correlation between receptor specificity of pandemic influenza A (H1N1)pdm09 virus strains isolated in 2009–2011 and the structure of the receptor-binding site and the probability of fatal primary viral pneumonia. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(1): 14–20. (in Russian)
102. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Ignat'eva A.V. Antigenic structure of influenza A virus hemagglutinin. *Voprosy virusologii*. 2012; 57(S1): 148–58. (in Russian)
103. Ershov F.I. Modern classes of antiviral drugs. *Voprosy virusologii*. 2012; (S1): 169–79. (in Russian)
104. Yatsyshina S.B., Mamoshina M.V., Shipulina O.Yu., Podkolzin A.T., Akimkin V.G. Analysis of human coronaviruses circulation. *Voprosy virusologii*. 2020; 65(5): 267–76. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-5-3>(in Russian)
105. Lvov D.K. Population interactions in biological system: influenza virus A – wild and domestic animals – human; reasons and consequences of introduction high pathogenic influenza virus A/H5N1 on Russian territory. *Zhurnal mikrobiologii epidemiologii i immunobiologii*. 2006; 83(3): 96–100. (in Russian)
106. WHO. Avian Influenza Weekly Update N852. Human Infection with Influenza A/H5 Virus; 2022.
107. WHO. Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness; 2017.
108. Suarez D.L. Influenza A virus. In: *Avian Influenza*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.; 2009: 1–22.
109. Matrosovich M.N., Gambaryan A.S., Teneberg S., Piskarev V.E., Yamnikova S.S., Lvov D.K., et al. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology*. 1997; 233(1): 224–34. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8580>
110. Lvov D.K., Yashkulov K.B., Prilipov A.G., Burtseva E.I., Shchelkanov M.Yu., Shlyapnikova O.V., et al. Detection of amino acid substitutions of asparaginic acid for glycine and asparagine at the receptor-binding site of hemagglutinin in the variants of pandemic influenza A/H1N1 virus from patients with fatal outcome and moderate form of the disease. *Voprosy virusologii*. 2010; 55(3): 15–8. (in Russian)
111. Lvov D.K., Burtseva E.I., Shchelkanov M.Yu., Prilipov A.G., Kolobukhina L.V., Malyshev N.A., et al. Spread of new pandemic influenza A(H1N1)V virus in Russia. *Voprosy virusologii*. 2010; 55(3): 4–9. (in Russian)
112. Kilander A., Rykkvin R., Dudman S.G., Hungnes O. Observed association between the HA1 mutation D222G in the 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus and severe clinical outcome, Norway 2009–2010. *Euro Surveill* 2010; 15(9): 19498. <https://doi.org/10.2807/ese.15.09.19498-en>
113. Mak G.C., Au K.W., Tai L.S., Chuang K.C., Cheng K.C., Shiu T.C., et al. Association of D222G substitution in haemagglutinin of 2009 pandemic influenza A (H1N1) with severe disease. *Eur. Surveill*. 2010; 15(14): 19534.
114. Puzelli S., Facchini M., Spagnolo D., De Marco M.A., Calzoletti L., Zanetti A., et al. Transmission of hemagglutinin D222G mutant strain of pandemic (H1N1) 2009 virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16(5): 863–5. <https://doi.org/10.3201/eid1605.091815>

115. Herfst S., Schrauwen E.J., Linster M., Chutinimitkul S., de Wit E., Munster V.J., et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science*. 2012; 336(6088): 1534–41. <https://doi.org/10.1126/science.1213362>
116. Imai M., Watanabe T., Hatta M., Das S.C., Ozawa M., Shinya K., et al. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature* 2012; 486(7403): 420–8. <https://doi.org/10.1038/nature10831>
117. Hayden F.G., Sugaya N., Hirotsu N., Lee N., de Jong M.D., Hurt A.C., et al. Baloxavir Marboxil for Uncomplicated Influenza in Adults and Adolescents. *N. Engl. J. Med.* 2018; 379(10): 913–23. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716197>
118. Garaev T.M., Odnorov A.I., Kirillova E.S., Burtseva E.I., Finogenova M.P., Mukasheva E.A., et al. Adamantan derivatives capable of inhibiting the reproduction of a rimantadine resistant strain of influenza A(H1N1)pdm09 virus (influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae). *Voprosy virusologii.* 2020; 65(1): 16–20. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-16-20> (in Russian)
119. Richman D.D. Antiretroviral drug resistance: mechanisms, pathogenesis, clinical significance. *Antiviral Chemother.* 1996; 4: 383–95.
120. Lvov D.K., Al'khovskiy S.V. Source of the covid-19 pandemic: ecology and genetics of coronaviruses (betacoronavirus: coronavirusidae) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (subgenus sarbecovirus), and MERS-CoV (subgenus merbecovirus). *Voprosy virusologii.* 2020; 65(2): 62–70. (in Russian)
121. Lvov D.K., Al'khovskiy S.V., Kolobukhina L.V., Burtseva E.I. Etiologiya epidemicheskoy vspyskhi COVID-19 v g. Ukhan' (provintsiya Khubey, Kitayskaya Narodnaya Respublika), assotsiirovannoy s Virusom 2019-NCov (Nidovirales, Coronaviridae, Coronavirinae, Betacoronavirus, podrod Sarbecovirus): Uroki epidemii SARS-CoV. *Voprosy virusologii.* 2020; 65(1): 6–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-6-15> (in Russian)
122. Drosten C., Gunther S., Preiser W., van der Werf S., Brodt H.R., Becker S., et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348(20): 1967–76. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa030747>
123. Haagmans B.L., Al Dhahiry S.H.S., Reusken C.B.E.M., Raj V.S., Galiano M., Myers R., et al. Middle east respiratory syndrome coronavirus in dromedary camels: an outbreak investigation. *Lancet Infect. Dis.* 2014; 14(2): 140–5. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70690-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70690-X)
124. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(8): 727–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
125. Leshin S.V., Romashin A.V., Vyshemirskiy O.I., Lvov D.K., Al'khovskiy S.V. Bats of the subtropical climate zone of the Krasnodar territory of Russia as a possible reservoir of zoonotic viral infections. *Voprosy virusologii.* 2021; 66(2): 112–22. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-41> (in Russian)
126. Fan Y., Zhao K., Shi Z.L., Zhou P. Bat coronaviruses in China. *Viruses.* 2019; 11(3): 210. <https://doi.org/10.3390/v11030210>
127. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020; 579(7798): 270–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
128. Zhou H., Ji J., Chen X., Bi Y., Li J., Wang Q., et al. Identification of novel bat coronaviruses sheds light on the evolutionary origins of SARS-CoV-2 and related viruses. *Cell.* 2021; 184(17): 4380–91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.008>
129. Zhou H., Chen X., Hu T., Li J., Song H., Liu Y., et al. A novel bat coronavirus closely related to SARS-CoV-2 contains natural insertions at the S1/S2 cleavage site of the spike protein. *Curr. Biol.* 2020; 30(11): 2196–203.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.05.023>
130. Temmam S., Pasteur I., Vongphayloth K., Salazar E.B., Munier S., Bonomi M. Coronaviruses with a SARS-CoV-2-like receptor-binding domain allowing ACE2-mediated entry into human cells isolated from bats of Indochinese peninsula. 2021. Preprint. <https://doi.org/10.21203/RS.3.RS-871965/V1>
131. Alkhovskiy S., Leshin S., Romashin A., Vishnevskaya T., Vyshemirskiy O., Bulycheva Y., et al. SARS-like coronaviruses in Horseshoe bats (*Rhinolophus* Spp.) in Russia, 2020. *Viruses.* 2022; 14(1): 113. <https://doi.org/10.3390/V14010113>
132. de Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S., Enjuanes L., Gorbalenya A.E., Holmes K.V., et al. Family coronaviridae. In: King A.M., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., eds. *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier: London; 2012: 806–28.
133. Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature.* 2003; 426(6965): 450–4. <https://doi.org/10.1038/nature02145>
134. Ren W., Qu X., Li W., Han Z., Yu M., Zhou P., et al. Difference in receptor usage between Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) coronavirus and SARS-like coronavirus of bat origin. *J. Virol.* 2008; 82(4): 1899–907. <https://doi.org/10.1128/jvi.01085-07>
135. Ge X.Y., Li J.L., Yang X.L., Chmura A.A., Zhu G., Epstein J.H., Mazet J.K., et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature.* 2013; 503(7477): 535–8. <https://doi.org/10.1038/nature12711>
136. Hu B., Zeng L.P., Yang X.L., Ge X.Y., Zhang W., Li B., et al. Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the Origin of SARS coronavirus. *PLoS Pathog.* 2017; 13(11): e1006698. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006698>
137. Lau S.K.P., Feng Y., Chen H., Luk H.K.H., Yang W.H., Li K.S.M., et al. Severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus ORF8 protein is acquired from SARS-Related coronavirus from greater horseshoe bats through recombination. *J. Virol.* 2015; 89(20): 10532–47. <https://doi.org/10.1128/jvi.01048-15>
138. Ge X.Y., Wang N., Zhang W., Hu B., Li B., Zhang Y.Z., et al. Co-existence of multiple coronaviruses in several bat colonies in an abandoned mineshaft. *Virol. Sin.* 2016; 31(1): 31–40. <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3713-9>
139. Zhirnov O.P., Poyarkov S.V., Vorob'eva I.V., Safonova O.A., Malyshov N.A., Klenk H.D. Segment NS of influenza A virus contains an additional gene NSP in positive-sense orientation. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2007; 414(1): 127–33. <https://doi.org/10.1134/S1607672907030106>
140. Zhirnov O.P., Vorobjeva I.V., Saphonova O.A., Poyarkov S.V., Ovcharenko A.V., Anhlan D., et al. Structural and evolutionary characteristics of HA, NA, NS and M genes of clinical influenza A/H3N2 viruses passaged in human and canine cells. *J. Clin. Virol.* 2009; 45(4): 322–33. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.05.030>
141. Zhirnov O.P., Poyarkov S.V. Novel negative sense genes in the RNA genome of coronaviruses. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2021; 496(1): 27–31. <https://doi.org/10.1134/S1607672921010130>
142. Zhirnov O. Ambisense polarity of genome RNA of orthomyxoviruses and coronaviruses. *World J. Virol.* 2021; 10(5): 256–63. <https://doi.org/10.5501/WJV.V10.I5.256>
143. Zhirnov O.P., Akulich K.A., Lipatova A.V., Usachev E.V. Negative-sense virion RNA of segment 8 (NS) of influenza A virus is able to translate in vitro a new viral protein. *Dokl. Biochem. Biophys.* 2017; 473(1): 122–7. <https://doi.org/10.1134/S1607672917020090>
144. Kearsle M.G., Wilusz J.E. Non-AUG translation: A new start for protein synthesis in eukaryotes. *Genes Dev.* 2017; 31(17): 1717–31. <https://doi.org/10.1101/GAD.305250.117>
145. Acevedo J.M., Hoermann B., Schlimbach T., Teleman A.A. Changes in global translation elongation or initiation rates shape the proteome via the Kozak sequence. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 4018. <https://doi.org/10.1038/S41598-018-22330-9>
146. Kolekar P., Pataskar A., Kulkarni-Kale U., Pal J., Kulkarni A. IRESPred: web server for prediction of cellular and viral internal ribosome entry site (IRES). *Sci. Rep.* 2016; 6: 27436. <https://doi.org/10.1038/SREP27436>
147. Zhirnov O.P. Unique bipolar gene architecture in the RNA genome of influenza A virus. *Biochem.* 2020; 85(3): 387–92. <https://doi.org/10.1134/S0006297920030141>
148. Woo P.C.Y., Huang Y., Lau S.K.P., Yuen K.Y. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses.* 2010; 2(8): 1805–20. <https://doi.org/10.3390/V2081803>
149. Bartas M., Volná A., Beaudoin C.A., Poulsen E.T., Červeň J., Brázda V., et al. Unheeded SARS-CoV-2 proteins? A deep look into negative-sense RNA. *Brief. Bioinform.* 2022; 23(3): bbac045. <https://doi.org/10.1093/BIB/BBAC045>
150. Zhong W., Reche P.A., Lai C.C., Reinhold B., Reinherz E.L. Genome-wide characterization of a viral cytotoxic T lymphocyte epitope repertoire. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(46): 45135–44. <https://doi.org/10.1074/JBC.M307417200>

151. Hickman H.D., Mays J.W., Gibbs J., Kosik I., Magadán J.G., Takeda K., et al. Correction: influenza A virus negative strand RNA is translated for CD8 + T cell immunosurveillance. *J. Immunol.* 2018; 201(7): 2187. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.1801100>
152. Zhironov O.P., Konakova T.E., Anhlan D., Stephan L., Isaeva E.I. Cellular immune response in infected mice to NSP protein encoded by the negative strand Ns RNA of influenza A virus. *Microbiol. Indep. Res. J.* 2019; (6), 28–36.
153. Nguyen M., Haenni A.L. Expression strategies of ambisense viruses. *Virus Res.* 2003; 93(2): 141–50. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(03\)00094-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(03)00094-7)
154. Panov A.G. Clinic of spring-summer encephalitis. *Nevropatologiya i psikiatriya.* 1938; 7(6): 18–32. (in Russian)
155. Levkovich E.N., Shublazde A.K., Chumakov M.P., Solov'ev V.D., Sheboldaeva A.D. Etiology of spring-summer encephalitis. *Arkhiv biologicheskikh nauk.* 1938; 52(2): 162–82. (in Russian)
156. Zil'ber L.A., Levkovich E.N., Shublazde A.K., Chumakov M.P., Solov'ev V.D., Sheboldaeva A.D. Etiology of spring-summer encephalitis. *Arkhiv biologicheskikh nauk.* 1938; 52(1): 162–83. (in Russian)
157. Zil'ber L.A. Spring (spring-summer) endemic tick-borne encephalitis. *Arkhiv biologicheskikh nauk.* 1939; 56(2): 9–37. (in Russian)
158. Shublazde A.K., Serdyukova G.V. Tick Ixodes Persulcatus as a carrier of taiga encephalitis. *Arkhiv biologicheskikh nauk.* 1939; 56(2): 121–31. (in Russian)
159. Smorodintsev A.A. Results of the three-year work of Soviet medicine on the study of spring-summer (taiga, tick-borne, epidemic) encephalitis. *Arkhiv biologicheskikh nauk.* 1939; 56(2): 38–58. (in Russian)
160. Loginova N.V., Deryabin P.G., Vashkova V.V. Biological characteristics of collectible strains of viruses of the Japanese encephalitis group. *Voprosy virusologii.* 2015; 61(1): 17–20. (in Russian)
161. Lvov D.K., Shchelkanov M.Y., Alkhovskiy S.V., Deryabin P.G. *Zoonotic Viruses of Northern Eurasia: Taxonomy and Ecology.* London: Elsevier Academic Press; 2015.
162. Zlobin V.I., ed. *Tick-Borne Encephalitis in the XXI Century [Kleshchevoy entsefalit v XXI veke].* Moscow: Nauka; 2021. (in Russian)
163. Chumakov M.P. On the results of the expedition of the Institute of Neurology to study Omsk hemorrhagic fever (OGL). *Vestnik AMN SSSR.* 1948; (2): 19–26. (in Russian)
164. Chumakov M.P., Belyaeva A.P., Gagarina A.V., Slavina N.S. Isolation and study of strains of the causative agent of Omsk hemorrhagic fever. In the book: *Endemic viral infections (hemorrhagic fevers).* In: *Proceedings of the Institute of Polio and Viral Encephalitis of the USSR Academy of Medical Sciences. Volume 7 [Endemicheskie virusnye infektsii (gemorragicheskie likhoradki). Trudy instituta poliomieliita i virusnykh entsefalitov AMN SSSR. Tom 7].* Moscow; 1965: 327–44. (in Russian)
165. Butenko A.M., Chumakov M.P., Bashkirtsev V.N. Isolation and study of the Astrakhan strain of "Thrushes" of the Crimean hemorrhagic fever virus and materials on serodiagnostics of this infection. In: *Proceedings of the 15th Scientific Session of the Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis of the USSR Academy of Medical Sciences. Issue 3 [Materialy 15 nauchnoy sessii Instituta poliomieliita i virusnykh entsefalitov AMN SSSR. Vypusk 3].* Moscow; 1968: 88–90. (in Russian)
166. Chumakov M.P., Smirnova S.E., Shalunova N.V., Mart'yanova L.I., Fleer T.P., Sadykova V.D., et al. Isolation and study of the virus from the blood of a patient with Crimean hemorrhagic fever in the Samarkand region of the Uzbek SSR: Hodge strain. In: Chumakov M.P., ed. *Viral Hemorrhagic Fevers. Crimean Hemorrhagic Fever, Omsk Hemorrhagic Fever, Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. Proceedings of the Institute of Polio and Viral Encephalitis of the Academy of Medical Sciences of the USSR [Virusnye gemorragicheskie likhoradki. Krymskaya gemorragicheskaya likhoradka, Omskaya gemorragicheskaya likhoradka, gemorragicheskaya likhoradka s pochechnym sindromom. Trudy Instituta poliomieliita i virusnykh entsefalitov Akademii meditsinskikh nauk SSSR].* Moscow; 1971: 21–9. (in Russian)
167. Simpson D.I., Knight E.M., Courtois G., Williams M.C., Weinbren M.P., Kibukamusoke J.W. Congo virus: a hitherto undescribed virus occurring in Africa. I. Human isolations – clinical notes. *East Afr. Med. J.* 1967; 44(2): 86–92.
168. Kolobukhina L.V., Lvov D.K. Crimean-Congo hemorrhagic fever. In: Lvov D.K., ed. *Virology Guide. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii. Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh].* Moscow: MIA; 2013: 772–9. (in Russian)
169. Chumakov M.P. Report on the isolation from ixodes persulcatus ticks and from patients in Western Siberia of a virus differing from the agent of tick-borne encephalitis. *Acta Virol.* 1963; 7: 82–3.
170. Chumakov M.P., Sarmanova E.S., Bychkova M.V., Bannova G.G., Pivanova G.P., Karpovich L.G., et al. Identification of Kemerovo tick-borne fever virus and its antigenic independence. *Fed. Proc. Transl. Suppl.* 1964; 23: 852–4.
171. Gresikova M. Kemerovo virus infection. In: Beran G., ed. *Handbook Series in Zoonoses, Section B, Viral.* Boca Raton: CRC Press; 1981.
172. Libikova H., Rehacek J., Somogyiova J. Viruses related to the Kemerovo virus in ixodes ricinus ticks in Czechoslovakia. *Acta Virol.* 1965; 9: 76–82.
173. Lvov D.K., Il'ichev V.D., eds. *Migration of Birds and the Transfer of Infectious Agents [Migratsiya ptits i perenos vozбудiteley infektsii].* Moscow: Nauka; 1979. (in Russian)
174. Goodman R.A., Bauman C.F., Gregg M.B., Videtto J.F., Stroup D.F., Chalmers N.P. Epidemiologic field investigations by the centers for disease control and epidemic intelligence service, 1946–87. *Public Heal. Rep.* 1990; 105(6): 604–10.
175. Langmuir A.D. The epidemic intelligence service of the center for disease control. *Public Heal. Rep.* 1980; 95(5): 470–7.
176. Lvov D.K. Ecological soundings of the former USSR territory for natural foci of arboviruses. *Sov. Med. Rev. Virol.* 1993; 5: 1–47.
177. Lvov S.D. Arboviruses in high latitudes. In: Lvov D.K., Klimenko S.M., Gaydamovich S.Ya. *Arboviruses and Arbovirus Infections [Arbovirusy i arbovirusnye infektsii].* Moscow: Meditsina; 1989. (in Russian)
178. Lvov S.D. Natural virus foci in high latitudes of Eurasia. *Sov. Med. Rev. E. Virol. Rev.* 1993; 5: 137–85.
179. Lvov S.D., Gromashevskiy V.L., Kanev E.F., Bogoyavlenskii G.V., Ostroushko T.S., Skvortsova T.M., et al. Circulation of viruses of the groups of California encephalitis and bunyamver (Bunyaviridae, Bunyavirus) in the North-East of the Russian Plain. *Voprosy virusologii.* 1991; 36(1): 31–4. (in Russian)
180. Lvov S.D., Gromashevskiy V.L., Aristova V.A., Morozova T.N., Skvortsova T.M., Gushchina E.A., et al. Isolation of strains of the Geta virus (family Togaviridae, genus Alphavirus) in Northeast Asia. *Voprosy virusologii.* 2000; 45(5): 14–8. (in Russian)
181. Lvov D.K., Timofeeva A.A., Gromashevskiy V.L., Chervonskiy V.I., Gromov A.I., Tsyarkin Y.M., et al. «Sakhalin» Virus – a new arbovirus isolated from ixodes (Ceratiixodes) Putus Pick. – Camb. 1878 Collected on Tuleniy Island, Sea of Okhotsk. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1972; 38(2): 133–8.
182. Lvov D.K., Timopheeva A.A., Gromashevskiy V.L., Gostinshchikova G.V., Veselovskaya O.V., Chervonskiy V.I., et al. «Zaliv Terpeniya» virus, a new Uukuniemi group arbovirus isolated from ixodes (Ceratiixodes) putus Pick. – Camb. 1878 on Tyuleniy Island (Sakhalin Region) and Commodore Islands (Kamchatsk Region). *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1973; 41(3): 165–9.
183. Lvov D.K., Chervonskiy V.I., Gostinshchikova I.N., Zemit A.S., Gromashevskiy V.L., Tsyarkin Y.M., et al. Isolation of Tyuleniy virus from ticks ixodes (Ceratiixodes) putus Pick.–Camb. 1878 Collected on Commodore Islands. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1972; 38(2): 139–42.
184. Lvov D.K., Timopheeva A.A., Gromashevskiy V.L., Tsyarkin Y.M., Veselovskaya O.V., Gostinshchikova G.V., et al. «Okhotskiy» Virus, a new arbovirus of the Kemerovo group isolated from ixodes (Ceratiixodes) putus Pick. – Camb. 1878 in the Far East. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1973; 41(3): 160–4.
185. Lvov D.K., Karas F.R., Timofeev E.M., Tsyarkin Y.M., Vargina S.G., Veselovskaya O.V., et al. «Issyk-Kul» virus, a new arbovirus isolated from bats and argas (Carios) Vespertilionis (Latr., 1802) in the Kirghiz S.S.R. brief report. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1973; 42(2): 207–9.
186. Lvov D.K., Sidorova G.A., Gromashevskiy V.L., Kurbanov M., Skvoztsova L.M., Gofman Y.P., et al. Virus «Tamdy» – a new arbovirus, isolated in the Uzbek S.S.R. and Turkmen S.S.R. from Ticks Hyalomma Asiaticum Asiaticum Schulee et Schlottko, 1929, and Hyalomma Plumbeum Plumbeum Panzer, 1796. *Arch. Virol.* 1976; 51(1–2): 15–21.
187. Alkhovskiy S.V., Lvov D.K., Shchetinin A.M., Deriabin P.G., Shchelkanov M.Y., Aristova V.A., et al. Complete genome cod-

- ing sequences of Artashat, Burana, Caspiy, Chim, Geran, Tamdy, and Uzun-Agach Viruses (Bunyavirales: Nairoviridae: Orthonairovirus). *Genome Announc.* 2017; 5(40): e01098-17. <https://doi.org/10.1128/GENOMEA.01098-17>
188. Lvov D.K., Tsyarkin Y.M., Karas F.R., Timopheev E.M., Gromashevski V.L., Veselovskaya O.V., et al. «Sokuluk» virus, a new group B arbovirus isolated from *Vespertilio Pipistrellus* Schreber, 1775, Bat in the Kirghiz S.S.R. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1973; 41(3): 170–4.
189. Lvov D.K., Deryabin P.G., Aristova V.A., Butenko A.M., Galkina I.V., Gromashevskiy V.L., et al. *Atlas of the Spread of Pathogens of Natural Focal Viral Infections on the Territory of the Russian Federation [Atlas rasprostraneniya vozбудiteley prirodno-ochagovykh virusnykh infektsiy na territorii Rossiyskoy Federatsii]*. Moscow; 2001. (in Russian)
190. L'vov D.N., Shchelkanov M.Yu., Dzharkenov A.F., Galkina I.V., Kolobukhina L.V., Aristova V.A., et al. Population interactions of West Nile virus (Flaviviridae, Flavivirus) with arthropode vectors, vertebrates, humans in the middle and low belts of Volga delta in 2001-2006. *Voprosy virusologii.* 2009; 54(2): 36–43. (in Russian)
191. Pavlovskiy E.N. *Natural Foci of Vector-Borne Diseases in Connection with the Landscape Epidemiology of Zoonothroponoses [Prirodnaya ochagovost' transmissivnykh bolezney v svyazi s landshaftnoy epidemiologiyey zoonotponozov]*. Moscow-Leningrad: Nauka; 1964. (in Russian)
192. Lvov D.K., Klimenko S.M., Gaydamovich S.Ya. *Arboviruses and Arbovirus Infections [Arbovirusy i arbovirusnye infektsii]*. Moscow: Meditsina; 1989. (in Russian)
193. Lipkin W.I., Firth C. Viral surveillance and discovery. *Curr. Opin. Virol.* 2013; 3(2): 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.03.010>.
194. Lipkin W.I. The changing face of pathogen discovery and surveillance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013; 11(2): 133–41. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2949>
195. Koonin E.V., Dolja V.V., Krupovic M. Origins and evolution of viruses of eukaryotes: the ultimate modularity. *Virology.* 2015; 479-480: 2–25. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.039>.
196. Li C.X., Shi M., Tian J.H., Lin X.D., Kang Y.J., Chen L.J., et al. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *Elife.* 2015; 2015(4): e05378. <https://doi.org/10.7554/eLife.05378>
197. Shi M., Lin X.D., Tian J.H., Chen L.J., Chen X., Li C.X., et al. Redefining the Invertebrate RNA Virosphere. *Nature.* 2016; 540(7634): 539–43. <https://doi.org/10.1038/nature20167>
198. Lvov D.K. *Virology Guide. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii. Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)

ОБЗОРЫ

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

https://doi.org/10.36233/0507-4088-136

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Устойчивость к противовирусным препаратам у вирусов человека из подсемейства *Betaherpesvirinae*

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

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

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова» Минобрнауки России, 105064, г. Москва, Россия;

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

В обзоре представлена информация о механизмах возникновения устойчивости к противовирусным препаратам у вирусов человека из подсемейства *Betaherpesvirinae*. Даны сведения о принципах работы противовирусных препаратов и их характеристика. Описана частота появления вирусной устойчивости у различных групп пациентов и показаны сведения о возможных последствиях возникновения устойчивости к противовирусным препаратам. Дана информация о генах вируса, в которых происходят мутации, приводящие к вирусной устойчивости, и список таких мутаций, описанных на данный момент. Обсуждается значение исследования мутаций, приводящих к устойчивости вируса к противовирусным препаратам, для медицинской практики.

Ключевые слова: цитомегаловирус человека; трансплантация гемопоэтических стволовых клеток; вирусная хемотрезистентность; ганцикловир; цидофовир; фоскарнет

Для цитирования: Демин М.В., Тихомиров Д.С., Туполева Т.А., Филатов Ф.П. Устойчивость к противовирусным препаратам у вирусов человека из подсемейства *Betaherpesvirinae*. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(5): 385-394. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-136>

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

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 19.08.2022
Принята в печать 04.10.2022
Опубликована 31.10.2022

REVIEW ARTICLE

https://doi.org/10.36233/0507-4088-136

Resistance to antiviral drugs in human viruses from the subfamily *Betaherpesvirinae*

Mikhail V. Demin¹, Dmitry S. Tikhomirov¹, Tatiana A. Tupoleva¹, Felix P. Filatov^{2,3}

¹National Medical Research Center of Hematology of the Ministry of Health of Russia, 125167, Moscow, Russia;

²I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Serums of the Ministry of Education and Science of Russia, 105064, Moscow, Russia;

³National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia

The review provides information on the mechanisms of the emergence of resistance to antiviral drugs in human viruses from the subfamily *Betaherpesvirinae*. Data on the principles of action of antiviral drugs and their characteristics are given. The occurrence rates of viral resistance in various groups of patients is described and information about the possible consequences of the emergence of resistance to antiviral drugs is given. Information

is provided regarding the virus genes in which mutations occur that lead to viral resistance, and a list of such mutations that have described so far is given. The significance of the study of mutations leading to the resistance of the virus to antiviral drugs for medical practice is discussed.

Keywords: *human cytomegalovirus; hematopoietic stem cell transplantation; viral chemoresistance; ganciclovir; cidofovir; foscarnet*

For citation: Demin M.V., Tikhomirov D.S., Tupoleva T.A., Filatov F.P. Resistance to antiviral drugs in human viruses from the subfamily *Betaherpesvirinae*. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(5): 385-394 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-136>

For correspondence: Mikhail V. Demin, biologist, employee of the Laboratory of Virological Safety, 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:

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

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

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

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

Contribution: All authors made an equal contribution to the search and analytical work and preparation of the article, read and approved the final version before publication.

Funding. The research was funded by the state budget.

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

Received 19 August 2022

Accepted 04 October 2022

Published 31 October 2022

Введение

Betaherpesvirinae, или β -герпесвирусы, – это подсемейство вирусов, которое входит в семейство герпесвирусов *Herpesviridae*. Отличительной особенностью представителей этого подсемейства, инфицирующих человека, являются их относительно медленная репликация и частое отсутствие клинических проявлений после инфицирования [1]. Подсемейство включает пять родов, но только вирусы из родов *Cytomegalovirus* (вирус герпеса человека 5-го типа, или цитомегаловирус (ЦМВ)) и *Roseolovirus* (вирус герпеса человека типа 6А, вирус герпеса человека типа 6В (ВГЧ-6), вирус герпеса человека 7-го типа (ВГЧ-7)) являются антропонозами.

Как и другие представители семейства герпесвирусов, ЦМВ, ВГЧ-6 и ВГЧ-7 после инфицирования чаще всего находятся в организме заражённого человека в латентном состоянии, но сохраняют способность к реактивации в случае ослабления иммунологического контроля. Активная репликация ЦМВ может быть причиной инфекционного мононуклеоза, а у иммунокомпрометированных пациентов (инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), реципиенты органов и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК)) могут наблюдаться серьёзные вирусные инвазии отдельных органов и целых систем организма [1]. Согласно данным литературы, ВГЧ-6 и ВГЧ-7 ответственны за развитие внезапной экзантемы у детей, которую часто называют розеолой. Как в случае с ЦМВ, активная инфекция ВГЧ-6 вызывает серьёзные осложнения у иммунокомпрометированных пациентов (энцефалит, гепатит, пневмония) [2].

β -герпесвирусы у реципиентов стволовых гемопоэтических клеток

Реципиенты органов или ГСК представляют собой особую группу пациентов, которые уязвимы для ин-

фекционных осложнений, и активная репликация герпесвирусов может быть их причиной [3]. Трансплантацию ГСК, как правило, применяют в качестве этапа лечения у пациентов с опухолевыми заболеваниями системы крови – гемобластомами. В качестве трансплантата могут выступать как собственные кроветворные клетки, собранные у пациента на фоне ремиссии заболевания, так и аллогенные, источником которых является донор, частично или полностью совместимый по системе лейкоцитарных антигенов I типа (HLA-I). В первом случае не возникает иммунологической несовместимости, что способствует более быстрому выходу из аплазии после проведения процедуры. В случае применения аллогенных клеток возможно множество негативных последствий, таких как первичное неприживание, несостоятельность либо гипофункция трансплантата, отсроченное восстановление кроветворения, а в более позднем периоде развитие реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ), возникновение многочисленных инфекционных осложнений в посттрансплантационном периоде. На вероятность развития этих осложнений влияет множество факторов, среди которых можно выделить совместимость донора и реципиента, интенсивность режима кондиционирования перед трансплантацией, степень эрадикации кроветворения реципиента и развитие герпесвирусных инфекций, в том числе вызванных β -герпесвирусами [4]. Важным аспектом также является серостатус пациента и донора. Наибольшую опасность представляет трансплантация ГСК серопозитивного донора серонегативному реципиенту [5]. В этом случае вероятность первичного инфицирования реципиента близка к 100%, а появление симптомов вирусного поражения при отсутствии своевременной противовирусной терапии повышается до 80%. Такая ситуация описана как для ЦМВ [6],

так и для ВГЧ-6 [7]. При этом, согласно данным литературы, активация ВГЧ-7 наблюдается заметно реже и не превышает 40% случаев [8]. Развитие инфекций, вызванных этими вирусами, увеличивает тяжесть течения основного гематологического заболевания, а у реципиентов стволовых кроветворных клеток повышает вероятность как развития острой и хронической РТПХ, так и отторжения трансплантата и летального исхода.

Наиболее благоприятной считается трансплантация ГСК от серонегативного донора серонегативному реципиенту, однако, учитывая крайне широкую распространённость этих вирусов, вероятность подбора такой пары «донор – реципиент» часто не представляется возможной. Поэтому проведение профилактики и в случае возникновения клинических проявлений инфекции лечения препаратами прямого противовирусного действия является крайне актуальным.

Профилактическая противовирусная терапия проводится в раннем посттрансплантационном периоде в момент наибольшей клеточной деплеции, когда вероятность возникновения любых инфекционных осложнений, в том числе и вирусной природы, максимальна. В более отдалённом периоде такая терапия чаще не проводится, поскольку используемые для этого препараты обладают достаточно выраженным токсическим и миелосупрессивным действием. Однако вероятность развития инфекции в этот период времени сохраняется, несмотря на восстановление показателей периферической крови на фоне донорского кроветворения [9].

Противовирусные препараты, блокирующие репликацию вирусной ДНК

Подход к противовирусной терапии включает в себя применение лекарственных средств, напрямую или опосредованно подавляющих вирусную репродукцию, чаще всего путём блокировки процесса репликации вирусного генома. На сегодняшний день известно несколько препаратов, способных подавить размножение β -герпесвирусов. В первую очередь это вещества, влияющие на работу вирусной ДНК-полимеразы [10], такие как ацикловир, ганцикловир и их пролекарства с большей биодоступностью – валацикловир и валганцикловир. Данные лекарственные средства являются аналогами нуклеозидов [11] и зарегистрированы для клинического применения на территории Российской Федерации. Как в России, так и во всём мире лечение инфекций, вызываемых ЦМВ, ВГЧ-6 и ВГЧ-7, проводится в большинстве случаев с помощью ганцикловира и валганцикловира [12]. По сравнению с α -герпесвирусами (вирусами простого герпеса 1-го и 2-го типа и вирусом варицелла-зостер), сродство вирусных ферментов β -герпесвирусов (ЦМВ, ВГЧ-6 и ВГЧ-7) с ацикловиром и другими тимидинкиназозависимыми противогерпетическими агентами выражено в меньшей степени [12], на чём и основан подход к терапии. Согласно существующим рекомендациям, профилактика ЦМВ-инфекции производится ганцикловиром и валганцикловиром,

в то время как рекомендаций для проведения профилактики инфекций, вызванных ВГЧ-6 и ВГЧ-7, на данный момент не существует [13].

Кроме этих лекарств, в мировой практике также используют другой нуклеотидный аналог – цидофовир и аналог пирофосфата – фоскарнет [14]. Их использование в первую очередь обусловлено возможным развитием устойчивости у ЦМВ и ВГЧ-6 к действию ганцикловира и валганцикловира [15]. Эти препараты не получили столь широкого распространения, как ганцикловир, что связано с явно выраженной нефротоксичностью. На территории РФ эти препараты не зарегистрированы для клинического применения. В мировой практике цидофовир и фоскарнет рекомендовано назначать при тяжёлых жизнеугрожающих герпесвирусных инфекциях, а также в случаях формирования доказанной устойчивости к ацикловиру и ганцикловиру [16].

Ограниченное число препаратов с прямым противовирусным действием определяет необходимость поиска лекарств с альтернативным принципом действия. Среди них следует отметить летермовир и марибавир. Механизм их действия отличается от ранее упомянутых препаратов, поскольку их непосредственной мишенью не является вирусная ДНК-полимераза. Летермовир блокирует действие продукта гена ЦМВ *UL56*, который представляет собой субъединицу терминального комплекса [17]. Данный комплекс ферментов участвует в упаковке ДНК вируса в капсид и обеспечивает правильное формирование новых вирионов [18]. Терминальный комплекс не имеет аналогов в человеческой клетке, что теоретически делает применение этого препарата безопасным [19]. Летермовир был одобрен для профилактики ЦМВ-инфекции в некоторых странах [20]. Тем не менее масштабных исследований эффективности этого препарата не проводилось, что не позволяет выработать единые стандарты для его использования.

Марибавир в данный момент одобрен для использования в США [21]. Действие препарата основано на подавлении активности продукта гена ЦМВ *UL97* [22], который представляет собой серин-треониновую протеинкиназу (фосфотрансферазу), фосфорилирующую человеческие и вирусные белки, участвующие в жизненном цикле вируса. Показано, что марибавир конкурирует с аденозинтрифосфатом (АТФ) за сайты связывания в вирусной фосфотрансферазе [23]. Данная вирусная киназа также принимает участие в перемещении вновь синтезированных незрелых вирусных частиц в цитоплазму через ламину ядра [24]. В экспериментах *in vitro* в культуре клеток марибавир подавляет репликацию ЦМВ примерно в 10 раз эффективнее, чем ганцикловир.

Поскольку марибавир подавляет активность вирусной фосфотрансферазы, его действие снижает эффективность ганцикловира, который фосфорилируется преимущественно этим ферментом [25]. Таким образом, одновременное назначение этих препаратов противопоказано. Совместное действие марибавира с другими препаратами (фоскарнет, цидофовир, ле-

термовир), напротив, оказывает синергический эффект [26].

Ещё одним важным свойством марибавира является отсутствие у него выраженного миелосупрессивного действия, что повышает привлекательность применения этого препарата у реципиентов ГСК. Принципы действия описанных препаратов представлены на рисунке. Мишенью марибавира выступает вирусная фосфотрансфераза, мишенью ганцикловира, цидовира и фоскарнета – вирусная ДНК-полимераза, а мишенью летермовира является вирусный терминальный комплекс.

Устойчивость цитомегаловируса к действию противовирусных препаратов

Частота возникновения мутаций в ДНК цитомегаловируса

В многочисленных клинических исследованиях у пациентов с ЦМВ-ретинитом показана актуальность возникновения устойчивых вирусных штаммов и описана частота их появления [27]. Одно из таких исследований, проведённое в институте Джонса Хопкинса, показало, что устойчивые штаммы выявляются в 3% случаев при первичном обследовании пациентов с ЦМВ-поражениями органов зрения. Среди пациентов, находящихся под наблюдением один год и получающих противовирусную терапию ганцикловиром, частота выявления таких штаммов достигает уже 27% [27]. Схожие данные были опубликованы для других препаратов – фоскарнета и цидофовира [28]. Показано, что у 12% ЦМВ-положительных реципи-

ентов алло-ГСК обнаружен мутантный вирусный штамм [29].

В литературе одним из основных факторов риска появления мутаций в ДНК ЦМВ называют длительное использование противовирусных препаратов в субоптимальных дозах [30]. К дополнительным факторам риска развития лекарственной устойчивости ЦМВ относят: использование трансплантатов после Т-клеточной деплеции [31] и РТПХ [32], которые способствуют развитию оппортунистических инфекций. В этих случаях у пациентов нарушено нормальное функционирование иммунных клеток, что может способствовать неконтролируемой репликации вируса и отбору наиболее приспособленного мутантного штамма, а это, в свою очередь, ведёт к возникновению лекарственной устойчивости вируса.

Механизм возникновения устойчивости к противовирусным препаратам у цитомегаловируса

Когда речь идёт об устойчивости вирусов герпетической группы к действию противовирусных препаратов, возможна потеря способности того или иного лекарственного средства эффективно ингибировать вирусную репликацию. При этом подавление процесса репродукции вируса может быть реализовано через различные механизмы: нарушение синтеза вирусной ДНК *de novo*, нарушение транспорта и созревания компонентов вирионов внутри клетки и пр. Учитывая, что лекарственные противогерпетические препараты первого ряда, используемые в настоящее время, являются ингибиторами ДНК-полимеразы, то наиболее часто на практике наблюдается устойчивость, связанная

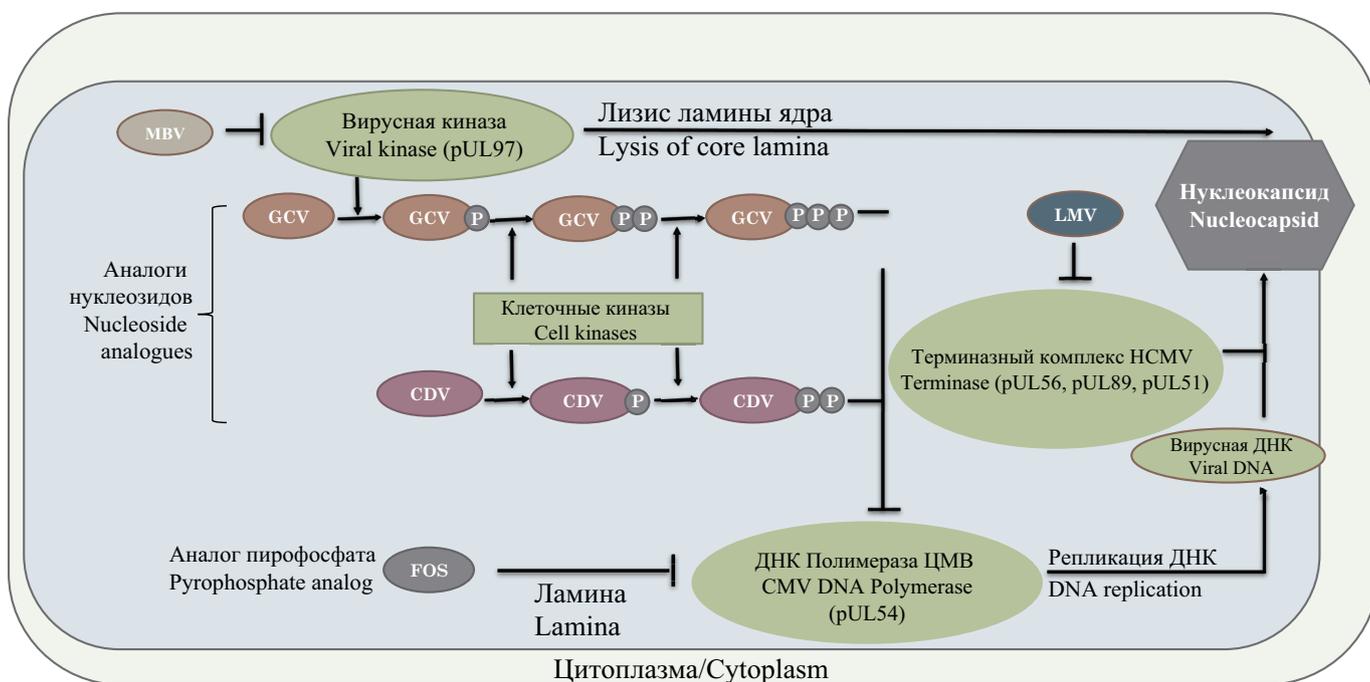


Рисунок. Принципы действия противовирусных препаратов: MBV – марибабир, GCV – ганцикловир, CDV – цидофовир, FOS – фоскарнет, LMV – летермовир.

Figure. Principles of action of antiviral drugs: MBV – maribavir, GCV – ganciclovir, CDV – cidofovir, FOS – foscarnet, LMV – letermovir.

с мутациями, приводящими к неспособности того или иного препарата ингибировать репликацию вирусного генома. Устойчивость ЦМВ к действию ганцикловира обусловлена возникновением мутаций в гене вирусной фосфотрансферазы ЦМВ *UL97*, которая отвечает за первый этап фосфорилирования ганцикловира, что обеспечивает вирусную специфичность самого препарата [33]. В основном мутации, потенциально приводящие к устойчивости процесса вирусной репликации к действию препаратов, локализируются в кодонах 460, 520 и 590–607 этого гена, причём относительно небольшое число мутаций отвечает за более чем 80% случаев доказанной устойчивости к ганцикловиру [34]. Предполагается, что мутационный процесс в данной локализации приводит к изменению специфичности вирусной фосфотрансферазы к субстрату (ганцикловиру), при этом не затрагивая другие её функции. Были обнаружены мутации и в других кодонах, но они встречаются крайне редко, хоть и приводят к эффективной устойчивости к ганцикловиру.

Зарегистрированные для клинического применения в РФ ганцикловир и цидофовир после внутриклеточных превращений с образованием ганцикловиртрифосфата и цидофовирдифосфата, а также фоскарнет ингибируют вирусную ДНК-полимеразу, которая является продуктом вирусного гена *UL54*. Мутации в гене *UL54* могут приводить к нечувствительности работы полимеразы к этим веществам. Нередко наблюдается феномен кросс-резистентности к двум и даже одновременно к трём препаратам [35]. Данные литературы свидетельствуют, что мутации в гене *UL54* обычно возникают после длительного применения противовирусных средств на фоне уже возникших мутаций в гене *UL97* [25], что способствует отбору вирусных штаммов, нечувствительных к препаратам. Кодоны, в которых возникают мутации, группируются главным образом в экзонуклеазном (кодоны 395–545) и каталитическом (кодоны 809–987) доменах фермента. Мутации, приводящие к устойчивости к фоскарнету (аналогу пирофосфата), располагаются в каталитических сайтах вирусной ДНК-полимеразы [36]. У большинства штаммов с кросс-резистентностью к ганцикловиру и цидофовиру мутации идентифицируются в экзонуклеазном домене вирусной ДНК-полимеразы. Механизм устойчивости в данном случае объясняется изменением в структуре экзонуклеазного домена полимеразы. Это изменение приводит к снижению чувствительности этого домена к аналогу нуклеозида (ганцикловиртрифосфата или цидофовирдифосфата). При включении в растущую цепь ДНК такого аналога (положение N + 1) нарушается структура остова ДНК в позициях N + 1 и N + 2. Вирусная ДНК-полимераза стремится устранить напряжение, но её экзонуклеазный домен недостаточно эффективно удаляет встроенный аналог, что ведёт к остановке всего процесса [37]. У штаммов, несущих мутации в экзонуклеазном домене, это напряжение не приводит к остановке синтеза растущей цепи ДНК.

Клинические исследования эффективности препарата маривавир показали, что мутации, возникающие

в *UL97*, могут приводить к устойчивости и к этому препарату [38]. Были зафиксированы случаи кросс-резистентности, когда мутации приводили к единовременной невосприимчивости процесса вирусной репликации и к ганцикловиру, и к маривавиру [39]. Практически все описанные на данный момент мутации, ассоциированные с устойчивостью к маривавиру, находятся недалеко от кодонов 353, 397, 409 и 411, рядом с АТФ-связывающим доменом фермента. Причём участки гена, в которых локализируются эти мутации, не пересекаются с теми участками, где возникают мутации, обеспечивающие вирусу устойчивость к действию ганцикловира.

В работах, посвящённых изучению устойчивости к летермовиру, показано, что регионы возникновения мутаций, отвечающих за устойчивость к действию данного препарата, в основном локализируются в гене *UL56*. Описаны мутации резистентности, локализующиеся также в генах *UL89* и *UL51*. Все эти гены кодируют ферменты, входящие в комплекс вирусной терминазы. Кодоны, в которых возникают мутации, в случае *UL56* ограничиваются положениями 25 и 229–369. Возникающие мутации мало влияют на жизненный цикл вируса, при этом появление сразу трёх мутаций ведёт к заметному повышению устойчивости к летермовиру [40]. Число описанных мутаций в генах *UL89* и *UL51* мало, как и степень их изученности. В *UL89* известны несколько мутаций, расположенных в кодонах 320–360; для *UL51* описана мутация в кодоне 91 [19]. Сведения о мутациях, описанных в литературе, показаны в табл. 1 [35].

Детекция мутаций в геноме цитомегаловируса

Устойчивость к противовирусным препаратам может быть выявлена разными способами, в частности с помощью генотипических методов или определения концентрации противовирусного агента, необходимого для ингибирования репликации вируса *in vitro*. Для определения устойчивости репликации ЦМВ к действию противовирусных препаратов в культуре клеток можно использовать такие методы, как флуоресцентная микроскопия [41] и анализ сортировки клеток с активацией флуоресценции [42], обнаружение ДНК путём гибридизации [43].

Поиск мутаций, ассоциированных с устойчивостью к действию противовирусных препаратов, целесообразно проводить при повышении у пациента вирусной нагрузки на фоне длительной неэффективной противовирусной терапии [44]. Для поиска мутаций могут применяться различные лабораторные методы, среди которых наибольшее значение имеют полимеразная цепная реакция (ПЦР) и секвенирование. Для эффективного проведения последнего рекомендуется использовать образцы вирусной ДНК, выделенной из клинического материала инфицированного пациента с высокой вирусной нагрузкой – более 1000 копий геном-эквивалента или МЕ на 1 мл, если образец представлен биологической жидкостью, либо на 105 ядросодержащих клеток, если образец представлен цельной кровью или другим клеточным

Таблица 1. Мутации устойчивости и их локализация в геноме цитомегаловируса

Table 1. Resistance mutations and their localization in the cytomegalovirus genome

№ No.	Препарат Drug	Локализация (ген) Localization (gene)	Мутации, ассоциированные с лекарственной резистентностью Mutations associated with drug resistance
1	Ганцикловир	<i>UL97</i>	K359E, K359Q, L405P, M460V, M460I , C518Y, H520Q , A591V, C592G , A594V , A594T, A594E, A594G, A594P, A594S, L595S , L595F , L595W, E596del E596G, E596Y, K599T, L600del, L600del2, C603W , C603R, C603S, C607Y, C607F, I610T, A613V
2	Марибавир	<i>UL97</i>	L337M, V353A, L397R, H411L, T409M , H411Y , H411N
3	Ганцикловир + марибавир	<i>UL97</i>	F342Y, F342S, V356G, D456N, V466G, C480F, C480R P521L, Y617del
4	Ганцикловир + цидофовир	<i>UL54</i>	D301N, E303D, E303G, N408D, N408K, N408S, N410K, F412V, F412C, F412L, F412S, D413E, D413A, D413N, D413Y, K488R, K500N, L501I, T503I, A505V, K513E, K513N, K513R, D515Y, L516R, L516P, L516W, I521T, P522A, P522S, C524del, V526L, C539G, C539R, A543P, L545S, L545W, I726T, I726V, A987G
5	Ганцикловир	<i>UL54</i>	P829S, L957F
6	Цидофовир	<i>UL54</i>	D542E, K805Q
7	Фоскарнет	<i>UL54</i>	N495K, T552N, S585A, F595I, T700A, V715A, V715M, E756D, E756Q, T838A, M844T, V946L
8	Фоскарнет + ганцикловир	<i>UL54</i>	S290R, Q578L, D588N, E756K, L776M, L776, V787A, V787L, L802M, A809V, T821I, M844V, E951D
9	Фоскарнет + ганцикловир + цидофовир	<i>UL54</i>	Q578H, L773V, V787E, V812L, T813S, A834P, G841A G841S, D981del2
10	Летермовир	<i>UL56</i>	C25F, S229F, V231A, V231L, N232Y, V236A, V236L, V236M, L241P, T244K, L254F, L257I, L257F, K258E, F261L, F261C, Y321C, C325F, C325Y, C325R, C325W, L328V, M329T, A365S, N368D, R369M, R369G, R369S, R369T, N320H, D344E, T350M, M359I, P91S

Примечание. Жирным выделены наиболее частые мутации.

Note. The most common mutations are highlighted in bold.

материалом. При исследовании образцов с более низкой концентрацией вирусной ДНК существует риск неудачи при проведении секвенирования [45]. Процесс репликации и, соответственно, мутагенеза ЦМВ может происходить не только в крови, но и в других тканях организма благодаря пантропности вируса. Это, в свою очередь, означает, что формирование лекарственной устойчивости в разных локусах может отличаться [46]. Поиск литературных данных об исследованиях, посвящённых чувствительности вирусных штаммов, изолированных из различных локусов, к действию противовирусных препаратов, не увенчался успехом. Однако это не исключает возможности такой селекции штаммов внутри одного организма.

По данным литературы, для диагностики мутаций устойчивости чаще всего проводится секвенирование по Сенгеру. На первом этапе с помощью ПЦР клонируют участок гена, где расположено превалярующее число ранее описанных мутаций. Чаще всего исследуются кодоны *UL97* 440–670, *UL54* 300–1000 и *UL56* 229–369. После этого проводится секвенирование по Сенгеру. Преимущество этого распространённого метода заключается в возможности его стандартизации и невысокой стоимости. Основным его недостатком является невозможность идентификации мутантных субпопуляций вируса, составляющих менее 20% от общего пула. На данный момент разработаны методы поиска мутаций с помощью секвенирования нового поколения (Next Generation Sequencing –

NGS), но высокая стоимость и отсутствие стандартизации пока не позволяют говорить о возможности повсеместного использования данного метода.

Для тестирования образцов на наличие конкретных мутаций может быть использован метод ПЦР. Поскольку за 80% случаев неэффективности этиотропной химиотерапии, наблюдаемой в клинике, отвечает ограниченный перечень описанных мутаций, создание стандартных ПЦР-тестов для их детекции обладает высоким потенциалом для практики.

Устойчивость к противовирусным препаратам у вируса герпеса человека типа 6В

Значение, частота и факторы риска возникновения мутаций в ДНК вируса герпеса человека типа 6В

У реципиентов органов и тканей активная инфекция ВГЧ-6 клинически может проявляться довольно разнообразно: лихорадкой и (или) сыпью, реже поражением ЦНС в виде энцефалита, поражением печени, органов дыхания, угнетением костномозгового кроветворения [47]. Также описаны случаи синергизма ВГЧ-6 и ЦМВ. Согласно данным некоторых авторов, активная репликация ВГЧ-6 может увеличивать скорость реактивации ЦМВ и усугублять тяжесть течения ЦМВ-болезни путём прямого взаимодействия и (или) модуляции иммунного ответа хозяина [48]. Хотя исследования *in vitro* подтверждают потенциальную устойчивость ВГЧ-6 к противовирусным пре-

паратам, в нескольких случаях описано появление лекарственно-устойчивых изолятов в клинической практике. Например, устойчивый к ганцикловиру ВГЧ-6 мутант был выделен от пациента со СПИДом, который получал длительную терапию по поводу активной ЦМВ-инфекции [15]. Также описан случай обнаружения резистентного к ганцикловиру изолята ВГЧ-6 у реципиента ГСК. Пациент скончался, а выделенный изолят оказался в 100 раз устойчивее к ганцикловиру, чем дикий тип, что, в свою очередь, могло повлиять на исход [49]. К. Baldwin и соавт. описали случай развития энцефалита у реципиента печени, вызванного изолятом ВГЧ-6, устойчивым к ганцикловиру, но чувствительным к фоскарнету [50]. Тем не менее, в отличие от ЦМВ, крупных исследований, позволяющих составить картину о частоте встречаемости устойчивых мутантов ВГЧ-6, особенно у реципиентов ГСК, не проводилось. В связи с этим сбор данных, способных показать частоту и степень опасности возникновения мутаций в геноме ВГЧ-6, ассоциированных с устойчивостью к действию противовирусных препаратов, представляется крайне актуальной задачей. Для ВГЧ-7 практически не описаны случаи возникновения устойчивости, однако значение этого события для реципиентов алло-ГСК и других иммунокомпрометированных пациентов не оценено.

Механизм возникновения устойчивости к действию противовирусных препаратов у вируса герпеса человека типа 6В

На данный момент объём информации касательно устойчивости ВГЧ-6 к действию противовирусных препаратов намного меньше, чем для ЦМВ. Однако мутации, приводящие к такой резистентности, уже описаны. Нечувствительность репликации ВГЧ-6 к ганцикловиру часто опосредована мутациями в вирусных генах *U69* и (или) *U38*, являющихся аналогами генов ЦМВ *UL97* и *UL54* и кодирующих соответственно вирусную фосфотрансферазу и вирусную полимеразу. Например, мутация М318V, расположенная в поддомене VIb фосфотрансферазы *U69*, была идентифицирована в клиническом образце крови, взятом от ВИЧ-положительного пациента [15] с ВГЧ-6 инфекцией. Две (L201I и L213I) и три (P462S, A565V и A975V) мутации были обнаружены соответственно в генах *U69* и *U38* в геноме вируса, выделенного от реципиента ГСК [49]. Мутация Y479H в гене *U69* была

обнаружена в изоляте, выделённом из крови реципиента трансплантата почки, получавшего ганцикловир для подавления активной ЦМВ-инфекции [51]. Некоторые мутации у ВГЧ-6 были открыты путём экстраполяции аналогичных мутаций в геноме ЦМВ ввиду сходства генов, например, в гене *U38* – мутации A591D, C592G, L595S, A606D и C607Y [52]. Предполагается, что мутации в генах ВГЧ-6 приводят к тем же последствиям, что и в случае с ЦМВ: изменение сайтов связывания с лекарственными аналогами нуклеозидов и пирофосфатом, что в конечном счёте приводит к снижению эффективности препаратов. Известные мутации устойчивости ВГЧ-6 представлены в **табл. 2**.

Детекция мутаций в геноме вируса герпеса человека типа 6В

Как и в случае с ЦМВ, для оценки чувствительности репликации ВГЧ-6 к действию противовирусных препаратов можно использовать множество методов. Но предпочтительным остаётся метод секвенирования по Сенгеру. Преимущество в данном случае заключается в том, что генотипическое тестирование путём секвенирования ДНК-продуктов ПЦР, амплифицированных из *U69* (обычно кодонов 122–564) и (или) гена *U38* (обычно кодоны 1–998), может быть проведено непосредственно на базе ДНК, выделенной из клинического образца [51]. Так же как и для ЦМВ, применение в лабораторной практике других методов на сегодняшний день представляется нецелесообразным: NGS является дорогостоящим методом, в то время как ПЦР можно проводить, только заранее определив, какую мутацию следует искать. Согласно данным литературы, для обнаружения устойчивости ВГЧ-6 к противовирусным препаратам чаще всего используют образцы периферической крови.

Заключение

Суммируя вышеизложенное, можно заключить, что возникновение мутаций в геномах β-герпесвирусов, снижающих эффективность проводимых терапевтических мероприятий, не является редким событием в клинической практике. При этом если для ЦМВ был собран довольно большой массив данных, позволяющий составить представление о частоте возникновения и локализации мутаций устойчивости, то для ВГЧ-6 и ВГЧ-7 данные ограничены. Эта проблематика представляется крайне актуальной, учитывая распространённость ВГЧ-6

Таблица 2. Мутации устойчивости и их локализация в геноме вируса герпеса человека типа 6В
Table 2. Resistance mutations and their localization in the genome of human herpesvirus type 6B

№ No.	Препарат Drug	Локализация (ген) Localization (gene)	Мутации, ассоциированные с лекарственной резистентностью Mutations associated with drug resistance
1	Ганцикловир	<i>U69</i>	L201I, L213I, M318V, A447D, C448G, L450S, A462D, P462S, C463Y
2	Фоскарнет	<i>U38</i>	F292S, T435R, H507Y, C525S
3	Ганцикловир	<i>U38</i>	A565V, A591D, C592G, L595S, A606D, C607Y, A961V, A975V
4	Ганцикловир + фоскарнет + цидофовир	<i>U38</i>	R798I

и наличие описанных случаев активной инфекции, вызванной устойчивым вирусом, закончившихся летальных исходом. Актуальным вопросом, наряду с поиском, идентификацией и описанием мутаций устойчивости для обозначенных вирусов, является разработка методик быстрой и эффективной диагностики подобных мутаций (например, на основе ПЦР). Применение подобных методик может способствовать оперативному получению дополнительной информации для коррекции и повышения эффективности тактики лечения.

ЛИТЕРАТУРА

- Umene K. Herpesviruses. *Fukuoka Igaku Zasshi*. 2001; 92(11): 361–4. (in Japanese)
- Piret J., Boivin G. Antiviral drug resistance in herpesviruses other than cytomegalovirus. *Rev. Med. Virol.* 2014; 24(3):186–218. <https://doi.org/10.1002/rmv.1787>
- Ramanan P., Razonable R.R. Cytomegalovirus infections in solid organ transplantation: A review. *Infect. Chemother.* 2013; 45(3): 260–71. <https://doi.org/10.3947/ic.2013.45.3.260>
- Панкратова О.С., Чухловин А.Б., Зубаровская Л.С., Афанасьев Б.В. Частота выявления вирусов группы герпеса и риск типичных осложнений при аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. *Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова*. 2010; 17(1): 56–60.
- Kotton C.N. Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* 2010; 6(12): 711–21. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2010.141>
- Takenaka K., Nishida T., Asano-Mori Y., Oshima K., Ohashi K., Mori T., et al. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is associated with a reduced risk of relapse in patients with acute myeloid leukemia who survived to day 100 after transplantation: The Japan society for hematopoietic C. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2015; 21(11): 2008–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.07.019>
- Rossi C., Delforge M.L., Jacobs F., Wissing M., Pradier O., Remmelink M., et al. Fatal primary infection due to human herpesvirus 6 variant A in a renal transplant recipient. *Transplantation.* 2001; 71(2): 288–92. <https://doi.org/10.1097/00007890-200101270-00021>
- Kidd M., Clark D., Sabin C., Andrew D., Hassan-Walker A., Sweny P., et al. Association of human herpesvirus 7 and cytomegalovirus co-infection with cytomegalovirus disease and increased rejection. *Transplantation.* 2000; 69(11): 2400–4. <https://doi.org/10.1097/00007890-200006150-00032>
- Britt W. Manifestations of human cytomegalovirus infection: Proposed mechanisms of acute and chronic disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008; 325: 417–70. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8_23
- Cameron C.E., Raney K.D., Götte M. *Viral Genome Replication*. Boston: Springer; 2009.
- Chen S.J., Wang S.C., Chen Y.C. Antiviral agents as therapeutic strategies against cytomegalovirus infections. *Viruses.* 2019; 12(1): 21. <https://doi.org/10.3390/v12010021>
- Орлова С.В., Стома И.О., Шмелева Н.П., Сивец Н.В. Современное состояние проблемы герпесвирусных инфекций 6-го и 7-го типов с разными клиническими формами, возможности лечения. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2021; 10(2): 78–86. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2021-10-1-78-86>
- Ward K.N., Hill J.A., Hubacek P., De La Camara R., Crocchiolo R., Einsele H., et al. Guidelines from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia for management of HHV-6 infection in patients with hematologic malignancies and after hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2019; 104(11): 2155–63. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.223073>
- Krishna B.A., Wills M.R., Sinclair J.H. Advances in the treatment of cytomegalovirus. *Br. Med. Bull.* 2019; 131(1): 5–17. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldz031>
- Manichanh C., Olivier-Aubron C., Lagarde J.P., Aubin J.T., Bossi P., Gautheret-Dejean A., et al. Selection of the same mutation in the U69 protein kinase gene of human herpesvirus-6 after prolonged exposure to ganciclovir in vitro and in vivo. *J. Gen. Virol.* 2001; 82(Pt. 11): 2767–76. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-11-2767>
- Ward K.N., Clark D.A. Roseoloviruses: human herpesviruses 6A, 6B and 7. In: *Principles and Practice of Clinical Virology*. Chichester: Wiley-Blackwell; 2009: 223–44.
- Goldner T., Hewlett G., Ettischer N., Ruebsamen-Schaeff H., Zimmermann H., Lischka P. The novel anticytomegalovirus compound AIC246 (letermovir) inhibits human cytomegalovirus replication through a specific antiviral mechanism that involves the viral terminase. *J. Virol.* 2011; 85(20): 10884–93. <https://doi.org/10.1128/jvi.05265-11>
- Neuber S., Wagner K., Goldner T., Lischka P., Steinbrueck L., Messerle M., et al. Mutual interplay between the human cytomegalovirus terminase subunits pUL51, pUL56, and pUL89 promotes terminase complex formation. *J. Virol.* 2017; 91(12): e02384-16. <https://doi.org/10.1128/jvi.02384-16>
- 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>
- Lin A., Maloy M., Su Y., Bhatt V., DeRespiris L., Griffin M., et al. Letermovir for primary and secondary cytomegalovirus prevention in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients: Real-world experience. *Transpl. Infect. Dis.* 2019; 21(6): 1–6. <https://doi.org/10.1111/tid.13187>
- Avery R.K., Alain S., Alexander B.D., Blumberg E.A., Chemaly R.F., Cordonnier C., et al. Maribavir for refractory cytomegalovirus infections with or without resistance post-transplant: results from a phase 3 randomized clinical trial. *Clin. Infect. Dis.* 2022; 75(4): 690–701. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab988>
- Williams S.L., Hartline C.B., Kushner N.L., Harden E.A., Bidan-set D.J., Drach J.C., et al. In vitro activities of benzimidazole D- and L-ribonucleosides against herpesviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(7): 2186–92. <https://doi.org/10.1128/aac.47.7.2186-2192.2003>
- Shannon-Lowe C.D., Emery V.C. The effects of maribavir on the autophosphorylation of ganciclovir resistant mutants of the cytomegalovirus {UL}97 protein. *Herpesviridae.* 2010; 1(1): 4. <https://doi.org/10.1186/2042-4280-1-4>
- Sharma M., Bender B.J., Kamil J.P., Lye M.F., Pesola J.M., Reim N.I., et al. Human cytomegalovirus UL97 phosphorylates the viral nuclear egress complex. *J. Virol.* 2015; 89(1): 523–34. <https://doi.org/10.1128/jvi.02426-14>
- Chou S., Marousek G.I., Van Wechel L.C., Li S., Weinberg A. Growth and drug resistance phenotypes resulting from cytomegalovirus DNA polymerase region III mutations observed in clinical specimens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51(11): 4160–2. <https://doi.org/10.1128/aac.00736-07>
- O'Brien M.S., Markovich K.C., Selleseth D., DeVita A.V., Sethna P., Gentry B.G. In vitro evaluation of current and novel antivirals in combination against human cytomegalovirus. *Antiviral Res.* 2018; 158: 255–63. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.08.015>
- Chou S.W. Cytomegalovirus drug resistance and clinical implications. *Transpl. Infect. Dis.* 2001; 3(Suppl. 2): 20–4. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3062.2001.00004.x>
- Jabs D.A., Enger C., Dunn J.P., Forman M., Hubbard L. Cytomegalovirus retinitis and viral resistance: 3. Culture results. *Am. J. Ophthalmol.* 1998; 126(4): 543–9. [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(98\)00134-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(98)00134-2)
- Yu U., Wang X., Zhang X., Wang C., Yang C., Zhou X., et al. Cytomegalovirus infection and the implications of drug-resistant mutations in pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a retrospective study from a tertiary hospital in China. *Infect. Dis. Ther.* 2021; 10(3): 1309–22. <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00452-4>
- Chou S. Approach to drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2015; 28(4): 293–9. <https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000170>
- Eckle T., Lang P., Prix L., Jahn G., Klingebiel T., Handgretinger R., et al. Rapid development of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation in the early phase of immune cell recovery. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 30(7): 433–9. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1703666>
- Wolf D.G., Yaniv I., Honigman A., Kassis I., Schonfeld T., Ashkenazi S. Early emergence of ganciclovir-resistant human cytomegalovirus strains in children with primary combined im-

- munodeficiency. *J. Infect. Dis.* 1998; 178(2): 535–8. <https://doi.org/10.1086/517468>
33. Littler E., Stuart A., Chee M. Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature.* 1992; 358(6382): 160–2. <https://doi.org/10.1038/358160a0>
 34. Kleiboeker S., Nutt J., Schindel B., Dannehl J., Hester J. Cytomegalovirus antiviral resistance: Characterization of results from clinical specimens. *Transpl. Infect. Dis.* 2014; 16(4): 561–7. <https://doi.org/10.1111/tid.12241>
 35. Chou S. Advances in the genotypic diagnosis of cytomegalovirus antiviral drug resistance. *Antiviral. Res.* 2020; 176: 104711. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104711>
 36. Campos A.B., Ribeiro J., Pinho Vaz C., Campilho F., Branca R., Campos A., et al. Genotypic resistance of cytomegalovirus to antivirals in hematopoietic stem cell transplant recipients from Portugal: A retrospective study. *Antiviral. Res.* 2017; 138: 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.10.016>
 37. Chen H., Beardsley G.P., Coen D.M. Mechanism of ganciclovir-induced chain termination revealed by resistant viral polymerase mutants with reduced exonuclease activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2014; 111(49): 17462–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405981111>
 38. Chou S., Marousek G.I. Accelerated evolution of maribavir resistance in a cytomegalovirus exonuclease domain II mutant. *J. Virol.* 2008; 82(1): 246–53. <https://doi.org/10.1128/jvi.01787-07>
 39. Houldcroft C.J., Bryant J.M., Depledge D.P., Margetts B.K., Simmonds J., Nicolaou S., et al. Detection of low frequency multi-drug resistance and novel putative maribavir resistance in immunocompromised pediatric patients with cytomegalovirus. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 1317. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01317>
 40. Chou S., Satterwhite L.E., Ercolani R.J. New locus of drug resistance in the human cytomegalovirus UL56 gene revealed by in vitro exposure to letermovir and ganciclovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018; 62(9): e00922-18. <https://doi.org/10.1128/aac.00922-18>
 41. Agut H., Collandre H., Aubin J.T., Guétard D., Favier V., Ingrand D., et al. In vitro sensitivity of human herpesvirus-6 to antiviral drugs. *Res. Virol.* 1989; 140(3): 219–28. [https://doi.org/10.1016/s0923-2516\(89\)80099-8](https://doi.org/10.1016/s0923-2516(89)80099-8)
 42. Manichanh C., Grenot P., Gautheret-Dejean A., Debré P., Huraux J.M., Agut H. Susceptibility of human herpesvirus 6 to antiviral compounds by flow cytometry analysis. *Cytometry.* 2000; 40(2): 135–40. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0320\(20000601\)40:2%3C135::aid-cyto7%3E3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0320(20000601)40:2%3C135::aid-cyto7%3E3.0.co;2-h)
 43. De Clercq E., Naesens L., De Bolle L., Schols D., Zhang Y., Neyts J. Antiviral agents active against human. *Rev. Med. Virol.* 2001; 11(6): 381–95. <https://doi.org/10.1002/rmv.336>
 44. Kotton C.N., Kumar D., Caliendo A.M., Huprikar S., Chou S., Danziger-Isakov L., et al. The third international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation.* 2018; 102(6): 900–31. <https://doi.org/10.1097/tp.0000000000002191>
 45. Sahoo M.K., Lefterova M.I., Yamamoto F., Waggoner J.J., Chou S., Holmes S.P., et al. Detection of cytomegalovirus drug resistance mutations by next-generation sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(11): 3700–10. <https://doi.org/10.1128/jcm.01605-13>
 46. Andrei G., Van Loon E., Lerut E., Victoor J., Meijers B., Bammens B., et al. Persistent primary cytomegalovirus infection in a kidney transplant recipient: Multi-drug resistant and compartmentalized infection leading to graft loss. *Antiviral. Res.* 2019; 168: 203–9. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.06.004>
 47. De Bolle L., Naesens L., De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(1): 217–45. <https://doi.org/10.1128/cmr.18.1.217-245.2005>
 48. Humar A., Malkan G., Moussa G., Greig P., Levy G., Mazzulli T. Human herpesvirus-6 is associated with cytomegalovirus reactivation in liver transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 2000; 181(4): 1450–3. <https://doi.org/10.1086/315391>
 49. Isegawa Y., Hara J., Amo K., Osugi Y., Takemoto M., Yamanishi K., et al. Human herpesvirus 6 ganciclovir-resistant strain with amino acid substitutions associated with the death of an allogeneic stem cell transplant recipient. *J. Clin. Virol.* 2009; 44(1): 15–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.09.002>
 50. Baldwin K. Ganciclovir-resistant Human herpesvirus-6 encephalitis in a liver transplant patient: A case report. *J. Neurovirol.* 2011; 17(2): 193–5. <https://doi.org/10.1007/s13365-011-0019-4>
 51. Bounaadja L., Piret J., Goyette N., Boivin G. Analysis of HHV-6 mutations in solid organ transplant recipients at the onset of cytomegalovirus disease and following treatment with intravenous ganciclovir or oral valganciclovir. *J. Clin. Virol.* 2013; 58(1): 279–82. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.06.024>
 52. Safronetz D., Petric M., Tellier R., Parvez B., Tipples G.A. Mapping ganciclovir resistance in the human herpesvirus-6 U69 protein kinase. *J. Med. Virol.* 2003; 71(3): 434–9. <https://doi.org/10.1002/jmv.10510>

REFERENCES

1. Umene K. Herpesviruses. *Fukuoka Igaku Zasshi.* 2001; 92(11): 361–4. (in Japanese)
2. Piret J., Boivin G. Antiviral drug resistance in herpesviruses other than cytomegalovirus. *Rev. Med. Virol.* 2014; 24(3):186–218. <https://doi.org/10.1002/rmv.1787>
3. Ramanan P., Razonable R.R. Cytomegalovirus infections in solid organ transplantation: A review. *Infect. Chemother.* 2013; 45(3): 260–71. <https://doi.org/10.3947/ic.2013.45.3.260>
4. Pankratova O.S., Chukhlovina A.B., Zubarovskaya L.S., Afanas'ev B.V. Frequency of herpesvirus detection and risk of typical complications in allogeneic complications in allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells. *Uchenye zapiski SPbGMU im. akad. I.P. Pavlova.* 2010; 17(1): 56–60. (in Russian)
5. Kotton C.N. Management of cytomegalovirus infection in solid organ transplantation. *Nat. Rev. Nephrol.* 2010; 6(12): 711–21. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2010.141>
6. Takenaka K., Nishida T., Asano-Mori Y., Oshima K., Ohashi K., Mori T., et al. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is associated with a reduced risk of relapse in patients with acute myeloid leukemia who survived to day 100 after transplantation: The Japan society for hematopoietic C. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2015; 21(11): 2008–16. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.07.019>
7. Rossi C., Delforge M.L., Jacobs F., Wissing M., Pradier O., Remmelink M., et al. Fatal primary infection due to human herpesvirus 6 variant A in a renal transplant recipient. *Transplantation.* 2001; 71(2): 288–92. <https://doi.org/10.1097/00007890-200101270-00021>
8. Kidd M., Clark D., Sabin C., Andrew D., Hassan-Walker A., Sweeney P., et al. Association of human herpesvirus 7 and cytomegalovirus co-infection with cytomegalovirus disease and increased rejection. *Transplantation.* 2000; 69(11): 2400–4. <https://doi.org/10.1097/00007890-200006150-00032>
9. Britt W. Manifestations of human cytomegalovirus infection: Proposed mechanisms of acute and chronic disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2008; 325: 417–70. https://doi.org/10.1007/978-3-540-77349-8_23
10. Cameron C.E., Raney K.D., Götte M. *Viral Genome Replication.* Boston: Springer; 2009.
11. Chen S.J., Wang S.C., Chen Y.C. Antiviral agents as therapeutic strategies against cytomegalovirus infections. *Viruses.* 2019; 12(1): 21. <https://doi.org/10.3390/v12010021>
12. Orlova S.V., Stoma I.O., Shmeleva N.P., Sivets N.V. The current state of the problem of infections caused by herpes viruses 6, 7 with different clinical forms and the possibilities of their treatment. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie.* 2021; 10(2): 78–86. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2021-10-1-78-86> (in Russian)
13. Ward K.N., Hill J.A., Hubacek P., De La Camara R., Crocchiolo R., Einsele H., et al. Guidelines from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia for management of HHV-6 infection in patients with hematologic malignancies and after hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2019; 104(11): 2155–63. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.223073>
14. Krishna B.A., Wills M.R., Sinclair J.H. Advances in the treatment of cytomegalovirus. *Br. Med. Bull.* 2019; 131(1): 5–17. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldz031>
15. Manichanh C., Olivier-Aubron C., Lagarde J.P., Aubin J.T., Bossi P., Gautheret-Dejean A., et al. Selection of the same mutation in the U69 protein kinase gene of human herpesvirus-6 after prolonged exposure to ganciclovir in vitro and in vivo. *J. Gen. Virol.* 2001; 82(Pt. 11): 2767–76. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-11-2767>
16. Ward K.N., Clark D.A. Roseoloviruses: human herpesviruses 6A, 6B and 7. In: *Principles and Practice of Clinical Virology.* Chichester: Wiley-Blackwell; 2009: 223–44.

17. Goldner T., Hewlett G., Ettischer N., Ruebsamen-Schaeff H., Zimmermann H., Lischka P. The novel anticytomegalovirus compound AIC246 (letermovir) inhibits human cytomegalovirus replication through a specific antiviral mechanism that involves the viral terminase. *J. Virol.* 2011; 85(20): 10884–93. <https://doi.org/10.1128/jvi.05265-11>
18. Neuber S., Wagner K., Goldner T., Lischka P., Steinbrueck L., Meserle M., et al. Mutual interplay between the human cytomegalovirus terminase subunits pUL51, pUL56, and pUL89 promotes terminase complex formation. *J. Virol.* 2017; 91(12): e02384-16. <https://doi.org/10.1128/jvi.02384-16>
19. 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>
20. Lin A., Maloy M., Su Y., Bhatt V., DeRespiris L., Griffin M., et al. Letermovir for primary and secondary cytomegalovirus prevention in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients: Real-world experience. *Transpl. Infect. Dis.* 2019; 21(6): 1–6. <https://doi.org/10.1111/tid.13187>
21. Avery R.K., Alain S., Alexander B.D., Blumberg E.A., Chemaly R.F., Cordonnier C., et al. Maribavir for refractory cytomegalovirus infections with or without resistance post-transplant: results from a phase 3 randomized clinical trial. *Clin. Infect. Dis.* 2022; 75(4): 690–701. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab988>
22. Williams S.L., Hartline C.B., Kushner N.L., Harden E.A., Bidanet D.J., Drach J.C., et al. In vitro activities of benzimidazole D- and L-ribonucleosides against herpesviruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(7): 2186–92. <https://doi.org/10.1128/aac.47.7.2186-2192.2003>
23. Shannon-Lowe C.D., Emery V.C. The effects of maribavir on the autophosphorylation of ganciclovir resistant mutants of the cytomegalovirus {UL}97 protein. *Herpesviridae.* 2010; 1(1): 4. <https://doi.org/10.1186/2042-4280-1-4>
24. Sharma M., Bender B.J., Kamil J.P., Lye M.F., Pesola J.M., Reim N.I., et al. Human cytomegalovirus UL97 phosphorylates the viral nuclear egress complex. *J. Virol.* 2015; 89(1): 523–34. <https://doi.org/10.1128/jvi.02426-14>
25. Chou S., Marousek G.I., Van Wechel L.C., Li S., Weinberg A. Growth and drug resistance phenotypes resulting from cytomegalovirus DNA polymerase region III mutations observed in clinical specimens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51(11): 4160–2. <https://doi.org/10.1128/aac.00736-07>
26. O'Brien M.S., Markovich K.C., Selleseth D., DeVita A.V., Sethna P., Gentry B.G. In vitro evaluation of current and novel antivirals in combination against human cytomegalovirus. *Antiviral. Res.* 2018; 158: 255–63. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.08.015>
27. Chou S.W. Cytomegalovirus drug resistance and clinical implications. *Transpl. Infect. Dis.* 2001; 3(Suppl. 2): 20–4. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3062.2001.00004.x>
28. Jabs D.A., Enger C., Dunn J.P., Forman M., Hubbard L. Cytomegalovirus retinitis and viral resistance: 3. Culture results. *Am. J. Ophthalmol.* 1998; 126(4): 543–9. [https://doi.org/10.1016/s0002-9394\(98\)00134-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9394(98)00134-2)
29. Yu U., Wang X., Zhang X., Wang C., Yang C., Zhou X., et al. Cytomegalovirus infection and the implications of drug-resistant mutations in pediatric allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients: a retrospective study from a tertiary hospital in China. *Infect. Dis. Ther.* 2021; 10(3): 1309–22. <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00452-4>
30. Chou S. Approach to drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2015; 28(4): 293–9. <https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000170>
31. Eckle T., Lang P., Prix L., Jahn G., Klingebiel T., Handgretinger R., et al. Rapid development of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation in the early phase of immune cell recovery. *Bone Marrow Transplant.* 2002; 30(7): 433–9. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1703666>
32. Wolf D.G., Yaniv I., Honigman A., Kassir I., Schonfeld T., Ashkenazi S. Early emergence of ganciclovir-resistant human cytomegalovirus strains in children with primary combined immunodeficiency. *J. Infect. Dis.* 1998; 178(2): 535–8. <https://doi.org/10.1086/517468>
33. Littler E., Stuart A., Chee M. Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature.* 1992; 358(6382): 160–2. <https://doi.org/10.1038/358160a0>
34. Kleiboeker S., Nutt J., Schindel B., Dannehl J., Hester J. Cytomegalovirus antiviral resistance: Characterization of results from clinical specimens. *Transpl. Infect. Dis.* 2014; 16(4): 561–7. <https://doi.org/10.1111/tid.12241>
35. Chou S. Advances in the genotypic diagnosis of cytomegalovirus antiviral drug resistance. *Antiviral. Res.* 2020; 176: 104711. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104711>
36. Campos A.B., Ribeiro J., Pinho Vaz C., Campilho F., Branca R., Campos A., et al. Genotypic resistance of cytomegalovirus to antivirals in hematopoietic stem cell transplant recipients from Portugal: A retrospective study. *Antiviral. Res.* 2017; 138: 86–92. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.10.016>
37. Chen H., Beardsley G.P., Coen D.M. Mechanism of ganciclovir-induced chain termination revealed by resistant viral polymerase mutants with reduced exonuclease activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2014; 111(49): 17462–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405981111>
38. Chou S., Marousek G.I. Accelerated evolution of maribavir resistance in a cytomegalovirus exonuclease domain II mutant. *J. Virol.* 2008; 82(1): 246–53. <https://doi.org/10.1128/jvi.01787-07>
39. Houldcroft C.J., Bryant J.M., Depledge D.P., Margetts B.K., Simmonds J., Nicolaou S., et al. Detection of low frequency multi-drug resistance and novel putative maribavir resistance in immunocompromised pediatric patients with cytomegalovirus. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 1317. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01317>
40. Chou S., Satterwhite L.E., Ercolani R.J. New locus of drug resistance in the human cytomegalovirus UL56 gene revealed by in vitro exposure to letermovir and ganciclovir. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018; 62(9): e00922-18. <https://doi.org/10.1128/aac.00922-18>
41. Agut H., Collandre H., Aubin J.T., Guétard D., Favier V., Ingrand D., et al. In vitro sensitivity of human herpesvirus-6 to antiviral drugs. *Res. Virol.* 1989; 140(3): 219–28. [https://doi.org/10.1016/s0923-2516\(89\)80099-8](https://doi.org/10.1016/s0923-2516(89)80099-8)
42. Manichanh C., Grenot P., Gautheret-Dejean A., Debré P., Huraux J.M., Agut H. Susceptibility of human herpesvirus 6 to antiviral compounds by flow cytometry analysis. *Cytometry.* 2000; 40(2): 135–40. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0320\(20000601\)40:2%3C135::aid-cyto7%3E3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0320(20000601)40:2%3C135::aid-cyto7%3E3.0.co;2-h)
43. De Clercq E., Naesens L., De Bolle L., Schols D., Zhang Y., Neyts J. Antiviral agents active against human. *Rev. Med. Virol.* 2001; 11(6): 381–95. <https://doi.org/10.1002/rmv.336>
44. Kotton C.N., Kumar D., Caliendo A.M., Huprikar S., Chou S., Danziger-Isakov L., et al. The third international consensus guidelines on the management of cytomegalovirus in solid-organ transplantation. *Transplantation.* 2018; 102(6): 900–31. <https://doi.org/10.1097/tp.0000000000002191>
45. Sahoo M.K., Lefterova M.I., Yamamoto F., Waggoner J.J., Chou S., Holmes S.P., et al. Detection of cytomegalovirus drug resistance mutations by next-Generation sequencing. *J. Clin. Microbiol.* 2013; 51(11): 3700–10. <https://doi.org/10.1128/jcm.01605-13>
46. Andrei G., Van Loon E., Lerut E., Victoor J., Meijers B., Bammens B., et al. Persistent primary cytomegalovirus infection in a kidney transplant recipient: Multi-drug resistant and compartmentalized infection leading to graft loss. *Antiviral. Res.* 2019; 168: 203–9. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.06.004>
47. De Bolle L., Naesens L., De Clercq E. Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005; 18(1): 217–45. <https://doi.org/10.1128/cmr.18.1.217-245.2005>
48. Humar A., Malkan G., Moussa G., Greig P., Levy G., Mazzulli T. Human herpesvirus-6 is associated with cytomegalovirus reactivation in liver transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 2000; 181(4): 1450–3. <https://doi.org/10.1086/315391>
49. Isegawa Y., Hara J., Amo K., Osugi Y., Takemoto M., Yamanishi K., et al. Human herpesvirus 6 ganciclovir-resistant strain with amino acid substitutions associated with the death of an allogeneic stem cell transplant recipient. *J. Clin. Virol.* 2009; 44(1): 15–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.09.002>
50. Baldwin K. Ganciclovir-resistant Human herpesvirus-6 encephalitis in a liver transplant patient: A case report. *J. Neurovirol.* 2011; 17(2): 193–5. <https://doi.org/10.1007/s13365-011-0019-4>
51. Bounaadja L., Piret J., Goyette N., Boivin G. Analysis of HHV-6 mutations in solid organ transplant recipients at the onset of cytomegalovirus disease and following treatment with intravenous ganciclovir or oral valganciclovir. *J. Clin. Virol.* 2013; 58(1): 279–82. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.06.024>
52. Safronetz D., Petric M., Tellier R., Parvez B., Tipples G.A. Mapping ganciclovir resistance in the human herpesvirus-6 U69 protein kinase. *J. Med. Virol.* 2003; 71(3): 434–9. <https://doi.org/10.1002/jmv.10510>

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

https://doi.org/10.36233/0507-4088-139

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



***In situ* гели как современный способ интраназальной доставки вакцин**

Бахрушина Е.О.¹, Михел И.Б.¹, Кондратьева В.М.², Демина Н.Б.¹, Гребенникова Т.В.²

¹ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Россия;

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

Непрерывное появление новых патогенов и эволюция устойчивости микроорганизмов к препаратам делают абсолютно необходимой разработку инновационных эффективных стратегий вакцинации. Использование назальной вакцинации может повысить удобство и безопасность, вызвать как местные, так и системные иммунные реакции. Интраназальное введение тем не менее обладает рядом проблем, решение которых возможно с использованием последних достижений фармацевтической науки. Одним из аспектов может быть использование для производства интраназальных вакцин *in situ* систем – полимерных композиций, обеспечивающих направленный, контролируемый физиологическими условиями носовой полости переход «золь – гель». При этом гелеобразование вводимой дозы при соприкосновении со слизистой носовой полости предполагает длительную экспозицию лекарства на месте введения, большую мукоадгезию, противодействие мукоцилиарному клиренсу, модифицированное и более полное высвобождение. Такие полимеры, как хитозан, камеди, блок-сополимеры полиоксиэтилен и полиоксипропилен (полоксамеры, проксанола), карбомеры, выпускаются рядом как иностранных, так и отечественных производителей. Для эффективного проведения фармацевтической разработки новых интраназальных систем доставки ИБП, соответствующих концепции QbD, необходимы не только знания ассортимента вспомогательных веществ, но и простые, доступные, воспроизводимые методики определения показателей критических параметров подобных систем доставки. В соответствии с проведённым научным поиском были выделены основные показатели стандартизации *in situ* интраназальных систем: температура и время гелеобразования, прочность геля, реологические характеристики, мукоадгезия, высвобождение, время назального мукоцилиарного клиренса.

Ключевые слова: *in situ* гелеобразование; иммунобиологические препараты; интраназальные вакцины; хитозан; камеди; полксамеры

Для цитирования: Бахрушина Е.О., Михел И.Б., Кондратьева В.М., Демина Н.Б., Гребенникова Т.В. *In situ* гели как современный способ интраназальной доставки вакцин. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(5): 395-402. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-139>

Для корреспонденции: Бахрушина Е.О., канд. фарм. наук, старший научный сотрудник Научно-образовательного исследовательского центра «ФАРМА-ПРЕМИУМ», доцент кафедры промышленной фармации, доцент кафедры фармацевтической технологии, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Россия. E-mail: bakhrushina_e_o@staff.sechenov.ru

Участие авторов: Бахрушина Е.О., Гребенникова Т.В. – разработка концепции обзора, написание статьи; Михел И.Б., Кондратьева В.М. – подбор источников литературы, анализ данных; Демина Н.Б., Гребенникова Т.В. – рецензирование, одобрение статьи для публикации.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии потенциальных конфликтов интересов.

Поступила 06.09.2022

Принята в печать 04.10.2022

Опубликована 31.10.2022

REVIEW ARTICLE

doi 10.36233/0507-4088-139

In situ gels as a modern method of intranasal vaccine delivery

Elena O. Bakhrushina¹, Iosif B. Mikhel¹, Valeriya M. Kondratieva², Natalya B. Demina¹, Tatyana V. Grebennikova²

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia, 119048, Moscow, Russia;

²National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia

The continuous emergence of new pathogens and the evolution of microbial drug resistance make it absolutely necessary to develop innovative, effective vaccination strategies. Use of nasal vaccination can increase convenience, safety, cause both local and systemic immune reactions. Intranasal administration nevertheless has a number of shortcomings that can be overcome by using the latest achievements of pharmaceutical science. One of the aspects of such solution may be the use of systems for the production of intranasal vaccines *in situ* – polymer compositions that provide a directed sol-gel transition controlled by the physiological conditions of the nasal cavity. At the same time, the gelation of the administered dose in contact with the nasal mucosa involves prolonged exposure of the drug at the injection site, greater mucoadhesion, counteraction to mucociliary clearance, modified and more complete release. A number of both foreign and domestic manufacturers produces polymers such as chitosan, gums, polyoxyethylene and polyoxypropylene block copolymers (poloxamers, proxanols), carbomers. For effective pharmaceutical development of new intranasal IBD delivery systems corresponding to the QbD concept, not only the knowledge of the range of excipients is necessary, but also simple, accessible, and reproducible methods for determining indicators that define the critical parameters of such delivery systems. In accordance with the conducted scientific search, the main indicators of standardization of *in situ* intranasal systems were identified: temperature and time of gel formation, gel strength, rheological characteristics, mucoadhesion, release, nasal mucociliary clearance time.

Keywords: *in situ gelation; immunobiological drugs; intranasal vaccines; chitosan; gums; poloxamers*

For citation: Bakhrushina E.O., Mikhel I.B., Kondratieva V.M., Demina N.B., Grebennikova T.V. *In situ* gels as a modern method of intranasal vaccine delivery. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(5): 395-402. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-139>

For correspondence: Elena O. Bakhrushina, PhD (Pharm.), Senior Researcher, Scientific and Educational Research Center “PHARMA-PREMIUM”, Associate Professor of the Department of Industrial Pharmacy, Associate Professor of the Department of Pharmaceutical Technology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia, 119048, Moscow, Russia. E-mail: bakhrushina_e_o@staff.sechenov.ru

Information about the authors:

Bakhrushina E.O., <https://orcid.org/0000-0001-8695-0346>

Mikhel I.B., <https://orcid.org/0000-0002-2866-0049>

Kondratieva V.M., <https://orcid.org/0000-0001-9163-4516>

Demina N.B., <https://orcid.org/0000-0003-4307-8791>

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

Contribution: Bakhrushina E.O., Grebennikova T.V. – development of the review concept, article writing; Mikhel I.B., Kondratieva V.M. – selection of literature sources, data analysis; Demina N.B., Grebennikova T.V. – peer review, approval of the article for publication.

Funding. The research was funded by the state budget.

Conflict of interest. Authors declare no potential conflicts of interest.

Received 06 September 2022

Accepted 04 October 2022

Published 31 October 2022

Введение

Наиболее эффективными методами профилактики и лечения инфекционных заболеваний являются вакцинация и введение иммунобиологических препаратов (ИБП). Примечательно, что вакцины, вводимые интраназально, могут индуцировать иммунитет слизистой оболочки, ткани которой содержат как антигенпрезентирующие, так и антигенпроцессинговые клетки, способные инициировать клеточно-опосредованные иммунные реакции, включая иммунологическую память. Назальные вакцины также могут вызы-

вать системный иммунитет через общий иммунитет слизистой системы [1].

Первое упоминание об интраназальной вакцинации в базе данных медицинских публикаций PubMed содержится в статье 1954 г. советского учёного Х.М. Розенберга [2]. Первым ИБП, использованным для интраназального введения у живых организмов, является туберкулёзная вакцина БЦЖ [3].

Недавно разработанным многообещающим подходом к созданию вакцин является использование VLP (virus-like particles – вирусоподобные частицы),

которые состоят из специфических вирусных белков и спонтанно собираются в конфигурации, имитирующие конформационную структуру вирусов, но без вирусных генов. Интраназальная вакцинация VLP от гриппа индуцирует более высокие уровни перекрёстно-реактивных антител IgA и IgG, чем парентеральная. В результате проведённых доклинических исследований было отмечено увеличение как гуморального, так и клеточного иммунного ответа.

На сегодняшний день имеются зарегистрированные или находящиеся в фазе клинических испытаний интраназальные вакцины как в России («Гам-КОВИД-Вак», «VLP-корона»), так и в США (AdCOVID, MV-014-212) и странах Европейского союза (COVI-VAC, ChAdOx1-S). Вакцины, разработанные для внутримышечного введения, предназначены для выработки гуморальных и клеточно-опосредованных иммунных реакций. Однако обеспечивается слабая защита от репликации и распространения вируса в верхних дыхательных путях из-за отсутствия местного иммунного ответа антитела IgA (sIgA). В данный момент разрабатывается ряд новых назальных вакцин против COVID-19, результаты доклинических и клинических исследований выявили высокую выработку нейтрализующих антител и реакцию слизистых оболочек на IgA и T-клеточные реакции.

Интраназальная доставка вакцин предлагает много преимуществ, по сравнению с традиционными инъекционными путями введения: отсутствие инвазии, высокую васкуляризацию носовой полости, возможность достижения лекарственным препаратом спинномозговой жидкости, минуя гематоэнцефалический барьер. Главным минусом интраназального пути введения является мукоцилиарный клиренс, нацеленный на быстрое удаление посторонних веществ из носовой полости [4]. Другая физиологическая особенность слизистой оболочки носовой полости – активный клиренс, заключающийся не только в активном колебании ресничек, удаляющих инородные объекты и лекарственные препараты с поверхности слизистой оболочки,

но также в наличии большого количества ферментов и специфического интерферона, который, в свою очередь, защищает организм от патогенов, прибавляет сложностей в интраназальной вакцинации [5]. Однако эти моменты возможно скорректировать, подобрав правильный состав вспомогательных веществ, который улучшит адгезию препарата на слизистой оболочке и обеспечит его полное проникновение в системный кровоток [6]. Одним из решений проблем интраназального введения ИБП является использование *in situ* систем доставки.

In situ системы на основе smart-полимеров представляют собой современные системы направленной доставки, изменяющие своё фазовое состояние в ответ на специфические стимулы в предполагаемом месте всасывания (значение pH, наличие специфических ионов, влаги и др.).

Таким образом, **цель** настоящего исследования можно определить как обзор особенностей и основных аспектов фармацевтической разработки *in situ* систем для интраназальной доставки ИБП.

***In situ* матрицы для интраназальной доставки вакцин**

Для получения *in situ* систем используется многообразие полимеров с различными механизмами гелеобразования и стимулами фазового перехода. Эти полимеры подразделяются на природные (хитозан, пектин, камеди) и синтетические (полоксамеры, карбополы, поливиниловый спирт и др.).

При анализе базы данных медицинских публикаций PubMed по ключевым словам *intranasal in situ vaccine*, *intranasal in situ peptide*, *intranasal in situ protein* за период 2000–2022 гг. была определена частота использования различных полимеров в технологии изготовления *in situ* систем-носителей ИБП (**рисунок**). Наибольшей популярностью характеризуются натуральные полимеры – хитозан (35%) и различные камеди (16%), а также синтетические полоксамеры (19%). Рассмотрим основные характеристики полимеров подробнее.

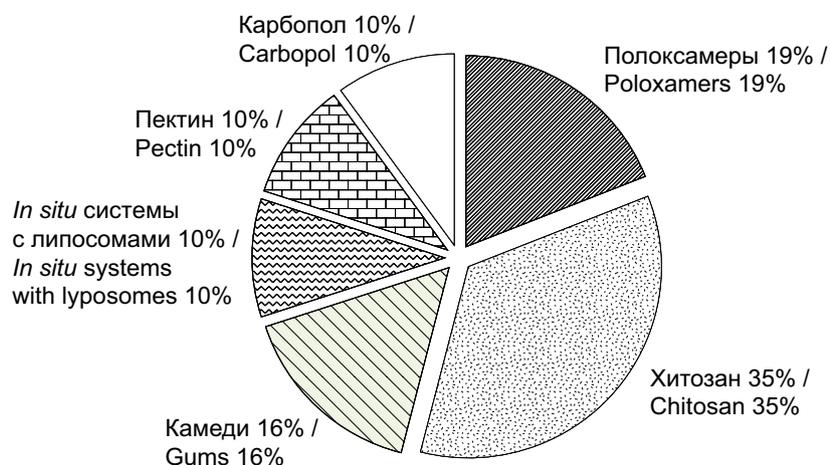


Рисунок. Соотношение использования полимеров на основе анализа базы данных медицинских публикаций PubMed.

Figure. Polymer usage ratio based on analysis of the medical publications database PubMed.

Хитозан – это природный биополисахарид катионной природы. Мукоадгезивность хитозана можно объяснить электростатическим взаимодействием между его положительно заряженной молекулой катионной природы и отрицательно заряженным муцином [7–20].

Полианионы и поликатионы (такие, как хитозан) способны к многоточечному кооперативному взаимодействию с иммунокомпетентными клетками и могут рассматриваться как потенциальные иммуномодуляторы [21].

Полоксамеры представляют собой неионные триблок-сополимеры [9, 10, 15–17, 22, 23]. В фармацевтической технологии ИБП наиболее широко используемыми являются полоксамеры 188, 407, 124.

В исследованиях для водного раствора полоксамера 407 показан *in situ* фазовый переход – при повышении температуры из золя в гель из-за уменьшения межмолекулярных взаимодействий [24].

Полоксамер 188 – это безопасный биосовместимый полимер, который может быть использован в системе доставки белковых лекарств [25]. В последнее десятилетие стали активно изучать фармакологическую активность полоксамера 188, и было доказано, что он может использоваться в лечении серповидноклеточной анемии [26]. Также стоит упомянуть гемореологические, антитромботические, противовоспалительные свойства полоксамера 188, которые сейчас очень активно исследуются [27].

Из перечисленных ранее триблок-сополимеров полоксамер 124 может использоваться как солюбилизатор, пластификатор и эмульгатор, однако его фармакокинетические свойства *in vivo* всё ещё неясны [28, 29].

Как уже отмечалось, основным термочувствительным компонентом является полоксамер 407. Кроме того, введение в состав комплекса с полоксамером 407 других эксципиентов способно регулировать температуру фазового перехода, а также повысить стабильность композиции, улучшить биофармацевтические свойства [30].

На сегодняшний день российской промышленностью выпускается аналог полоксамера 188, однако промышленно производимой альтернативы термочувствительному полоксамеру 407 по-прежнему нет [31, 32].

Для получения *in situ* систем также изучено использование трёх видов *камедей*: геллановой, ксантановой и гуаровой [33–37]. Камеди в составе *in situ* систем реализуют ионселективный фазовый переход [38].

Геллановая камедь – внеклеточный анионный водорастворимый полисахарид, продуцируемый бактериями *Sphingomonas elodea* [39].

Гуаровая камедь представляет собой галактоманновый полисахарид, извлечённый из гуаровых бобов.

Ксантановая камедь – природный полисахарид, образующийся в результате ферментации грамотрицательной бактерии *Xanthomonas campestris*.

Пектин – это анионный биополимер, широко используемый в пищевой промышленности [40–42]. В свободной форме пектин проявляет антиканцеро-

генные свойства при раке толстой кишки [43]. Основное мировое производство и рынок как пищевого, так и фармацевтического пектина сосредоточены в Европе, Южной Америке, Китае и Иране. На данный момент в России не налажено собственное производство пектина [44].

Карбомеры представляют собой высокомолекулярные сшитые полимеры полиакриловой кислоты [23, 45]. В медицинской практике водные растворы карбомеров используются вагинально в качестве спермицида, который также защищает от ВИЧ-инфекции и, возможно, других заболеваний, передающихся половым путём [46].

Разработка интраназальных *in situ* систем доставки иммунобиологических препаратов

При применении обычных назальных гелей часто возникает проблема точности дозирования препарата, у пациентов имеются жалобы на ощущение присутствия инородного тела в носу. Для решения возникающих проблем учёные из Китайского университета Гонконга разработали терморверсивный *in situ* гель для интраназальной доставки ингибитора репликации ВИЧ-1 (DB213) на основе комбинации полоксамеров 407, 188 и хитозана [16].

Одним из первых исследований в области интраназальной *in situ* доставки ИБП с *in vivo* испытанием препарата является работа индийских учёных T. Shailja и соавт. по разработке липосомальной *in situ* гелеобразующей системы доставки вакцины против гепатита В [47]. Для достижения поставленной цели был изготовлен липосомальный состав из яичного лецитина и холестерина, а *in situ* полимером служила полиакриловая кислота. По результатам *in vitro* оценки высвобождение препарата достигало 54%, но при исследовании *in vivo* были обнаружены отличные мукоадгезивные свойства.

В 2020 г. J.G. Bedford и соавт. разработали противогриппозную *in situ* вакцину, где в качестве полимеров для обеспечения её *in situ* свойств были выбраны хитозан и полоксамеры 188 и 407 [10]. Улучшенная мукоадгезия, достигаемая, по мнению авторов, за счёт хитозана, была доказана как в *in vitro*, так и в *in vivo* испытаниях.

Исследователи из США разработали порошковую норовирусную вакцину GelVac® [40, 41]. Инактивированная вакцина против гриппа H5N1 на основе назального порошка GelVac® была одобрена FDA (U.S. Food and Drug Administration – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) для тестирования на людях. Испытания на морских свинках показали высокую и более долговременную иммунизацию по сравнению с введением не *in situ* вакцин. Появление иммунного ответа было обусловлено повышением уровня IgA в крови, подклассы IgG1 и IgG2 определяли методом иммуноферментного анализа с использованием объединённых образцов сыворотки из каждой группы.

В ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного

академика имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России был протестирован адьювант для интраназального введения вакцины на основе VLP для профилактики COVID-19. Данный адьювант состоял из геля, полученного посредством смеси желатиновой камеди 0,5 и 2% полоксамера 124, растворённого в дистиллированной воде с добавлением 15% PBS (phosphate buffered saline – фосфатно-солевой буфер). По результатам предварительных экспериментов данный гель показал высокое удержание в носовой полости – до 83%. В группе мышей линии hACE2 AC70, иммунизированных интраназально вакциной на основе VLP, содержащей 80 мкг антигена в дозе и данный адьювант в соотношении 3 : 2, показана активация Т-клеточного иммунного ответа, что выражалось в статистически значимом увеличении индекса специфической пролиферации ($3,3 \pm 0,28$) в реакции бласттрансформации лимфоцитов, коррелирующим с формированием интерферона- γ секретирующих клеток. После инфицирования животных вирусом SARS-CoV-2, получивших трёхкратную дозу вакцины интраназально, половина животных выжила, при этом в контрольной группе животных, не получивших вакцину, все животные погибли. При этом была показана безопасность данного геля. Так, иммунизация вакциной на основе VLP с гелевым адьювантом не влияла на индивидуальную массу тела и прирост массы тела в течение 42 дней эксперимента в ходе трёхкратной иммунизации интраназально. В группе иммунизированных животных отмечено потребление корма и воды выше, чем в контрольной группе.

При плановой аутопсии мышей линии hACE2 AC70 на 7-й день после второй и третьей иммунизации в ходе визуального осмотра внешнего состояния тела, внутренних органов и тканей, полости черепа, грудной, брюшной и тазовой полостей, каркаса и скелетно-мышечной системы макроскопических изменений, связанных с действием вакцины с адьювантом, не выявлено.

Безусловно, необходимо совершенствовать состав гелей для интраназальных вакцин, чтобы оптимизировать формуляцию и усилить протективное действие вакцин.

Дизайн фармацевтической разработки *in situ* интраназальных иммунобиологических препаратов

Основным достижением современных R&D (Research and Development) процессов в фармацевтической технологии и биотехнологии являются оптимизация и стандартизация проведения фармацевтической разработки [48, 49]. Одним из наиболее широко используемых методов является построение пространства проектных параметров (design space). Подобные методы активно используются для разработки твёрдых лекарственных форм (функция желательности Харрингтона, SeDeM expert system) [50, 51] и документально зафиксированы в ICH Q8.

Таким образом, при использовании всех современных возможностей для ускорения R&D процессов перед исследователями остаются две *основные зада-*

чи: обоснованного выбора пула вспомогательных веществ для проведения разработки и основных критических параметров для конкретной разрабатываемой системы, а также воспроизводимых доступных методик, обеспечивающих достоверность получаемых результатов.

Выбор эксципиентов для создания новых интраназальных *in situ* систем доставки ИБП может базироваться на научном и патентном поиске (**рисунок**). Проверка эффективности и выживаемости иммунобиологических субстанций является обязательным этапом фармацевтической разработки ИБП [52].

Выбор критических параметров для *in situ* интраназальных систем доставки: температура и время гелеобразования, реологические параметры, высвобождение *in vitro*, мукоадгезия *in vitro / ex vivo*, противодействие мукоцилиарному клиренсу *in vivo* [6].

Температуру гелеобразования большинство исследователей определяют по методике J.C. Gilbert и соавт., описанной в статье 1987 г. [53].

По схожим методикам также определяют *время гелеобразования и прочность геля*, определяющие способность состава нивелировать мукоцилиарный клиренс [10, 11, 16–18, 22, 23, 54].

Для оценки *высвобождения* ИБП из лекарственных форм часто используют тестер с вертикальной диффузионной ячейкой Франца [4, 8, 9, 24, 34].

Для *in vitro* оценки *прочности мукоадгезии* полимерных составов после *in situ* гелеобразования в носовой полости канадские ученые из Университета Макмастер предложили рассчитывать силу мукоадгезии путём построения градуировочного графика, зависимость силы натяжения от конечного положения пластин с 2% раствором муцина и исследуемым составом полимеров [13].

Для более таргетного скрининга некоторые авторы изучают время назального мукоцилиарного клиренса по методике, предложенной N.M. Zaki и соавт. в 2007 г. [55].

Заключение

Использование *in situ* систем доставки для интраназального введения вакцин позволяет достигать как местного, так и системного действия ИБП без нарушения кожных покровов. Накоплен значительный опыт как в R&D процессах, так и в доклинических и клинических исследованиях подобных систем введения белковых и других частиц. Научный поиск показал, что термореверсивные составы полимеров являются наиболее распространёнными для интраназальной *in situ* доставки ИБП, а ионселективные полимеры могут быть отличной альтернативой для дальнейшего изучения и разработки новых *in situ* систем интраназальной доставки.

ЛИТЕРАТУРА

- Xu H., Cai L., Hufnagel S., Cui Z. Intranasal vaccine: Factors to consider in research and development. *Int. J. Pharm.* 2021; 609: 121180. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121180>
- Иванов Б.А. Отечественная литература по вопросам микробиологии, иммунологии, инфекционным болезням и эпидемиоло-

- гии за конец 1954 г. и первый квартал 1955 г. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1955; 32(12): 97–105.
3. Розенберг Х.М. Экспериментальное изучение интраназального метода вакцинации БЦЖ. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1954; 31(7): 75–81.
 4. Порфирьева Н.Н., Семина И.И., Мустафин Р.И., Хуторянский В.В. Интраназальное введение как способ доставки лекарств в головной мозг (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021; 10(4): 117–27. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-117-127>
 5. Кунельская Н.Л., Артемьева-Карелова А.В. Основные компоненты назального секрета. Мукоактивные средства во врачебной практике. *Лечебное дело*. 2013; (3): 5–7.
 6. Бахрушина Е.О., Демина Н.Б., Шумкова М.М., Родюк П.С., Шуликина Д.С., Краснюк И.И. Интраназальные системы доставки in situ: перспективы применения и основные фармацевтические аспекты разработки (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021; 10(4): 54–63. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-54-63>
 7. Иванушко Л.А., Соловьева Т.Ф., Запорожец Т.С., Сомова Л.М., Горбач В.И. Антибактериальные и антитоксические свойства хитозана и его производных. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2009; (3): 82–5.
 8. Kempe S., Mäder K. In situ forming implants – an attractive formulation principle for parenteral depot formulations. *J. Control. Release*. 2012; 161(2): 668–79. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.016>
 9. Vigani B., Rossi S., Sandri G., Bonferoni M.C., Caramella C.M., Ferrari F. Recent advances in the development of in situ gelling drug delivery systems for non-parenteral administration routes. *Pharmaceutics*. 2020; 12(9): 859. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090859>
 10. Bedford J.G., Caminschi I., Wakim L.M. Intranasal delivery of a chitosan-hydrogel vaccine generates nasal tissue resident memory CD8+ t cells that are protective against influenza virus infection. *Vaccines (Basel)*. 2020; 8(4): 572. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040572>
 11. Ozbilgin N.D., Saka O.M., Bozkır A. Preparation and in vitro/ in vivo evaluation of mucosal adjuvant in situ forming gels with diphtheria toxoid. *Drug Deliv*. 2014; 21(2): 140–7. <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.834754>
 12. Zhao K., Shi X., Zhao Y., Wei H., Sun Q., Huang T., et al. Preparation and immunological effectiveness of a swine influenza DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles. *Vaccine*. 2011; 29(47): 8549–56. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.029>
 13. Majcher M.J., Babar A., Lofts A., Leung A., Li X., Abu-Hijleh F., et al. In situ-gelling starch nanoparticle (SNP)/O-carboxymethyl chitosan (CMCh) nanoparticle network hydrogels for the intranasal delivery of an antipsychotic peptide. *J. Control. Release*. 2021; 330: 738–52. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.12.050>
 14. Agrawal A.K., Gupta P.N., Khanna A., Sharma R.K., Chandrawanshi H.K., Gupta N., et al. Development and characterization of in situ gel system for nasal insulin delivery. *Pharmazie*. 2010; 65(3): 188–93.
 15. Luppi B., Bigucci F., Mercolini L., Musenga A., Sorrenti M., Cateucci L., et al. Novel mucoadhesive nasal inserts based on chitosan/hyaluronate polyelectrolyte complexes for peptide and protein delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 2009; 61(2): 151–7. <https://doi.org/10.1211/jpp/61.02.0003>
 16. Wang Q., Wong C.H., Chan H.Y.E., Lee W.Y., Zuo Z. Statistical Design of Experiment (DoE) based development and optimization of DB213 in situ thermosensitive gel for intranasal delivery. *Int. J. Pharm.* 2018; 539(1-2): 50–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.01.032>
 17. Ahmad N., Ahmad R., Ahmad F.J., Ahmad W., Alam M.A., Amir M., et al. Poloxamer-chitosan-based Naringenin nanoformulation used in brain targeting for the treatment of cerebral ischemia. *Saudi J. Biol. Sci.* 2020; 27(1): 500–17. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.11.008>
 18. Diaz A.G., Quinteros D.A., Gutiérrez S.E., Rivero M.A., Palma S.D., Allemandi D.A., et al. Immune response induced by conjunctival immunization with polymeric antigen BLSOmp31 using a thermoresponsive and mucoadhesive in situ gel as vaccine delivery system for prevention of ovine brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2016; 178: 50–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.07.004>
 19. Zadeh S.N., Rajabnezhad S., Zandkarimi M., Dahmardeh S., Mir L., Darbandi M.A., et al. Mucoadhesive microspheres of chitosan and polyvinyl alcohol as a carrier for intranasal delivery of insulin: in vitro and in vivo studies. *MOJ Bioequiv. Availab.* 2017; 3(2): 00030.
 20. Krauland A.H., Guggi D., Bernkop-Schnürch A. Thiolated chitosan microparticles: a vehicle for nasal peptide drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2006; 307(2): 270–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.016>
 21. Das S.S., Kar S., Singh S.K., Hussain A., Verma P.R.P., Beg S. Chapter 13: Carboxymethyl chitosan in advanced drug-delivery applications. In: Hasnain M.S., Beg S., Nayak A.K., eds. *Chitosan in Drug Delivery*. Academic Press; 2022: 323–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819336-5.00006-6>
 22. Park J.S., Oh Y.K., Yoon H., Kim J.M., Kim C.K. In situ gelling and mucoadhesive polymer vehicles for controlled intranasal delivery of plasmid DNA. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 59(1): 144–51. <https://doi.org/10.1002/jbm.1227>
 23. Mura P., Mennini N., Nativi C., Richichi B. In situ mucoadhesive-thermosensitive liposomal gel as a novel vehicle for nasal extended delivery of opiorphin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018; 122: 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.10.008>
 24. Otero-Espinar F.J., Fernández-Ferreiro A., González-Barcia M., Blanco-Méndez J., Luzardo A. Chapter 6: Stimuli sensitive ocular drug delivery systems. In: Grumezescu A.M., ed. *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems*. William Andrew Publishing; 2018: 211–70. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813689-8.00006-9>
 25. Tian J.L., Zhao Y.Z., Jin Z., Lu C.T., Tang Q.Q., Xiang Q., et al. Synthesis and characterization of Poloxamer 188-grafted heparin copolymer. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2010; 36(7): 832–8. <https://doi.org/10.3109/03639040903520983>
 26. Zylke J. Poloxamer 188 for Sickle Cell Disease. *JAMA*. 2021; 325(15): 1524. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.3399>
 27. Emanuele M., Balasubramaniam B. Differential effects of commercial-grade and purified poloxamer 188 on renal function. *Drugs R.D.* 2014; 14(2): 73–83. <https://doi.org/10.1007/s40268-014-0041-0>
 28. Li Y., Cui Y., Li L., Lin X., Zhou X., Zhu H., et al. A UHPLC-Q-TOF/MS method for the determination of poloxamer 124 and its application in a tissue distribution study in rats. *Anal. Methods*. 2021; 13(45): 5516–22. <https://doi.org/10.1039/d1ay01373d>
 29. Li Y., Cui Y., Li L., Lin X., Zhou X., Zhu H., et al. Ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time of flight mass spectrometry method for quantifying polymer poloxamer 124 and its application to pharmacokinetic study. *J. Sep. Sci.* 2021; 44(20): 3822–9. <https://doi.org/10.1002/jssc.202100552>
 30. Bakhrushina E.O., Novozhilova E.V., Kashperko A.S., Sokolova A.V., Demina N.B., Krasnyuk I.I. Biopharmaceutical study of binary poloxamer systems as in situ drug delivery systems poloxamer polycomplexes: The study. *Int. J. Appl. Pharm.* 2022; 14(3): 162–5. <https://doi.org/10.22159/ijap.2022v14i3.43930>
 31. Аршинцева Е.В., Пушкин С.Ю. Сравнительное изучение острой токсичности полкоксамеров при внутривенном введении на аутбредных крысах. *Интернаука: научный журнал*. 2022; 13(236). <https://doi.org/10.32743/26870142.2022.13.236.336593>
 32. Воробьев С.И. Биологические и физико-химические свойства неионогенных поверхностно-активных веществ-стабилизаторов эмульсий. *Российский биотерапевтический журнал*. 2009; 8(3): 3–8.
 33. Kola M., Puri G.K., Unnisa M.T., Swapna J., Phanivarma K. Formulation, optimization and evaluation of rasagiline mesylate in situ nasal gel. *Indo Am. J. Pharm. Res.* 2018; 8(09): 1645–54.
 34. Bertram U., Bernard M.C., Haensler J., Maincent P., Bodmeier R. In situ gelling nasal inserts for influenza vaccine delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2010; 36(5): 581–93. <https://doi.org/10.3109/03639040903382673>
 35. Thakkar J.H., Prajapati S.T. Formulation development and characterization of in-situ gel of Rizatriptan Benzoate for intranasal delivery. *J. Drug Deliv. Ther.* 2021; 11(1-S): 1–6.
 36. Bertram U., Bodmeier R. In situ gelling, bioadhesive nasal inserts for extended drug delivery: in vitro characterization of a new nasal dosage form. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006; 27(1): 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.08.005>
 37. Cao S.L., Ren X.W., Zhang Q.Z., Chen E., Xu F., Chen J., et al. In situ gel based on gellan gum as new carrier for nasal administration of mometasone furoate. *Int. J. Pharm.* 2009; 365(1-2): 109–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.08.042>
 38. Демина Н.Б., Бахрушина Е.О., Бардаков А.И., Краснюк И.И. Биофармацевтические аспекты дизайна интраназальных лекарственных форм. *Фармация*. 2019; 68(3): 12–7.
 39. Maia F.R., Correló V.M., Oliveira J.M., Reis R.L. Chapter 32: Natural origin materials for bone tissue engineering: properties, processing, and performance. In: Atala A., Lanza R., Mikos A.G., Nerem R., eds. *Principles of Regenerative Medicine (Third Edition)*.

REFERENCES

- Academic Press; 2019: 535–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809880-6.00032-1>
40. Ball J.P., Springer M.J., Ni Y., Finger-Baker I., Martinez J., Hahn J., et al. Intranasal delivery of a bivalent norovirus vaccine formulated in an in situ gelling dry powder. *PLoS One*. 2017; 12(5): e0177310. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177310>
 41. Velasquez L.S., Shira S., Berta A.N., Kilbourne J., Medi B.M., Tizard I., et al. Intranasal delivery of Norwalk virus-like particles formulated in an in situ gelling, dry powder vaccine. *Vaccine*. 2011; 29(32): 5221–31. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.027>
 42. Dukovski B.J., Plantić I., Čunčić I., Krtalić I., Juretić M., Pepić I., et al. Lipid/alginate nanoparticle-loaded in situ gelling system tailored for dexamethasone nasal delivery. *Int. J. Pharm.* 2017; 533(2): 480–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.065>
 43. Giri T.K. 5-nanoarchitected polysaccharide-based drug carrier for ocular therapeutics. In: Holban A.M., Mihai G.A. *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting*. William Andrew Publishing; 2016: 119–41. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47347-7.00005-7>
 44. Икласова А.Ш., Сакипова З.Б., Бекболатова Э.Н. Пектин: состав, технология получения, применение в пищевой и фармацевтической промышленности. *Вестник Казахского национального медицинского университета*. 2018; (3): 243–6.
 45. Patil P.R., Salve V.K., Thorat R.U., Sadhana S. Formulation and evaluation of ion-sensitive in-situ nasal gel of Zolmitriptan. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2015; (7): 478–86.
 46. Gaganjot K., Grewal J., Jyoti K., Jain U.K., Chandra R., Madan J. Chapter 15: Oral controlled and sustained drug delivery systems: Concepts, advances, preclinical, and clinical status. In: Grumezescu A.M., ed. *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems*. William Andrew Publishing; 2018: 567–626. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813689-8.00015-X>.
 47. Tiwari S., Goyal A.K., Mishra N., Vaidya B., Mehta A., Dube D., et al. Liposome in situ gelling system: Novel carrier based vaccine adjuvant for intranasal delivery of recombinant protein vaccine. *Procedia Vaccinol.* 2009; 1(1): 148–63. <https://doi.org/10.1016/j.provac.2009.07.027>
 48. Бркич Г.Э., Пятигорская Н.В., Каргин В.С., Зырянов О.А. Разработка дизайна исследований по определению эффективности и безопасности инновационного лекарственного средства. *Медико-фармацевтический журнал «Пульс»*. 2022; 24(5): 19–23. <https://doi.org/10.26787/nydha-2686-6838-2022-24-5-19-23>
 49. Зырянов О.А. *Разработка состава и технологии получения лекарственной формы на основе триазатрициклотетрадекана потенциального модулятора АМРА-рецептора*: Дисс. ... канд. фарм. наук. М.; 2021.
 50. Flórez Borges P., García-Montoya E., Pérez-Lozano P., Jo E., Miñarro M., Manich A., et al. The role of SeDeM for characterizing the active substance and polyvinylpyrrolidone eliminating metastable forms in an oral lyophilizate-A preformulation study. *PLoS One*. 2018; 13(4): e0196049. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196049>
 51. Гуленков А.С., Мизина П.Г., Бахрушина Е.О., Бардаков А.И., Нюдочкин А.В. Фармацевтико-технологическое исследование адсорбированного жидкого растительного экстракта антимикробного действия. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022; 11(2): 94–101. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-94-101>
 52. Бахрушина Е.О., Анурова М.Н., Алешкин А.В., Демина Н.Б., Краснюк И.И., Пятигорская Н.В. и др. Современные тенденции применения и создания лекарственных препаратов бактериофагов. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2021; 76(4): 351–60. <https://doi.org/10.15690/vramn1380>
 53. Gilbert J.C., Richardson J.L., Davies M.C., Palin K.J., Hadgraft J. The effect of solutes and polymers on the gelation properties of pluronic F-127 solutions for controlled drug delivery. *J. Control. Release*. 1987; 5(2): 113–8. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90002-2](https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90002-2)
 54. Nižić L., Ugrina I., Špoljarić D., Saršon V., Kučuk M.S., Pepić I., et al. Innovative sprayable in situ gelling fluticasone suspension: Development and optimization of nasal deposition. *Int. J. Pharm.* 2019; 563: 445–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.015>
 55. Zaki N.M., Awad G.A., Mortada N.D., ElHady S.S.A. Enhanced bioavailability of metoclopramide HCl by intranasal administration of a mucoadhesive in situ gel with 28 modulated rheological and mucociliary transport properties. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2007; 32(4-5): 296–307. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2007.08.006>
 1. Xu H., Cai L., Hufnagel S., Cui Z. Intranasal vaccine: Factors to consider in research and development. *Int. J. Pharm.* 2021; 609: 121180. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121180>
 2. Ivanov B.A. Russian literature on microbiology, immunology, infectious diseases and epidemiology published during the final months of 1954 and during the first quarter of 1955. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1955; 32(12): 97–105. (in Russian)
 3. Rozenberg Kh.M. Experimental studies on intranasal BCG vaccination. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 1954; 31(7): 75–81. (in Russian)
 4. Porfir'eva N.N., Semina I.I., Mustafin R.I., Khutoryanskiy V.V. Intranasal administration as a route to deliver drugs to the brain (review). *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv*. 2021; 10(4): 117–27. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-117-127>
 5. Kunel'skaya N.L., Artem'eva-Karelova A.V. The main components of nasal secretions: mucoactive drugs. *Lechebnoe delo*. 2013; (3): 5–7. (in Russian)
 6. Bakhrushina E.O., Demina N.B., Shumkova M.M., Rodyuk P.S., Shulikina D.S., Krasnyuk I.I. In situ intranasal delivery systems: application prospects and main pharmaceutical aspects of development (review). *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv*. 2021; 10(4): 54–63. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4-54-63> (in Russian)
 7. Ivanushko L.A., Solov'eva T.F., Zaporozhets T.S., Somova L.M., Gorbach V.I. Antibacterial and antitoxic properties of chitosan and its derivatives. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2009; (3): 82–5. (in Russian)
 8. Kempe S., Mäder K. In situ forming implants – an attractive formulation principle for parenteral depot formulations. *J. Control. Release*. 2012; 161(2): 668–79. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.016>
 9. Viganì B., Rossi S., Sandri G., Bonferoni M.C., Caramella C.M., Ferrari F. Recent advances in the development of in situ gelling drug delivery systems for non-parenteral administration routes. *Pharmaceutics*. 2020; 12(9): 859. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090859>
 10. Bedford J.G., Caminschi I., Wakim L.M. Intranasal delivery of a chitosan-hydrogel vaccine generates nasal tissue resident memory CD8+ T cells that are protective against influenza virus infection. *Vaccines (Basel)*. 2020; 8(4): 572. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040572>
 11. Ozbilgin N.D., Saka O.M., Bozkur A. Preparation and in vitro/in vivo evaluation of mucosal adjuvant in situ forming gels with diphtheria toxoid. *Drug Deliv.* 2014; 21(2): 140–7. <https://doi.org/10.3109/10717544.2013.834754>
 12. Zhao K., Shi X., Zhao Y., Wei H., Sun Q., Huang T., et al. Preparation and immunological effectiveness of a swine influenza DNA vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles. *Vaccine*. 2011; 29(47): 8549–56. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.09.029>
 13. Majcher M.J., Babar A., Lofts A., Leung A., Li X., Abu-Hijleh F., et al. In situ-gelling starch nanoparticle (SNP)/O-carboxymethyl chitosan (CMCh) nanoparticle network hydrogels for the intranasal delivery of an antipsychotic peptide. *J. Control. Release*. 2021; 330: 738–52. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.12.050>
 14. Agrawal A.K., Gupta P.N., Khanna A., Sharma R.K., Chandrawanshi H.K., Gupta N., et al. Development and characterization of in situ gel system for nasal insulin delivery. *Pharmazie*. 2010; 65(3): 188–93.
 15. Luppi B., Bigucci F., Mercolini L., Musenga A., Sorrenti M., Catenacci L., et al. Novel mucoadhesive nasal inserts based on chitosan/hyaluronate polyelectrolyte complexes for peptide and protein delivery. *J. Pharm. Pharmacol.* 2009; 61(2): 151–7. <https://doi.org/10.1211/jpp/61.02.0003>
 16. Wang Q., Wong C.H., Chan H.Y.E., Lee W.Y., Zuo Z. Statistical Design of Experiment (DoE) based development and optimization of DB213 in situ thermosensitive gel for intranasal delivery. *Int. J. Pharm.* 2018; 539(1-2): 50–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.01.032>
 17. Ahmad N., Ahmad R., Ahmad F.J., Ahmad W., Alam M.A., Amir M., et al. Poloxamer-chitosan-based Naringenin nanoformulation used in brain targeting for the treatment of cerebral ischemia. *Saudi J. Biol. Sci.* 2020; 27(1): 500–17. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.11.008>
 18. Diaz A.G., Quinteros D.A., Gutiérrez S.E., Rivero M.A., Palma S.D., Allemanni D.A., et al. Immune response induced by conjunctival immunization with polymeric antigen BLSOmp31 using a thermoresponsive and mucoadhesive in situ gel as vaccine delivery system for prevention of ovine brucellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2016; 178: 50–6. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.07.004>

19. Zadeh S.N., Rajabnezhad S., Zandkarimi M., Dahmardeh S., Mir L., Darbandi M.A., et al. Mucoadhesive microspheres of chitosan and polyvinyl alcohol as a carrier for intranasal delivery of insulin: in vitro and in vivo studies. *MOJ Bioequiv. Availab.* 2017; 3(2): 00030.
20. Krauland A.H., Guggi D., Bernkop-Schnürch A. Thiolated chitosan microparticles: a vehicle for nasal peptide drug delivery. *Int. J. Pharm.* 2006; 307(2): 270–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.016>
21. Das S.S., Kar S., Singh S.K., Hussain A., Verma P.R.P., Beg S. Chapter 13: Carboxymethyl chitosan in advanced drug-delivery applications. In: Hasnain M.S., Beg S., Nayak A.K., eds. *Chitosan in Drug Delivery*. Academic Press; 2022: 323–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819336-5.00006-6>
22. Park J.S., Oh Y.K., Yoon H., Kim J.M., Kim C.K. In situ gelling and mucoadhesive polymer vehicles for controlled intranasal delivery of plasmid DNA. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 59(1): 144–51. <https://doi.org/10.1002/jbm.1227>
23. Mura P., Mennini N., Nativi C., Richichi B. In situ mucoadhesive-thermosensitive liposomal gel as a novel vehicle for nasal extended delivery of otioporphin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018; 122: 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.10.008>
24. Otero-Espinar F.J., Fernández-Ferreiro A., González-Barcia M., Blanco-Méndez J., Luzardo A. Chapter 6: Stimuli sensitive ocular drug delivery systems. In: Grumezescu A.M., ed. *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems*. William Andrew Publishing; 2018: 211–70. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813689-8.00006-9>
25. Tian J.L., Zhao Y.Z., Jin Z., Lu C.T., Tang Q.Q., Xiang Q., et al. Synthesis and characterization of Poloxamer 188-grafted heparin copolymer. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2010; 36(7): 832–8. <https://doi.org/10.3109/03639040903520983>
26. Zylke J. Poloxamer 188 for Sickle Cell Disease. *JAMA.* 2021; 325(15): 1524. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.3399>
27. Emanuele M., Balasubramaniam B. Differential effects of commercial-grade and purified poloxamer 188 on renal function. *Drugs R.D.* 2014; 14(2): 73–83. <https://doi.org/10.1007/s40268-014-0041-0>
28. Li Y., Cui Y., Li L., Lin X., Zhou X., Zhu H., et al. A UHPLC-Q-TOF/MS method for the determination of poloxamer 124 and its application in a tissue distribution study in rats. *Anal. Methods.* 2021; 13(45): 5516–22. <https://doi.org/10.1039/d1ay01373d>
29. Li Y., Cui Y., Li L., Lin X., Zhou X., Zhu H., et al. Ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time of flight mass spectrometry method for quantifying polymer poloxamer 124 and its application to pharmacokinetic study. *J. Sep. Sci.* 2021; 44(20): 3822–9. <https://doi.org/10.1002/jssc.202100552>
30. Bakhrushina E.O., Novozhilova E.V., Kashperko A.S., Sokolova A.V., Demina N.B., Krasnyuk I.I. Biopharmaceutical study of binary poloxamer systems as in situ drug delivery systems poloxamer polycomplexes: The study. *Int. J. Appl. Pharm.* 2022; 14(3): 162–5. <https://doi.org/10.22159/ijap.2022v14i3.43930>
31. Arshintseva E.V., Pushkin S.Yu. Comparative study of acute toxicity of poloxamers with intravenous administration in outbred rats. *Internauka: nauchnyy zhurnal.* 2022; 13(236). <https://doi.org/10.32743/26870142.2022.13.236.336593> (in Russian)
32. Vorob'ev S.I. New approach toward clinical trial design of targeted agents. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal.* 2009; 8(3): 3–8. (in Russian)
33. Kola M., Puri G.K., Unnisa M.T., Swapna J., Phanivarma K. Formulation, optimization and evaluation of rasagiline mesylate in situ nasal gel. *Indo Am. J. Pharm. Res.* 2018; 8(09): 1645–54.
34. Bertram U., Bernard M.C., Haensler J., Moincent P., Bodmeier R. In situ gelling nasal inserts for influenza vaccine delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 2010; 36(5): 581–93. <https://doi.org/10.3109/03639040903382673>
35. Thakkar J.H., Prajapati S.T. Formulation development and characterization of in-situ gel of Rizatriptan Benzoate for intranasal delivery. *J. Drug Deliv. Ther.* 2021; 11(1-S): 1–6.
36. Bertram U., Bodmeier R. In situ gelling, bioadhesive nasal inserts for extended drug delivery: in vitro characterization of a new nasal dosage form. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006; 27(1): 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2005.08.005>
37. Cao S.L., Ren X.W., Zhang Q.Z., Chen E., Xu F., Chen J., et al. In situ gel based on gellan gum as new carrier for nasal administration of mometasone furoate. *Int. J. Pharm.* 2009; 365(1-2): 109–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2008.08.042>
38. Demina N.B., Bakhrushina E.O., Bardakov A.I., Krasnyuk I.I. Design of intranasal dosage forms: biopharmaceutical aspects. *Farmatsiya.* 2019; 68(3): 12–7. (in Russian)
39. Maia F.R., Correlo V.M., Oliveira J.M., Reis R.L. Chapter 32: Natural origin materials for bone tissue engineering: properties, processing, and performance. In: Atala A., Lanza R., Mikos A.G., Nerem R., eds. *Principles of Regenerative Medicine (Third Edition)*. Academic Press; 2019: 535–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809880-6.00032-1>
40. Ball J.P., Springer M.J., Ni Y., Finger-Baker I., Martinez J., Hahn J., et al. Intranasal delivery of a bivalent norovirus vaccine formulated in an in situ gelling dry powder. *PLoS One.* 2017; 12(5): e0177310. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177310>
41. Velasquez L.S., Shira S., Berta A.N., Kilbourne J., Medi B.M., Tizard I., et al. Intranasal delivery of Norwalk virus-like particles formulated in an in situ gelling, dry powder vaccine. *Vaccine.* 2011; 29(32): 5221–31. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.05.027>
42. Dukovski B.J., Plantić I., Čunčić I., Krtalić I., Juretić M., Pepić I., et al. Lipid/alginate nanoparticle-loaded in situ gelling system tailored for dexamethasone nasal delivery. *Int. J. Pharm.* 2017; 533(2): 480–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.05.065>
43. Giri T.K. 5-nanoarchitected polysaccharide-based drug carrier for ocular therapeutics. In: Holban A.M., Mihai G.A. *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting*. William Andrew Publishing; 2016: 119–41. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-47347-7.00005-7>
44. Iklasova A.Sh., Sakipova Z.B., Bekbolatova E.N. Pectin: composition, technology of production, application in food and pharmaceutical industry. *Vestnik Kazakhskogo natsional'nogo meditsinskogo universiteta.* 2018; (3): 243–6. (in Russian)
45. Patil P.R., Salve V.K., Thorat R.U., Sadhana S. Formulation and evaluation of ion-sensitive in-situ nasal gel of Zolmitriptan. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2015; (7): 478–86.
46. Gaganjot K., Grewal J., Jyoti K., Jain U.K., Chandra R., Madan J. Chapter 15: Oral controlled and sustained drug delivery systems: Concepts, advances, preclinical, and clinical status. In: Grumezescu A.M., ed. *Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems*. William Andrew Publishing; 2018: 567–626. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813689-8.00015-X>
47. Tiwari S., Goyal A.K., Mishra N., Vaidya B., Mehta A., Dube D., et al. Liposome in situ gelling system: Novel carrier based vaccine adjuvant for intranasal delivery of recombinant protein vaccine. *Procedia Vaccinol.* 2009; 1(1): 148–63. <https://doi.org/10.1016/j.provac.2009.07.027>
48. Brkich G.E., Pyatigorskaya N.V., Kargin V.S., Zyryanov O.A. Development of the design of a study to determine the efficiency and safety of innovative drug. *Mediko-farmatsevticheskiy zhurnal «Pul's».* 2022; 24(5): 19–23. <https://doi.org/10.26787/nydha-2686-6838-2022-24-5-19-23> (in Russian)
49. Zyryanov O.A. *Development of the composition and technology for obtaining a dosage form based on triazatricyclohexadecane potential modulator of the AMPA receptor*. Diss. Moscow; 2021. (in Russian)
50. FlórezBorgesP., García-MontoyaE., Pérez-LozanoP., JoE., Miñarrom., Manich A., et al. The role of SeDeM for characterizing the active substance and polyvinylpyrrolidone eliminating metastable forms in an oral lyophilizate-A preformulation study. *PLoS One.* 2018; 13(4): e0196049. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196049>
51. Gulenkov A.S., Mizina P.G., Bakhrushina E.O., Bardakov A.I., Nyudochkin A.V. Pharmaceutical-technological study of adsorbed liquid plant extract of antimicrobial activity. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv.* 2022; 11(2): 94–101. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-2-94-101> (in Russian)
52. Bakhrushina E.O., Anurova M.N., Aleshkin A.V., Demina N.B., Krasnyuk I.I., Pyatigorskaya N.V., et al. Modern tendencies of the use and development of drugs of bacteriophages. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2021; 76(4): 351–60. <https://doi.org/10.15690/vramn1380> (in Russian)
53. Gilbert J.C., Richardson J.L., Davies M.C., Palin K.J., Hadgraft J. The effect of solutes and polymers on the gelation properties of pluronic F-127 solutions for controlled drug delivery. *J. Control. Release.* 1987; 5(2): 113–8. [https://doi.org/10.1016/0168-3659\(87\)90002-2](https://doi.org/10.1016/0168-3659(87)90002-2)
54. Nižić L., Ugrina I., Špoljarić D., Saršon V., Kučuk M.S., Pepić I., et al. Innovative sprayable in situ gelling fluticasone suspension: Development and optimization of nasal deposition. *Int. J. Pharm.* 2019; 563: 445–56. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.04.015>
55. Zaki N.M., Awad G.A., Mortada N.D., Elhady S.S.A. Enhanced bioavailability of metoclopramide HCl by intranasal administration of a mucoadhesive in situ gel with 28 modulated rheological and mucociliary transport properties. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2007; 32(4-5): 296–307. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2007.08.006>

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ<https://doi.org/10.36233/0507-4088-130>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Электронно-микроскопическое исследование неокортекса сирийских хомяков (*Mesocricetus auratus*) при инфекции вируса SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Coronavirinae*: *Betacoronavirus*: *Sarbecovirus*)

Парамонова Н.М.^{1,2}, Чепур С.В.¹, Первак М.О.¹, Мясников В.А.¹, Тюнин М.А.¹, Ильинский Н.С.¹, Каневский Б.А.¹, Смирнова А.В.¹

¹ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова» Российской академии наук, 194223, г. Санкт-Петербург, Россия

Введение. У пациентов, перенёсших COVID-19, выявляют признаки поражения центральной нервной системы, в том числе непосредственно ассоциированные с вирусом SARS-CoV-2. В связи с этим особую актуальность приобретают морфологические исследования изменений, вызываемых SARS-CoV-2, в коре головного мозга для изучения механизмов их формирования и разработки подходов к доклинической оценке эффективности противовирусных лекарственных средств.

Цель работы – изучение динамики ультраструктурных изменений в неокортексе сирийских хомяков после заражения вирусом SARS-CoV-2.

Материалы и методы. Самцов сирийских хомяков массой тела 80–100 г в возрасте 4–6 недель интраназально заражали 26 мкл культуры SARS-CoV-2 с концентрацией вирусных частиц 4×10^4 ТЦД₅₀/мл. Эвтаназию выполняли на 3-и, 7-е или 28-е сутки после заражения, мозг извлекали с иссечением коры. Исследование материала проводили методом трансмиссионной электронной микроскопии.

Результаты и обсуждение. Установлено, что через трое суток после заражения в неокортексе возрастает количество умеренно гиперхромных нейронов, тогда как к 7-м суткам значительно увеличивается количество апоптотических клеток. В эти же сроки нарастают признаки нейронофагии и представительство атипичной глии. На 28-е сутки после заражения животных возрастает количество деструктивно изменённых олигодендроцитов. Показано, что вирусная инвазия уже на 3-и сутки после заражения сопряжена с конформационными изменениями клеток неокортекса – преобразованиями ядра, шероховатого эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, а также со спазмом микрососудов в сочетании с отёком периваскулярного пространства.

Заключение. В результате электронно-микроскопического исследования описаны ультраструктурные изменения неокортекса на экспериментальной модели инфекции SARS-CoV-2. Полученные данные могут быть применены для изучения патогенеза инфекции и поиска направлений разработки новых лекарственных средств.

Ключевые слова: SARS-CoV-2; неокортекс; нейроны; глиальные клетки; гематоэнцефалический барьер

Для цитирования: Парамонова Н.М., Чепур С.В., Первак М.О., Мясников В.А., Тюнин М.А., Ильинский Н.С., Каневский Б.А., Смирнова А.В. Электронно-микроскопическое исследование неокортекса сирийских хомяков (*Mesocricetus auratus*) при инфекции вируса SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Coronavirinae*: *Betacoronavirus*: *Sarbecovirus*). *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(5): 403–413. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-130>

Для корреспонденции: Смирнова Анна Владимировна, научный сотрудник ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, Россия. E-mail: gniiivm_7@mail.ru

Участие авторов: Парамонова Н.М. – концепция и дизайн исследования, обработка материала, электронная микроскопия, написание текста статьи; Чепур С.В. – концепция и дизайн исследования, статистическая обработка результатов, написание текста статьи; Первак М.О. – обработка материала, редактирование статьи; Мясников В.А. – концепция и дизайн исследования, редактирование; Тюнин М.А. – концепция и дизайн исследования, редактирование; Ильинский Н.С. – сбор и обработка материала, редактирование статьи; Каневский Б.А. – вирусологическая работа, редактирование статьи, Смирнова А.В. – вирусологическая работа, обработка материала, редактирование статьи.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю благодарность А.С. Никишину и П.С. Бaeвой за участие в создании биологических моделей.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES, 23 July 2010). Программа и протокол исследования одобрен Комитетом по этике биомедицинских исследований ФГБУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, 195043, г. Санкт-Петербург, Россия (протокол № 21 от 23.11.2020 г.).

Поступила 08.07.2022

Принята в печать 04.10.2022

Опубликована 31.10.2022

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-130>

An electron microscopic study of neocortex of Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus)

Natalya M. Paramonova^{1,2}, Sergey V. Chepur¹, Maria O. Pervak¹, Vadim A. Myasnikov¹, Mikhail A. Tyunin¹, Boris A. Kanevskiy¹, Nikita S Ilinskii¹, Anna V. Smirnova¹

¹State Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of the Russian Federation, 195043, Saint Petersburg, Russia;

²Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, 194223, Saint Petersburg, Russia

Introduction. Convalescent COVID-19 patients have various signs of central nervous system damage, including those directly associated with SARS-CoV-2. Hence, studies of SARS-CoV-2 related morphological changes in neocortex are particularly relevant for understanding the mechanisms of their formation and development of approaches to preclinical evaluation of the effectiveness of antiviral drugs.

The **purpose** of the research is a longitudinal study of the ultrastructural alterations in Syrian hamsters' neocortex after experimental SARS-CoV-2 infection.

Materials and methods. Male Syrian hamsters weighing 80–100 g, aged 4 to 6 weeks, were infected with 26 µl SARS-CoV-2 intranasally with 4×10^4 TCD₅₀/ml of viral particles. The animals were euthanized on days 3, 7 or 28 post-infection, the brain was extracted with the cortex excision. The material analysis was performed using transmission electron microscopy.

Results and discussion. On day 3 post-infection, the number of moderately hyperchromic neurons in neocortex increased, while by the day 7 the number of apoptotic cells significantly increased. Simultaneously, an increased signs of neuronophagy and representation of atypical glia were observed. Increased number of altered oligodendrocytes was observed on day 28 post-infection. Viral invasion was accompanied by changes in neocortical cells since day 3 post-infection, such as transformation of their nucleus, the rough endoplasmic reticulum and the Golgi vesicles as well as microvascular spasm with perivascular edema.

Conclusion. As a result of electron microscopic study, the ultrastructural alterations in neocortex were described in an experimental model of SARS-CoV-2 infection. The findings can be used to identify the mechanisms of infection pathogenesis and to search for the new directions in development of medicines.

Keywords: SARS-CoV-2; neocortex; neurons; glial cells; blood-brain barrier

For citation: Paramonova N.M., Chepur S.V., Pervak M.O., Myasnikov V.A., Tyunin M.A., Kanevskij B.A., Ilinskii N.S., Smirnova A.V. An electron microscopic study of neocortex of Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(5): 395-402 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-130>

For correspondence: Anna V. Smirnova, Researcher of State Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of the Russian Federation, 195043, Saint Petersburg, Russia. E-mail: gniivm_2@mil.ru.

Information about the authors:

Paramonova N.M., <https://orcid.org/0000-0001-5451-3555>

Chepur S.V., <https://orcid.org/0000-0002-5324-512X>

Pervak M.O., <https://orcid.org/0000-0002-1395-823X>

Myasnikov V.A., <https://orcid.org/0000-0001-7232-4678>

Tyunin M.A., <https://orcid.org/0000-0002-6974-5583>

Kanevskiy B.A., <https://orcid.org/0000-0002-6255-8232>

Ilinskii N.S., <https://orcid.org/0000-0001-7406-753X>
Smirnova A.V., <https://orcid.org/0000-0003-0483-5032>

Contribution: Paramonova N.M. – study concept and design, material working, electron microscopy, paper copywriting; Chepur S.V. – study concept and design, statistical processing of information, paper copywriting; Pervak M.O. – material working, editing; Myasnikov V.A. – study concept and design, editing; Tyunin M.A. – study concept and design, editing; Kanevskiy B.A. – virologic work, editing; Ilinskii N.S. – material collection and working, editing; Smirnova A.V. – virologic work, material working, editing.

Acknowledgment. The authors gratefully acknowledge the contribution of A.S. Nikishin and P.S. Baeva to creation of biological models.

Funding. The research was funded by the state budget.

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

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with the Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee on Biomedical Research of the State Research Testing Institute of Military Medicine of the Ministry of Defense of the Russian Federation (protocol No. 21 dated 23.11.2020).

Received 08 July 2022

Accepted 04 October 2022

Published 31 October 2022

Введение

SARS-CoV-2 как возбудитель COVID-19 стал объектом пристального изучения в силу высокой социальной значимости пандемической ситуации [1, 2]. Биология вируса, генетическая изменчивость и многообразие вариантов его белков были детально описаны в отечественной [3–5] и зарубежной [6, 7] научной литературе.

Ранее считали, что влияние вируса SARS-CoV-2 на организм человека ограничено респираторной системой. В связи с возникновением у пациентов аносмии и агевзии научным сообществом было выдвинуто предположение о воздействии вируса на центральную нервную систему (ЦНС) [8], которое позже подтвердилось при анализе симптомов неврологических и психических расстройств [9–11] у пациентов в остром и отдалённом периодах течения COVID-19.

Основными способами защиты от вируса к настоящему времени признаны вакцинопрофилактика и иммунотерапия [12–15], тогда как данные о противовирусной активности средств химиотерапии более скромны [16], а критерии оценки их эффективности в рамках доклинических исследований до настоящего времени не уточнены.

Необходимость проведения электронно-микроскопического исследования (ЭМИ) неокортекса на экспериментальной модели инфекции SARS-CoV-2 определена различной эффективностью антиметаболитов синтеза вирусной рибонуклеиновой кислоты (РНК) и ингибиторов РНК-полимеразы, активность которых в отношении РНК-содержащих вирусов в культуре доказана [17]. Высказано предположение, что различная эффективность препаратов может быть сопряжена в первую очередь с их способностью воздействовать на вирусные частицы за гистогематическими барьерами. Направленная модификация молекул препаратов с учётом гистотопографических особенностей репликации вируса может повысить их эффективность и расширить безопасное применение.

В связи со значимыми поражениями ЦНС при COVID-19 [2] **цель исследования** – изучение ультраструктурных изменений нейронов и глиальных

клеток – представляет фундаментальный и практический интерес для выявления особенностей патогенеза повреждений и разработки подходов к оценке эффективности противовирусных лекарственных средств на доклиническом этапе.

Материал и методы

Экспериментальное исследование проводили на 24 самцах сирийских хомяков [18] в возрасте 4–6 недель массой тела 80–100 г, полученных из питомника ЗАО «НПО «Дом фармации» (Санкт-Петербург). Животных содержали в стандартных условиях вивария.

Культуру вируса SARS-CoV-2 выделяли из ПЦР-положительного (полимеразная цепная реакция) материала, полученного от больных COVID-19, и накапливали на культуре клеток почки африканской зелёной мартышки (*Chlorocebus sabaues*) Vero (B) («БиолоТ», Россия), согласно ранее описанным в литературе методикам [19, 20]. На этой же клеточной линии определяли тканевую цитопатическую дозу вируса (ТЦД₅₀/мл) по методу Рида и Менча [21].

Были сформированы контрольная и опытные группы животных. Массу животных регистрировали до заражения и ежедневно в течение последующих 28 суток. Перед заражением животных наркотизировали раствором «Золетил 100» в дозе 40 мг/кг внутривенно. Далее механическим дозатором интраназально каждому хомяку опытной группы вводили по 26 мкл культуры вируса, содержащей SARS-CoV-2 в количестве 4×10^4 ТЦД₅₀/мл [22]. Эвтаназию животных проводили на 3-и, 7-е или 28-е сутки после заражения передозировкой общего анестетика (растворы «Ксила» 20 мг/мл и «Золетил 100» 50 мг/мл, соотношение 1 : 1) в объёме 1 мл на 1 кг массы тела внутримышечно.

Для ЭМИ извлечённый мозг рассекали на фронтальные срезы толщиной в 1–1,5 мм и префиксировали в охлаждённой до 4 °С смеси 4% параформальдегида и 0,5% глутарового альдегида (на 0,1 М какодилатном буфере (pH 7,2–7,4)). Выделенные кусочки неокортекса сенсомоторного отдела коры через 1,5–2 ч до-

фиксируют в растворе 1% четырёхоксида осмия (все реактивы – Sigma-Aldrich, Германия). Обезжировали материал в растворах этилового спирта восходящей концентрации и абсолютного ацетона. В процессе дегидратации контрастировали ткань в кусочках 3,5% уранилацетатом на 70° этаноле. Пропитку и заливку смесью аралдитов (Fluka, Швейцария) с ориентацией кусочков выполняли под лупой. Полимеризацию проводили в термостате при 37 и 60 °С в течение трёх суток [23].

Ультратонкие срезы 50–60 нм готовили на ультратоме LKB-III (LKB, Швеция). Регистрацию изменений структуры тканей и их фотофиксацию осуществляли на электронном микроскопе FEI Tecnai G2 Spirit BioTWIN (FEI Company, Нидерланды) при ускоряющем напряжении 80 кВ, предоставленном Центром коллективного пользования Института эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН. В каждом образце проводили морфометрический анализ клеток и сосудов, а также их подсчёт.

Результаты описательной статистики приведены в виде медианы (Me) и межквартильного размаха ($[Q_1; Q_3]$). Для множественных сравнений показателей несвязанных групп применяли Н-критерий Краскела–Уоллиса при номинальном уровне статистической значимости различий $p < 0,05$. Сравнение проводили с аналогичными характеристиками животных группы виварного контроля.

Животных содержали в надлежащих условиях вивария (разрешение Главного государственного ветеринарного инспектора Санкт-Петербурга № 78-1102/19, сертификат ISO 9001:2015 № ST.RU.0001.M0017187, сертификат соответствия стандарту GLP № GLP-0727-1020). Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines For Animal Use (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Комитетом по этике биомедицинских исследований организации (протокол № 21 от 23.11.2020).

Результаты и обсуждение

Изменения клеток неокортекса

При инфицировании животных SARS-CoV-2 отчётливо прослеживали появление вирусных частиц в нейронах сенсомоторного неокортекса с признаками повышения синтеза белка. Выявляли нейроны с глубоко узурированными контурами ядер, в некоторых из них наблюдали активные крупные ядрышки (рис. 1). В цитоплазме отмечали массу рибосом, как собранных в полисомы, так и адгезированных на мембранах органелл.

Шероховатый эндоплазматический ретикулум (ЭР) был гипертрофирован и неравномерно расширен, на терминальных фрагментах канальцев прослеживали вирусные частицы, их отшнуровывание и миграцию к аппарату Гольджи (АГ). Уже к 3-м суткам эксперимента отмечали выраженные

изменения АГ: мембраны его цистерн набухали, слипались, сливаясь в единый конгломерат, часто с гомогенизированным содержимым внутри. По периферии АГ в цистернах локализовались вирусные частицы, ассоциированные с мембранами, и с элементами цитоскелета. По-видимому, слабоконтрастные вирионы за счёт белкового процессинга в АГ приобретают отчетливую белковую короновидную структуру поверхности, а затем отшнуровываются от терминальных участков цистерн органеллы. На 7-е сутки после заражения SARS-CoV-2 в нейронах сенсомоторного отдела коры количество повреждений АГ значительно возрастало.

Практически каждый нейрон всех слоёв неокортекса содержал множество вирусов различной степени зрелости и локализации. В нейронах вирусные частицы отмечали не только в перикарионах, но и в отростках нейроцитов, в том числе миелинизированных, а также в пресинаптических аксонных терминалях и шипиках дендритов.

Нарастающие в течение инфекционного процесса деструктивные изменения приводили, по-видимому, к формированию мультивезикулярных телец (МВТ). На ранних сроках в нейронах МВТ встречались относительно редко, их количество возрастало со временем. По аналогии с прослеженными ранее изменениями клеток культуры Vero (В) МВТ, как и везикулы промежуточного компартмента (ПК), играющего важную роль в сопряжении ЭР и АГ, можно считать транспортной формой [24], обеспечивающей выход вируса из заражённых нейронов на поздних сроках инфекционного процесса. Таким образом, в отличие от эпителиальных клеток культуры, в цитозоле нейроцитов удалось проследить свободную миграцию вирусов, массовый выход которых возможен при достижении критических параметров и гибели клетки.

Для системной оценки изменений нейронов и глии проводили морфометрический анализ клеточных популяций (табл. 1). Установлено, что через трое суток после заражения в неокортексе возрастает количество умеренно гиперхромных нейронов, тогда как к 7-м суткам значимо увеличивается количество апоптотически изменённых клеток (рис. 1 б), по-видимому, как результат глубокой вирус-ассоциированной перестройки метаболизма, сохранявшейся до окончания периода наблюдения. В эти же сроки прослеживали нарастание представительства атипичной глии и признаков нейрофагии.

Репродукция вируса

Ультраструктурный анализ неокортекса заражённых SARS-CoV-2 животных выявил формирование вирусных «фабрик». Их наличие отмечали преимущественно в нейронах, глиоцитах и эпендимоцитах (рис. 2). Причем в последних формирование вирусных частиц прослеживали с участием шероховатого ЭР, тогда как в нейронах и глиоцитах вирусные «фабрики» сформированы на основе АГ, что подтверждают и другие авторы [25]. Вирусные «фабрики» всегда ассоциированы с митохондриями (Мх), обеспечива-

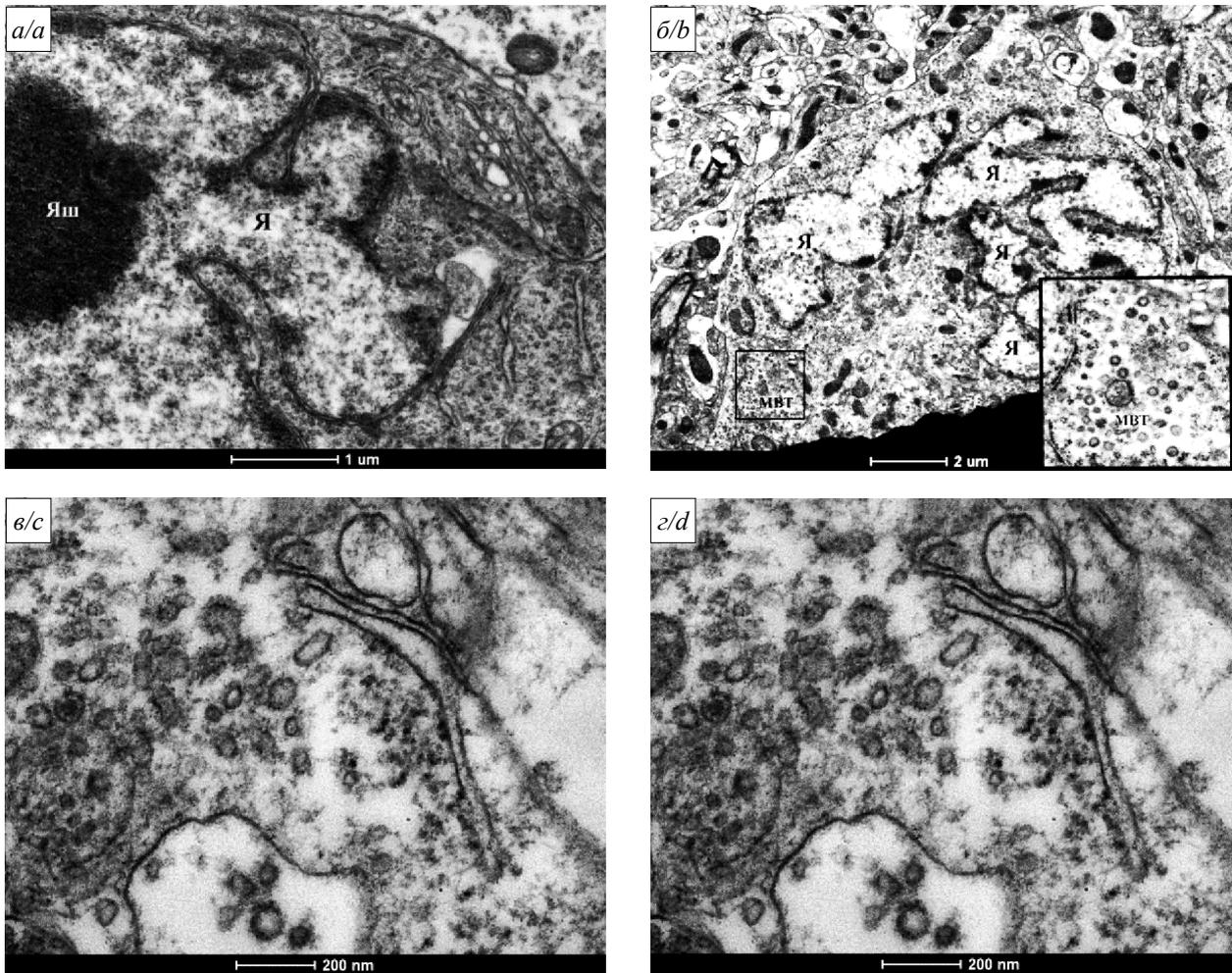


Рис. 1. Ультраструктурные изменения неокортекса сирийских хомяков после заражения SARS-CoV-2 4×10^4 ТЦД₅₀/мл (26 мкл/особь интраназально): *a* – умеренно гиперхромный нейрон с деформированным контуром ядра (+), крупным ядрышком (Яш) и скоплением РНК-позитивного материала в цитоплазме; *b* – апоптоз нейрона на стадии фрагментации ядра, на *вклейке* – большое скопление вирусов; *c* – вирусные частицы в терминальных участках неравномерно расширенных канальцев эндоплазматического ретикулума; *d* – фрагмент дендрита с мультивезикулярными тельцами (МВТ), содержащий вирионы. Электронограммы. Увеличения: *a* – 16 500; *b* – 6000; *вклейка* – 17 000; *c*, *d* – 60 000.

Fig. 1. Changes in neocortical cells of Syrian hamsters after SARS-CoV-2 infection at a dose of 4×10^4 TCID₅₀/ml (26 μ l/individual, intranasally): *a* – moderately hyperchromic neuron with a deformed nucleus contour, a large nucleolus and accumulation of RNA-positive material in the cytoplasm; *b* – apoptosis of a neuron at the stage of nuclear fragmentation, on the insert – a large accumulation of viruses; *c* – in the terminal sections of unevenly dilated tubules of the ER there are viral particles; *d* – A fragment of a dendrite with an MBT containing virions. Electronograms. Magnifications: *a* – 16,500x; *b* – 6000x; insert – 17,000x; *c*, *d* – 60,000x.

ющими процесс репродукции вируса энергетически, а также, возможно, триггерными сигналами.

Следует отметить, что персистенция вируса в паренхиме мозга на первых этапах инфекционного процесса не приводит к существенным дистрофическим изменениям нейронов и глиоцитов, а напротив, поддерживает уровень их усиленной пластической и необходимой энергетической активности. Вирусные «фабрики» в нейронах неокортекса прослеживали до 28 суток, когда в ткани лёгких ПЦР-методами вирус уже не определялся [26, 27].

Аутоиммунная агрессия и демиелинизация

Помимо повреждения нейритов и глиоцитов, прослеживали изменения миелиновых волокон. Осьевые

цилиндры нередко соответствовали вариантам валлеровского перерождения с тёмной дегенерацией и распадом аксонов погибших нейронов. С большей частотой демиелинизация прослежена без дегенерации нейритов как самостоятельный патологический процесс, опосредованный повреждением олигодендроцитов (**рис. 3**). Прослеживали расширение узлов перехватов Ранвье и отслоение формирующих междоузлия миелиновых ламелл. Деструкция миелиновых оболочек проявлялась в расслоении и разволокнении ламелл, зернистом и везикулярном распаде миелина. Частота наблюдений дегенерации миелинового аппарата возрастала со временем наблюдения, что коррелировало с увеличением количества гиперхромных вакуолизированных олигодендроцитов к 28-м суткам

Таблица 1. Состав популяций нейронов и глии в неокортексе сирийских хомячков после заражения SARS-CoV-2 4×10⁴ ТЦД₅₀/мл (26 мкл/особь интраназально), Me [Q₁; Q₃], %

Table 1. The neuronal and glial cell composition of the Syrian hamsters neocortex after SARS-CoV-2 infection with 4×10⁴ TCID₅₀/ml (26 μl/individual, intranasally), Me [Q₁; Q₃], %

Популяция клеток Cell population	Характеристика Characteristic	Продолжительность наблюдения (группа) Observation period (group)			
		Контроль Control (n = 9)	3 суток 3 days (n = 5)	7 суток 7 days (n = 5)	28 суток 28 days (n = 5)
Нейроны Neurons	Нормохромные Normochromic	75,5 [70,1; 85,0]	71,3 [57,1; 73,3]	79,0 [78,0; 86,5]	67,8 [63,5; 78,1]
	Умеренно гиперхромные Moderately hyperchromic	13,8 [7,9; 15,7]	17,2* [16,6; 19,1]	12,3 [7,3; 14,9]	12,4 [11,3; 14,2]
	Гиперхромные Hyperchromic	7,6 [4,4; 13,7]	10,1 [8,0; 25,4]	6,8 [6,0; 7,9]	14,1 [12,3; 22,7]
	Апоптотические Apoptotic	0,4 [0,3; 0,8]	0 [0; 7,1]	5,6* [3,1; 5,9]	6,4* [2,7; 7,1]
	Парные Twin	17,4 [15,7; 18,3]	19,1 [14,7; 19,3]	20,9 [16,1; 21,4]	17,0 [10,6; 20,0]
	Прилежащие к базальной мембране Adjacent to basement membrane	1,7 [0,8; 2,1]	3,3* [2,3; 5,5]	2,4 [1,7; 2,6]	1,4 [1,2; 3,1]
	Олигодендроциты Oligodendrocytes	Нормохромные Normochromic	80,9 [74,0; 89,0]	84,2 [82,8; 87,9]	81,3 [35,5; 84,2]
Гиперхромные Hyperchromic		7,7 [1,3; 11,5]	10,3 [9,1; 10,5]	7,9 [0; 21,0]	17,5* [15,0; 18,8]
Апоптотические Apoptotic		10,0 [7,2; 12,3]	5,3 [3,0; 6,9]	18,8 [7,9; 33,3]	12,5 [9,3; 20,0]
Астроциты Astrocytes	Нормохромные Normochromic	95,1 [89,2; 100]	95,6 [94,4; 98,2]	94,7 [94,1; 95,1]	100,0 [97,6; 100]
	Гиперхромные Hyperchromic		Не прослежены Not traced		
	Апоптотические Apoptotic	4,9 [0; 9,8]	2,8 [1,8; 4,4]	5,3 [4,9; 5,9]	0 [0; 2,4]
Атипичные глиоциты Atypical gliocytes	3,6 [1,4; 7,1]	11,3* [7,1; 11,6]	8,6* [7,5; 11,0]	4,7 [1,4; 5,0]	

Примечание. *Различия статистически значимы по сравнению с группой контроля (H-критерий Краскела–Уоллиса, $p < 0,05$).

Note. *The differences are statistically significant compared to control group (Kruskal–Wallis H test, $p < 0.05$).

после заражения, по-видимому, связанным с аутоиммунным повреждением этих клеток. Элиминация заражённых олигодендроцитов к окончанию периода наблюдения, вероятно, также опосредована аутоиммунным конфликтом.

Изменения гематоэнцефалического барьера

Нейроны и глиоциты представляют вариант барьерных популяций клеток, поражение которых подтверждает способность вируса поражать укрытые от прямого иммунного контроля структуры. Для косвенной характеристики функциональной активности формирующих гематоэнцефалический барьер микрососудов неокортекса оценивали профиль базальной мембраны (БМ), степень нарушения её регулярной коллагеновой структуры и состояние периваскулярных отростков астроцитов (табл. 2). Установлено, что вирусная инвазия сопровождается спазмом микрососудов с извилистым профилем БМ и участками периваскулярных отёков уже на 3-и – 7-е сутки после заражения.

По-видимому, эти изменения, наряду с выявленным в некоторых случаях тромбозом (рис. 4), способствуют гипоксии тканей, что подтверждает значимое увеличение к этому времени количества гиперхромных и умеренно гиперхромных нейронов, взаимодействующих с БМ сосудов без глиальных посредников. Компенсаторные изменения сопряжены с активацией «спящих» резервных сосудов, количество которых сокращается начиная с 7-х суток и до окончания наблюдения.

Прослеженные электронно-микроскопические изменения структур неокортекса не позволяют относиться к COVID-19 исключительно как к респираторной инфекции. Подобно вирусу геморрагической лихорадки Эбола, пролиферация которого также происходит в головном мозге [28], применительно к SARS-CoV-2 прослежено значение этой системы в вирусной репродукции и накоплении, что ввиду особенностей проницаемости гематоэнцефалического барьера определяет сложности проведения противовирусной химиотерапии.

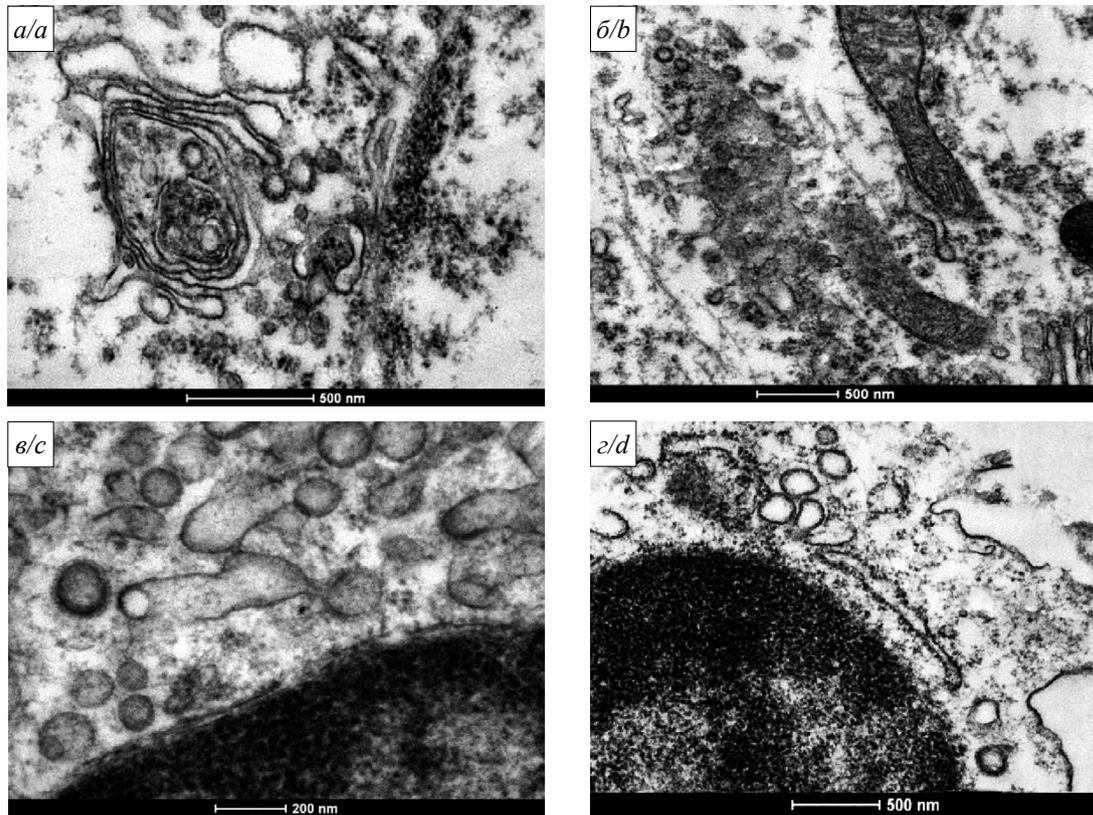


Рис. 2. Варианты вирусных «фабрик» в неокортексе сирийских хомяков после заражения SARS-CoV-2 4×10^4 ТЦД₅₀/мл (26 мкл/особь интраназально): *a* – вирусные «фабрики», сформированные в нейронах комплексом Гольджи; *b* – в дендритах нейронов «фабрики» сформированы аппаратом Гольджи и шероховатым эндоплазматическим ретикуломом уже на 3-и сутки инфицирования; в эпендимоцитах (*в*) и эндотелии пиальных сосудов (*д*) вирусный процессинг в основном задействует структуры эндоплазматического ретикулума. Электронограммы. Увеличения: *a* – 43 000; *b* – 26 500; *в* – 60 000; *д* – 26 500.

Fig. 2. Viral factory variants in the Syrian hamsters neocortex after SARS-CoV-2 infection with 4×10^4 TCID₅₀/ml (26 μ l/individual, intranasally): *a* – viral factories formed by the Golgi complex in neurons; *b* – in neuronal dendrites factory formed by the Golgi complex and the endoplasmic reticulum structures on the day 3 post-infection; in ependymocytes (*c*) and endothelium of pial blood vessels (*d*) viral processing mainly involves the endoplasmic reticulum structures. Electronograms. Magnifications: *a* – 43,000; *b* – 26,500; *c* – 60,000; *d* – 26,500.

Таблица 2. Изменения микрососудов неокортекса сирийских хомяков после заражения SARS-CoV-2 4×10^4 ТЦД₅₀/мл (26 мкл/особь интраназально), Me [Q₁; Q₃], %

Table 2. Microvascular changes in the Syrian hamsters neocortex after SARS-CoV-2 infection with 4×10^4 TCID₅₀/ml (26 μ l/individual, intranasally), Me [Q₁; Q₃], %

Состояние сосуда Condition of the vessel	Периваскулярное пространство Perivascular space	Продолжительность наблюдения (группа)/ Observation period (group)			
		Контроль/Control (n = 9)	3 суток/3 days (n = 5)	7 суток/7 days (n = 5)	28 суток/28 days (n = 5)
Норма Normal	Без отёка /Without edema	40,6 [35,2; 46,1]	31,2 [27,4; 32,8]	15,0* [14,8; 16,8]	18,9* [17,8; 20,5]
	С отёком/With edema	19,6 [16,4; 23,8]	19,4 [15,8; 19,8]	26,7* [26,3; 28,8]	27,3* [26,3; 32,2]
Констрикция Constriction	Без отёка/Without edema	7,5 [6,5; 8,5]	12,9* [10,8; 14,5]	7,5 [6,6; 8,9]	6,8 [4,0; 9,0]
	С отёком/With edema	21,6 [15,8; 25,5]	26,7 [23,2; 29,0]	39,6* [38,8; 42,6]	34,7 [33,1; 40,2]
Дилатация Dilatation	Без отёка/Without edema	Не прослежены/Not traced			
	С отёком/With edema	В единичном количестве на 7-е сутки после заражения/ In a single amount at day 7 post-infection			
«Спящие» Dormant	Без отёка/Without edema	5,1 [3,2; 6,7]	4,8 [4,3; 6,9]	4,0* [3,4; 5,0]	1,5* [1,5; 1,9]
	С отёком/With edema	2,8 [2,2; 4,4]	4,8 [3,1; 5,4]	3,0 [1,6; 6,3]	6,8* [5,0; 11,0]
Итого сосудов с отёком БМ Total vessels with edema of basal membrane		43,9 [37,5; 52,0]	53,8 [49,6; 56,0]	72,5* [70,3; 77,0]	69,7* [67,8; 77,2]

Примечание. *Различия статистически значимы по сравнению с группой контроля (H-критерий Краскела–Уоллиса, $p < 0,05$).

Note. *The differences are statistically significant compared to control group (Kruskal–Wallis H test, $p < 0.05$).

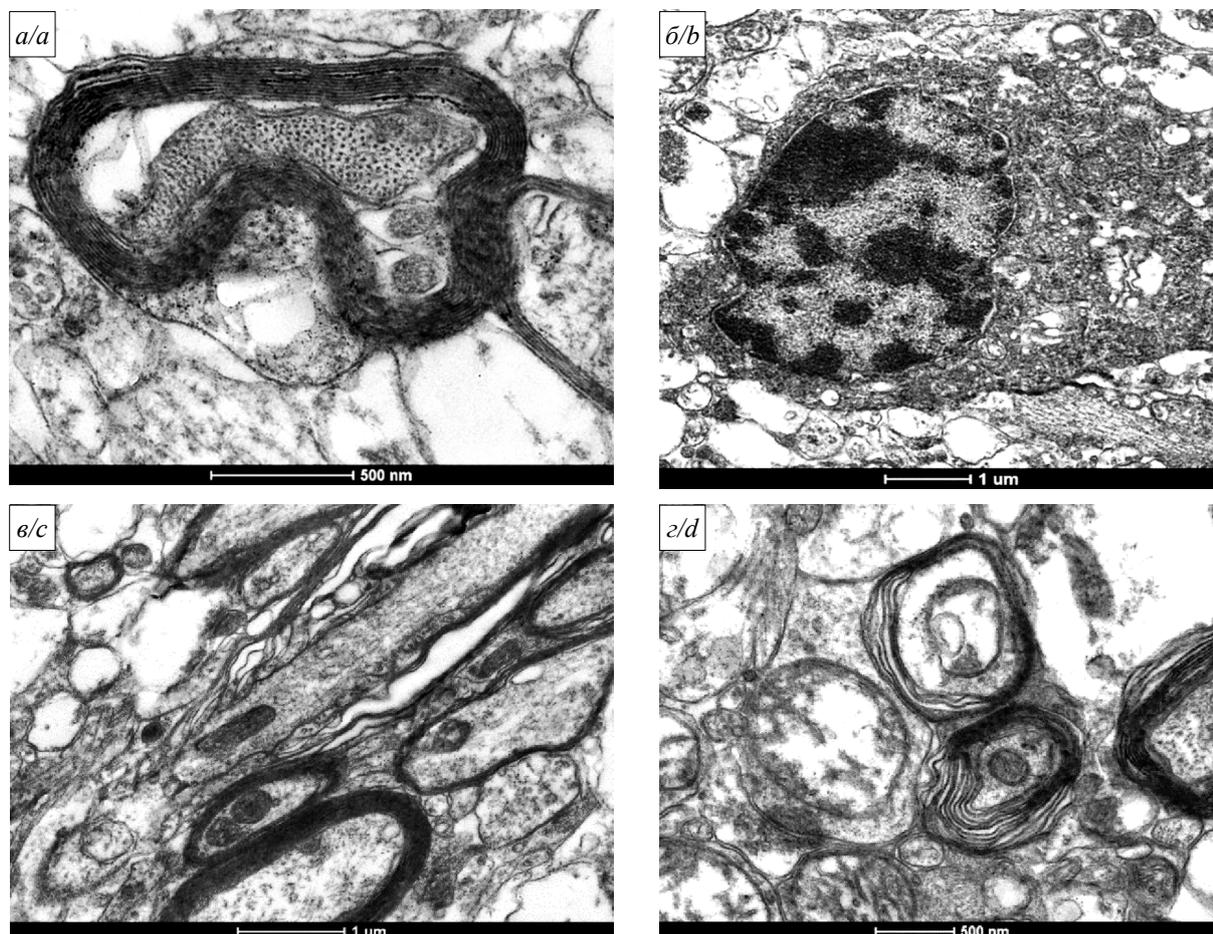


Рис. 3. Повреждение олигодендроцитов и миелинового аппарата в неокортексе сирийских хомяков на 7-е сутки после заражения SARS-CoV-2 4×10^4 ТЦД₅₀/мл (26 мкл/особь интраназально): *a* – проявления валлеровского перерождения с тёмной дегенерацией нейрита; *b* – апоптоз олигодендроцита на стадии фрагментации ДНК; *в* – дезорганизация миелинового аппарата в зоне перехвата Ранвье; *г* – расслоение ламелл миелиновой оболочки. Электронограммы. Увеличения: *a* – 43 000; *b* – 11 500; *в* – 16 500; *г* – 26 500.

Fig. 3. Damage to oligodendrocytes and myelin apparatus in the Syrian hamsters neocortex on the day 7 post-infection with SARS-CoV-2 in 4×10^4 TCID₅₀/ml dosage (26 μ l/individual, intranasally): *a* – Wallerian degeneration manifestations with dark neurite degeneration; *b* – oligodendrocyte apoptosis at the stage of DNA fragmentation; *c* – desorganisation of myelin in the zone of interception of Ranvier; *d* – stratification of the lamellae of the myelin sheath. Electronograms. Magnifications: *a* – 43,000; *b* – 11,500; *c* – 16,500; *d* – 26,500.

Заключение

Проведённое ЭМИ предоставило важную информацию для формирования подходов к терапии новой коронавирусной инфекции. Забарьерное персистирование вируса объяснило формирование когнитивных нарушений и расстройств внимания у реконвалесцентов COVID-19. Формирующиеся демиелинизирующие процессы, сопряжённые, по-видимому, с иммунным контролем и элиминацией контаминированных вирусом глиальных клеток, определяют болевые проявления и мигрирующие нарушения двигательной активности. Принципиально важно, что большинство применяемых антиметаболитов синтеза РНК и блокаторов вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы представляют достаточно гидрофильные соединения, а их способность воздействовать на вирусную продукцию

в нервной ткани весьма ограничена. Это обстоятельство определяет необходимость проведения дальнейшего дизайна молекул лекарств, создания универсальных и безопасных в применении противовирусных средств. Вместе с тем прослеженная роль АГ определяет возможность влияния на гликозилирование как вирусных белков, так и их мишеней на поверхности клеток, что, вероятно, и достигалось посредством применения гидроксихлорохина и его производных [1, 29], показавших свою эффективность в попытках ранней краткосрочной терапии COVID-19 [30].

Таким образом, результаты проведённого морфологического анализа компартиментализации метаболических процессов могут быть применены для выявления механизмов протекания инфекции SARS-CoV-2 и поиска направлений разработки новых лекарственных средств.

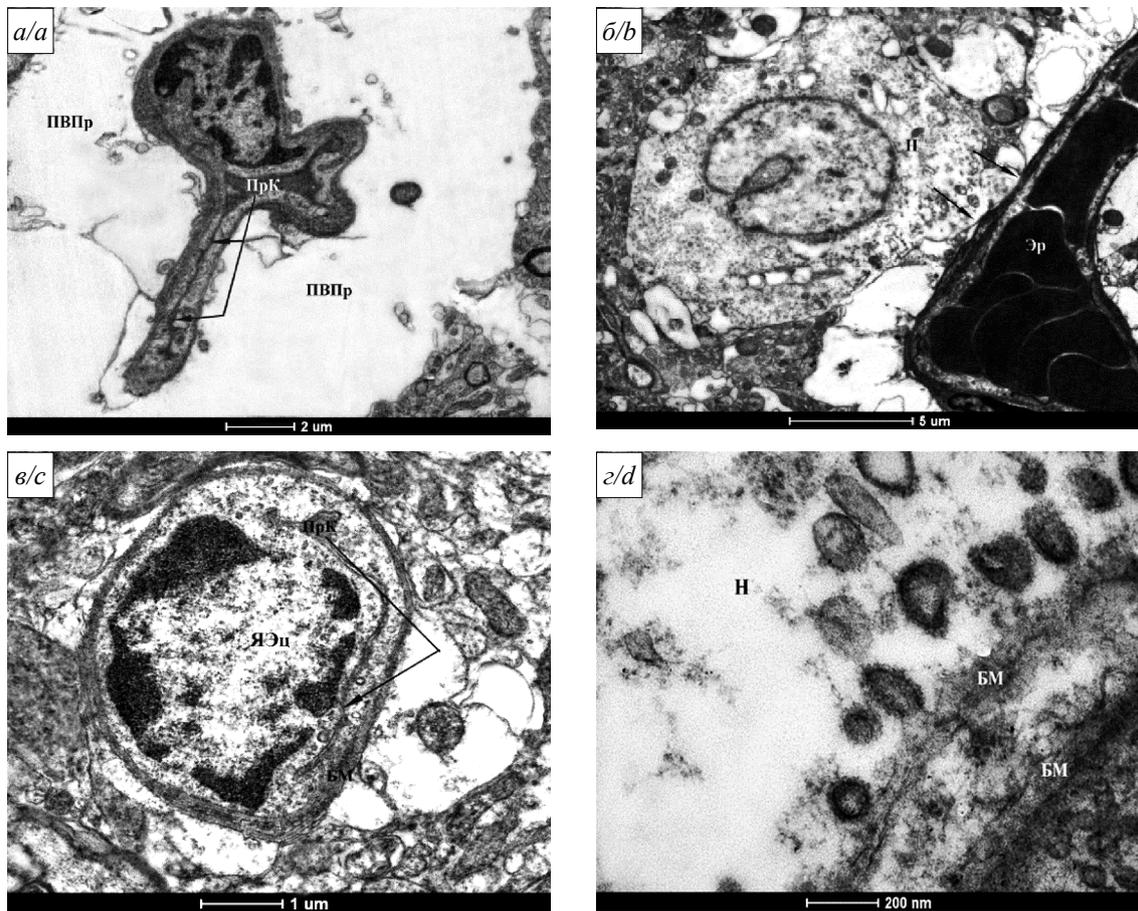


Рис. 4. Структурные изменения гематоэнцефалического барьера в неокортексе сирийских хомяков после заражения SARS-CoV-2 4×10^4 ТЦД₅₀/мл (26 мкл/особь интраназально): *a* – спазмированный капилляр с отёчным периваскулярным пространством (ПВПр); *b* – прямой контакт (стрелки) нейрона (Н) с микрососудом, заполненным эритроцитами (Эр); *в* – спящий резервный капилляр, просвет (ПрК) которого перекрыт ядром эндотелиоцита (ЯЭц); *з* – вирусные тельца проникают в нейрон (Н), преодолевая базальную мембрану (БМ) сосуда. Электронограммы. Увеличения: *a* – 6000; *b* – 4200; *в* – 11 500; *з* – 60 000.

Fig. 4. Structural changes in the blood-brain barrier in the neocortex of Syrian hamsters after infection with SARS-CoV-2 4×10^4 TCID₅₀/ml (26 μ l/individual intranasally): *a* – spasmotic capillary with edematous perivascular space (PVPR); *b* – direct contact (arrows) of a neuron (N) filled with erythrocyte (ER) microvessel; *c* – dormant reserve capillary, the lumen (PRC) of which is blocked by the endotheliocyte nucleus (NEC); *d* – viral bodies penetrate into the neuron (N), overcoming the basement membrane (BM) of the vessel. Electronograms. Magnifications: *a* – 6000; *b* – 4200; *c* – 11,500; *d* – 60,000.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чепур С.В., Плужников Н.Н., Чубарь О.В., Бакулина Л.С., Литвиненко И.В., Макаров В.А. и др. Респираторные РНК-вирусы: как подготовиться к встрече с новыми пандемическими штаммами. *Успехи современной биологии*. 2020; 140(4): 359–77. <https://doi.org/10.31857/S0042132420040043>
2. Machhi J., Herskovitz J., Senan A.M., Dutta D., Nath B., Oleynikov M.D., et al. The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2020; 15(3): 359–86. <https://doi.org/10.1007/s11481-020-09944-5>
3. Харченко Е.П. Коронавирус SARS-CoV-2: особенности структурных белков, контагиозность и возможные иммунные коллизии. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2020; 19(2): 13–30. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-2-13-30>
4. Бруякин С.Д., Макаревич Д.А. Структурные белки коронавируса SARS-CoV-2: роль, иммуногенность, суперантигенные свойства и возможности использования для терапевтических целей. *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. 2021; (2): 18–27. [https://doi.org/10.19163/1994-9480-2021-2\(78\)-18-27](https://doi.org/10.19163/1994-9480-2021-2(78)-18-27)
5. Пашенков М.В., Хаитов М.Р. Иммунный ответ против эпидемических коронавирусов. *Иммунология*. 2020; 41(1): 5–18. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-1-5-18>
6. Pan Y., Li X., Yang G., Fan J., Tang Y., Zhao J., et al. Serological immunochromatographic approach in diagnosis with SARS-CoV-2 infected COVID-19 patients. *J. Infect.* 2020; 81(1): e28–32. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.051>
7. Rodriguez Y., Novelli L., Rojas M., De Santis M., Acosta-Ampudia Y., Monsalve DM., et al. Autoinflammatory and autoimmune conditions at the crossroad of COVID-19. *J. Autoimmun.* 2020; 114: 102506. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102506>
8. Nalbandian A., Sehgal K., Gupta A., Madhavan M.V., McGroder C., Stevens J.S., et al. (2021). Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat. Med.* 2021; 27(4): 601–15. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01283-z>
9. Mao L., Jin H., Wang M., Hu Y., Chen S., He Q., et al. Neurologic manifestations of hospitalized patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol.* 2020; 77(6): 683–690. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1127>
10. Pinna P., Grewal P., Hall J.P., Tavarez T., Dafer R.M., Garg R., et al. Neurological manifestations and COVID-19: Experiences from a tertiary care center at the Frontline. *Journal of the neurological sciences*. *J. Neurol. Sci.* 2020; 415: 116969. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.116969>
11. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wu-

- han, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020; 395(10229): 1054–62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
12. Xiao A.T., Gao C., Zhang S. Profile of specific antibodies to SARS-CoV-2: The first report. *J. Infect.* 2020; 81(1): 147–78. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.012>
 13. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Dzharrullaeva A.S., et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*. 2021; 397(10275): 671–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8)
 14. Jones I., Roy P. Sputnik V COVID-19 vaccine candidate appears safe and effective. *Lancet*. 2021; 397(10275): 642–3. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00191-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00191-4)
 15. Dassarma B., Tripathy S., Matsabisa M. Emergence of ancient convalescent plasma (CP) therapy: to manage COVID-19 pandemic. *Transfus. Clin. Biol.* 2021; 28(1): 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.tacl.2020.11.004>
 16. Chakraborty C., Sharma A.R., Sharma G., Bhattacharya M., Lee S.S. SARS-CoV-2 causing pneumonia-associated respiratory disorder (COVID-19): diagnostic and proposed therapeutic options. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2020; 24(7): 4016–26. https://doi.org/10.26355/eurrev_202004_20871
 17. Wu X., Yu K., Wang Y., Xu W., Ma H., Hou Y., et al. Efficacy and safety of Triazavirin therapy for coronavirus disease 2019: a pilot randomized controlled trial. *Engineering (Beijing)*. 2020; 6(10): 1185–91. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.08.011>
 18. Chan J.F.W., Zhang A.J., Yuan S., Poon V.K.M., Chan C.C.S., Lee A.C.Y., et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in a golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(9): 2428–46. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa325>
 19. Taştan C., Yurtsever B., Sir Karakuş G., Dilek Kancaçi D., Demir S., Abanuz S., et al. SARS-CoV-2 isolation and propagation from Turkish COVID-19 patients. *Turk. J. Biol.* 2020; 44(3): 192–202. <https://doi.org/10.3906/biy-2004-113>
 20. Yao P., Zhang Y., Sun Y., Gu Y., Xu F., Su B., et al. Isolation and growth characteristics of SARS-CoV-2 in vero cell. *Virol. Sin.* 2020; 35(3): 348–50. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00241-2>
 21. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hygiene*. 1938; 27: 493–7. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
 22. Макаренко И.Е., Авдеева О.И., Ванатиев Г.В., Рыбакова А.В., Ходько С.В., Макарова М.Н. и др. Возможные пути и объемы введения лекарственных средств лабораторным животным. *Международный вестник ветеринарии*. 2013; (3): 72–84.
 23. Гайер Г., ред. *Электронная гистохимия*. Пер. с нем. М.: Мир; 1974.
 24. Saraste J., Prydz K. Assembly and cellular exit of coronaviruses: hijacking an unconventional secretory pathway from the pre-Golgi intermediate compartment via the golgi ribbon to the extracellular space. *Cells*. 2021; 10(3): 503. <https://doi.org/10.3390/cells10030503>
 25. Hackstadt T., Chiramel A.I., Hoyt F.H., Williamson B.N., Dooley C.A., Beare P.A., et al. Disruption of the Golgi apparatus and contribution of the endoplasmic reticulum to the SARS-CoV-2 replication complex. *Viruses*. 2021; 13(9): 1798. <https://doi.org/10.3390/v13091798>
 26. Чепур С.В., Мясников В.А., Тюнин М.А., Ильинский Н.С., Нишкин А.С., Исаева А.А. и др. Модель новой коронавирусной инфекции у золотистых сирийских хомячков: основные патологические изменения. *Биомедицина*. 2021; 17(3): 90–4. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-3-90-94>
 27. Чепур С.В., Тюнин М.А., Мясников В.А., Алексеева И.И., Владимирова О.О., Ильинский Н.С. и др. Поражение органов и тканей SARS-CoV-2: биологическая модель на сирийских хомяках *Mesocricetus auratus* для экспериментальных (доклинических) исследований. *Клиническая и экспериментальная морфология*. 2021; 10(4): 25–34. <https://doi.org/10.31088/CEM2021.10.4.25-34>
 28. Billieux B.J., Smith V., Nath A. Neurological complications of Ebola virus infection. *Neurotherapeutics*. 2016; 13(3): 461–70. <https://doi.org/10.1007/s13131-016-0457-z>
 29. Чепур С.В., Плужников Н.Н., Сайганов С.А., Бакулина Л.С., Чубарь О.В., Юдин М.А. и др. Гипотеза матричного синтеза аперидических полисахаридов. *Успехи современной биологии*. 2019; 139(6): 583–93. <https://doi.org/10.1134/S0042132419060012>
 30. Sinha N., Balayla G. Hydroxychloroquine and COVID-19. *Postgrad. Med. J.* 2020; 96(1139): 550–5. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-137785>

REFERENCES

1. Chepur S.V., Pluzhnikov N.N., Chubar' O.V., Bakulina L.S., Litvinenko I.V., Makarov V.A., et al. Respiratory RNA viruses: how to prepare for meeting with new pandemic strains. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2020; 140(4): 359–77. <https://doi.org/10.31857/S0042132420040043> (in Russian)
2. Machhi J., Herskovitz J., Senan A.M., Dutta D., Nath B., Oleynikov M.D., et al. The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2020; 15(3): 359–86. <https://doi.org/10.1007/s11481-020-09944-5>
3. Kharchenko E.P. The coronavirus SARS-CoV-2: the characteristics of structural proteins, contagiousness, and possible immune collisions. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2020; 19(2): 13–30. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2020-19-2-13-30> (in Russian)
4. Bruyakin S.D., Makarevich D.A. Structural proteins of the SARS-CoV-2 coronavirus: role, immunogenicity, superantigenic properties and potential use for therapeutic purposes. *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2021; (2): 18–27. [https://doi.org/10.19163/1994-9480-2021-2\(78\)-18-27](https://doi.org/10.19163/1994-9480-2021-2(78)-18-27) (in Russian)
5. Pashchenkov M.V., Khaitov M.R. Immune response against epidemic coronaviruses. *Immunologiya*. 2020; 41(1): 5–18. <https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-1-5-18> (in Russian)
6. Pan Y., Li X., Yang G., Fan J., Tang Y., Zhao J., et al. Serological immunochromatographic approach in diagnosis with SARS-CoV-2 infected COVID-19 patients. *J. Infect.* 2020; 81(1): e28–32. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.051>
7. Rodriguez Y., Novelli L., Rojas M., De Santis M., Acosta-Ampudia Y., Monsalve DM., et al. Autoinflammatory and autoimmune conditions at the crossroad of COVID-19. *J. Autoimmun.* 2020; 114: 102506. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2020.102506>
8. Nalbandian A., Sehgal K., Gupta A., Madhavan M.V., McGroder C., Stevens J.S., et al. (2021). Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat. Med.* 2021; 27(4): 601–15. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01283-z>
9. Mao L., Jin H., Wang M., Hu Y., Chen S., He Q., et al. Neurologic manifestations of hospitalized patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurol.* 2020; 77(6): 683–690. <https://doi.org/10.1001/jamaneuro.2020.1127>
10. Pinna P., Grewal P., Hall J.P., Tavarez T., Dafer R.M., Garg R., et al. Neurological manifestations and COVID-19: Experiences from a tertiary care center at the Frontline. *Journal of the neurological sciences*. *J. Neurol. Sci.* 2020; 415: 116969. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2020.116969>
11. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020; 395(10229): 1054–62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
12. Xiao A.T., Gao C., Zhang S. Profile of specific antibodies to SARS-CoV-2: The first report. *J. Infect.* 2020; 81(1): 147–78. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.012>
13. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Dzharrullaeva A.S., et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*. 2021; 397(10275): 671–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8)
14. Jones I., Roy P. Sputnik V COVID-19 vaccine candidate appears safe and effective. *Lancet*. 2021; 397(10275): 642–3. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00191-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00191-4)
15. Dassarma B., Tripathy S., Matsabisa M. Emergence of ancient convalescent plasma (CP) therapy: to manage COVID-19 pandemic. *Transfus. Clin. Biol.* 2021; 28(1): 123–127. <https://doi.org/10.1016/j.tacl.2020.11.004>
16. Chakraborty C., Sharma A.R., Sharma G., Bhattacharya M., Lee S.S. SARS-CoV-2 causing pneumonia-associated respiratory disorder (COVID-19): diagnostic and proposed therapeutic options. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2020; 24(7): 4016–26. https://doi.org/10.26355/eurrev_202004_20871

17. Wu X., Yu K., Wang Y., Xu W., Ma H., Hou Y., et al. Efficacy and safety of Triazavirin therapy for coronavirus disease 2019: a pilot randomized controlled trial. *Engineering (Beijing)*. 2020; 6(10): 1185–91. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.08.011>
18. Chan J.F.W., Zhang A.J., Yuan S., Poon V.K.M., Chan C.C.S., Lee A.C.Y., et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in a golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(9): 2428–46. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa325>
19. Taştan C., Yurtsever B., Sir Karakuş G., Dilek Kançağı D., Demir S., Abanuz S., et al. SARS-CoV-2 isolation and propagation from Turkish COVID-19 patients. *Turk. J. Biol.* 2020; 44(3): 192–202. <https://doi.org/10.3906/biy-2004-113>
20. Yao P., Zhang Y., Sun Y., Gu Y., Xu F., Su B., et al. Isolation and growth characteristics of SARS-CoV-2 in vero cell. *Viol. Sin.* 2020; 35(3): 348–50. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00241-2>
21. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hygiene.* 1938; 27: 493–7. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
22. Makarenko I.E., Avdeeva O.I., Vanatiev G.V., Rybakova A.V., Khod'ko S.V., Makarova M.N., et al. Possible ways of administration and standard drugs in laboratory animals. *Mezhdunarodnyy vestnik veterinarii*. 2013; (3): 72–84. (in Russian)
23. Gayer G., ed. *Ultrahistochemie*. Stuttgart-New York: Fischer Verlag; 1973. (in German)
24. Saraste J., Prydz K. Assembly and cellular exit of coronaviruses: hijacking an unconventional secretory pathway from the pre-Golgi intermediate compartment via the golgi ribbon to the extracellular space. *Cells*. 2021; 10(3): 503. <https://doi.org/10.3390/cells10030503>
25. Hackstadt T., Chiramel A.I., Hoyt F.H., Williamson B.N., Dooley C.A., Beare P.A., et al. Disruption of the Golgi apparatus and contribution of the endoplasmic reticulum to the SARS-CoV-2 replication complex. *Viruses*. 2021; 13(9): 1798. <https://doi.org/10.3390/v13091798>
26. Chepur S.V., Myasnikov V.A., Tyunin M.A., Il'inskiy N.S., Nishin A.S., Isaeva A.A., et al. A model of a novel coronavirus infection in golden Syrian hamsters: major pathological changes. *Biomeditsina*. 2021; 17(3): 90–4. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-3-90-94> (in Russian)
27. Chepur S.V., Tyunin M.A., Myasnikov V.A., Alekseeva I.I., Vladimirova O.O., Il'inskiy N.S., et al. Organ and tissue damage related to SARS-CoV-2: the biological model for experimental (preclinical) trials on golden hamsters *Mesocricetus auratus*. *Klinicheskaya i eksperimental'naya morfologiya*. 2021; 10(4): 25–34. <https://doi.org/10.31088/CEM2021.10.4.25-34> (in Russian)
28. Billioux B.J., Smith B., Nath A. Neurological complications of Ebola virus infection. *Neurotherapeutics*. 2016; 13(3): 461–70. <https://doi.org/10.1007/s131311-016-0457-z>
29. Chepur S.V., Pluzhnikov N.N., Sayganov S.A., Bakulina L.S., Chubar' O.V., Yudin M.A., et al. The hypothesis of the aperiodic polysaccharides matrix synthesis. *Uspekhi sovremennoy biologii*. 2019; 139(6): 583–93. <https://doi.org/10.1134/S0042132419060012> (in Russian)
30. Sinha N., Balayla G. Hydroxychloroquine and COVID-19. *Postgrad. Med. J.* 2020; 96(1139): 550–5. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2020-137785>

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-131>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Анализ качества комбинированной отечественной вакцины для профилактики кори, краснухи и паротита

Бинятова А.С., Юнасова Т.Н., Ильясова Т.Н., Саркисян К.А.,
Фадейкина О.В., Мовсесянц А.А.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, г. Москва, Россия

Введение. Поддержание высокого уровня охвата населения вакцинацией против кори, краснухи и паротита в условиях увеличения риска вспышек заболеваемости вследствие нарушения тактики вакцинопрофилактики в связи с пандемией коронавирусной инфекции и неблагоприятной эпидемической обстановкой в сопредельных странах обуславливает целесообразность применения комбинированного препарата для одновременной профилактики трёх социально значимых инфекций.

Цель исследования. Анализ качества коммерческих серий новой отечественной комбинированной вакцины против кори, краснухи и паротита культуральной живой (ККП) за всё время её выпуска по всем показателям спецификации нормативной документации.

Материалы и методы. Объектом исследования была комбинированная вакцина ККП. Анализ качества препарата производился по 86 сводным протоколам производства выпущенных серий, а также по результатам контроля этих серий в Испытательном центре экспертизы качества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения Минздрава России».

Результаты. Показано, что качество комбинированного препарата для профилактики кори, краснухи и паротита соответствует нормативной документации по всем изученным показателям. Препарат не содержит антибиотик. Бычий сывороточный альбумин, являющийся технологической примесью, выявляется в количествах, более чем в 5 раз ниже установленной нормы. Сравнение специфической активности вирусных компонентов новой комбинированной вакцины и компонентов дивакцины против кори и паротита, произведённой предприятием в 2019–2021 гг., показало, что разброс значений активности вирусных компонентов в новом препарате и в сериях паротитно-коревой вакцины был минимален, что позволило сделать вывод о стабильности технологии производства.

Заключение. Качество новой отечественной комбинированной вакцины для профилактики кори, краснухи и паротита соответствует требованиям ВОЗ. Результаты проведённых исследований свидетельствуют о стабильности производства и стандартности качества препарата. Использование комбинированной вакцины против трёх актуальных инфекций обеспечит необходимый уровень охвата вакцинацией населения. Информация о результатах исследований может способствовать снижению количества отказов от вакцинации.

Ключевые слова: комбинированная вакцина для профилактики кори, краснухи и паротита; показатели качества; стабильность технологии; стандартность качества; коревая амнезия; вспышки паротита среди правильно привитых; отраслевой стандартный образец

Для цитирования: Бинятова А.С., Юнасова Т.Н., Ильясова Т.Н., Саркисян К.А., Фадейкина О.В., Мовсесянц А.А. Анализ качества комбинированной отечественной вакцины для профилактики кори, краснухи и паротита. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(5): 414–422. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-131>

Для корреспонденции: Бинятова Анна Станиславовна, эксперт 1-й категории, ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, г. Москва, Россия. E-mail: Vinatova@exrmed.ru

Участие авторов: Бинятова А.С. – дизайн исследования, проведение исследований, анализ результатов, написание текста рукописи; Юнасова Т.Н. – дизайн исследования, анализ полученных результатов, критический пересмотр содержания рукописи; Ильясова Т.Н. – проведение испытаний качества препарата; Фадейкина О.В. – анализ и статистическая обработка результатов исследования; Саркисян К.А. – идея, концепция и дизайн исследования, консультативная помощь в анализе результатов; Мовсесянц А.А. – консультативная помощь в анализе результатов, окончательное утверждение версии рукописи для публикации.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Поступила 15.07.2022

Принята в печать 04.10.2022

Опубликована 31.10.2022

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-131>

Quality analysis of a combined domestic vaccine for the prevention of measles, rubella and mumps

Anna S. Binyatova, Tatyana N. Unasova, Tatyana N. Iliasova, Karine A. Sarkisyan, Olga V. Fadeikina, Artashes A. Movsesyants

Scientific Center for Examination of Medical Devices, 127051, Moscow, Russia

Introduction. The need to maintain a high level of vaccination coverage against measles, rubella and mumps in conditions of an increased risk of outbreaks of infections due to violations of vaccination tactics associated with the pandemic of coronavirus infection and due to the unfavorable epidemic situation in neighboring countries determines the advisability of using a combined vaccine for the simultaneous prevention of these three socially significant infections.

The **aim** of the study: to analyze the quality of commercial series of a new domestic combined cultured live vaccine against measles, rubella and mumps (MRM) throughout the entire time of its manufacturing according to all specification indicators in regulatory documentation (RD).

Materials and methods. The object of the study was the combined cultured live vaccine against measles, rubella and mumps. The analysis of the quality of the drug was carried out according to 86 consolidated production protocols of manufactured series, as well as according to the results of control of these series in the Testing Center for Quality Expertise of the Federal State Budgetary Institution NCESMP of the Ministry of Health of the Russian Federation.

Results. It is shown that the quality of the combined drug for the prevention of measles, rubella and mumps corresponds to the RD in all studied indicators. The drug does not contain an antibiotic. Bovine serum albumin, which is a technological impurity, is detected in quantities more than 5 times lower than the established norm. A comparison of the specific activity of the viral components of new combined domestic vaccine and the components of the bivalent vaccine against measles and mumps produced by the company in 2019–2021 showed that the spread of the activity values of the viral components in the new drug and in the series of mumps-measles vaccine was minimal, which allowed us to make a conclusion about the stability of the production technology.

Conclusion. The quality of the new domestic combined vaccine for the prevention of measles, rubella and mumps meets WHO requirements. The results of the conducted studies indicate the stability of production and the standard quality of the drug. The use of a combined vaccine against three significant infections will ensure the necessary level of vaccination coverage in the population. Information about the results of studies can help reduce the number of vaccination refusal.

Keywords: *combined vaccine for the prevention of measles, rubella and mumps; quality indicators; technology stability; quality standard; measles amnesia; outbreaks of mumps among properly vaccinated; industry standard sample*

For citation: Binyatova A.S., Unasova T.N., Iliasova T.N., Sarkisyan K.A., Fadeikina O.V., Movsesyants A.A. Quality analysis of a combined domestic vaccine for the prevention of measles, rubella and mumps. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(5): 414–422. (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-131>

For correspondence: Anna S. Binyatova, 1st Category Expert, Scientific Center for the Examination of Medical Products, 127051, Moscow, Russia. E-mail: Binyatova@expmed.ru

Information about the authors:

Binyatova A.S., <https://orcid.org/0000-0003-3011-2030>

Unasova T.N., <https://orcid.org/0000-0002-1606-942X>

Iliasova T.N., <https://orcid.org/0000-0002-0905-3630>

Sarkisyan K.A., <https://orcid.org/0000-0003-0445-7086>

Fadeikina O.V., <https://orcid.org/0000-0002-8473-7442>

Movsesyants A.A., <https://orcid.org/0000-0003-2132-0962>

Contribution: Binyatova A.S. – research design, research, analysis of results, writing the text of the manuscript; Unasova T.N. – research design, analysis of the results obtained, critical revision of the content of the manuscript; Iliasova T.N. – conducting drug quality tests; Fadeikina O.V. – analysis and statistical processing of research results; Sarkisyan K.A. – idea, concept and design of the study, advisory assistance in analyzing the results; Movsesyants A.A. – advisory assistance in analyzing the results, final approval of the manuscript version for publication.

Funding. The work was carried out within the framework of the state task of the Federal State Budgetary Institution NCESMP of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 056-00001-22-00 for conducting applied scientific research (state registration number NIR 121022000147-4).

Conflict of interests. The authors declare that there is no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Received 15 July 2022

Accepted 04 October 2022

Published 31 October 2022

Введение

Корь, краснуха и эпидемический паротит – широко распространённые социально значимые инфекции вирусной этиологии, управляемые средствами специфической профилактики. До внедрения вакцинопрофилактики кори в практику здравоохранения во всём мире от этого заболевания ежегодно умирали 2,6 млн человек, в основном дети [1]. Краснуха – тератогенное заболевание, что обуславливает особую важность вакцинопрофилактики этой инфекции. Эпидемический паротит не характеризуется столь высокой заболеваемостью и смертностью, как корь, или фатальными осложнениями развития плода у беременных, как краснуха, но может привести к нейросенсорной глухоте, вирусному менингиту, орхиту, оофориту и бесплодию. Для профилактики этих инфекций используются комбинированные вакцины, благодаря чему заболеваемость вышеназванными инфекциями, включая эпидемический паротит, значительно снизилась [2].

Возможность элиминации кори и краснухи с помощью специфической вакцинопрофилактики была подтверждена теоретическими данными, в основе которых лежат стойкий иммунитет после заболевания, отсутствие вирусоносительства и других резервуаров этих вирусов в природе, кроме человека, наличие безопасных и эффективных вакцин, а также кардинальными изменениями эпидемического процесса названных инфекций [1, 3]. Это позволило Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) разработать стратегический план глобальной ликвидации кори и краснухи в Европейском регионе [4].

С 2002 г. наша страна проводит работу по элиминации кори и краснухи, основанную на стратегическом плане ВОЗ. В 2007–2010 гг. в соответствии с индикативными критериями элиминации (заболеваемость менее 1 человека на 1 млн жителей, охват вакцинацией не менее 95% населения декретированного возраста, отсутствие циркуляции эндемичного вируса) Россия вступила в стадию элиминации кори [5]. По состоянию на конец 2018 г. 35 стран Европейского региона приобрели или сохраняли статус элиминации кори.

После устойчивого глобального прогресса по элиминации кори в ряде стран происходил постепенный рост заболеваемости. Четыре страны Европейского региона (Албания, Чехия, Греция, Соединённое Королевство Великобритании и Северной Ирландии) в 2018 г. утратили статус стран, победивших коревую инфекцию [6]. В 2000 г. было объявлено о полной ликвидации кори в США, ликвидирована циркуляция эндемичной кори в Японии, Монголии, Бразилии [7].

В 2019 г. показатели заболеваемости корью во всём мире достигли самого высокого уровня за 23 года [8]. По данным эпидемиологического мониторинга инфекционной заболеваемости, в 2019 г. в России было зарегистрировано 3705 случаев коревой инфекции. В результате Россия вошла в пятёрку стран с высоким уровнем заболеваемости корью после Украины, Казахстана, Грузии и Израиля. В 2019 г. также были зарегистрированы 22 вспышки коревой инфекции

и более 1200 заболевших в США, что угрожало статусу этого государства как страны, достигшей элиминации кори [9].

По итогам анализа вспышек кори в мире было установлено, что распространение инфекции и рост смертности отмечались преимущественно у невакцинированного населения; главной причиной роста заболеваемости считается несвоевременная вакцинация детей двумя дозами моно- или ассоциированных вакцин с коревым компонентом [8].

При анализе причин повышения заболеваемости корью в нашей стране установлена отрицательная роль отказов от вакцинации, а также многочисленных долгосрочных, а нередко и необоснованных медицинских отводов. Примечательно, что отказывались от вакцинации в первую очередь работники медицинских организаций, торговли, образовательных учреждений и студенты средних и высших учебных заведений [2, 9]. Определённую роль играет риск завоза коревой инфекции из сопредельных стран с неблагоприятной эпидемической ситуацией и низким охватом населения вакцинацией.

Нельзя не отметить, что в 2020 г. повсеместно произошёл спад заболеваемости корью, в России показатель заболеваемости составил 0,83 на 100 тыс. населения, что в 3,6 раза ниже уровня 2019 г. [2]. Важно подчеркнуть, что спад заболеваемости корью в мире произошёл на фоне пандемии новой коронавирусной инфекции COVID-19, начавшейся в конце декабря 2019 г., и был обусловлен, по всей вероятности, карантинными мероприятиями, проводившимися для ограничения распространения этого заболевания. Кроме того, в связи с пандемией произошло нарушение схем и объёма плановой вакцинации. Как сообщалось в докладе ВОЗ, из-за пандемии COVID-19 были перенесены 24 кампании вакцинации против кори, запланированные на 2020 г. в 23 странах мира, что усугубило глобальные пробелы в иммунизации и подвергло риску инфицирования более 93 млн человек. Таким образом, пандемия COVID-19 привела к опасному снижению охвата иммунизацией, в результате чего увеличился риск вспышек кори [10–12].

В 2021 г. продолжился наметившийся в 2020 г. спад заболеваемости корью, обусловленный ограничительными мероприятиями по COVID-19. В России в течение года был зарегистрирован 1 случай кори; показатель заболеваемости составил 0,0007 на 100 тыс. населения.

Охват своевременной вакцинацией против кори в 2021 г. в Российской Федерации составлял 98,8%. Вспышки кори на Украине, в Казахстане, Таджикистане обуславливают необходимость сохранять высокий уровень охвата иммунизацией против кори населения нашей страны, включая иностранцев [13].

Следует особо подчеркнуть, что две особенности вируса кори создают серьёзную угрозу для здоровья. Первая – это исключительная контагиозность вируса, вторая – способность поражать иммунные клетки и нарушать иммунную память организма, вызывая так называемую иммунную амнезию. По мнению

профессора Гарвардской медицинской школы генетика С. Элледжа, одного из исследователей феномена иммунной амнезии, вызываемой вирусом кори у больных, угроза, которую корь представляет для людей, намного больше, чем предполагалось ранее [14]. В результате проведённых исследований получены убедительные доказательства того, что вирус кори вызывает изменения в иммунной системе больного корью. Получены данные, описывающие процессы, лежащие в основе иммунной амнезии у переболевших. Угнетение иммунитета, вызванное коревой инфекцией, снижает способность противостоять даже таким инфекциям, к которым в организме уже ранее сформировался иммунитет, постинфекционный или поствакцинальный. Иммуносупрессия может длиться от нескольких месяцев до нескольких лет [6, 15, 16].

Очень важными также являются исследования, в которых представлены доказательства того, что вакцинация против кори, защищающая от инфицирования, предотвращает потерю организмом иммунной памяти и сохраняет его устойчивость к другим инфекциям в долгосрочной перспективе [15–18]. Результаты этих исследований обеспечивают убедительную мотивацию для вакцинопрофилактики кори. Использование таких научных данных в просветительских целях может способствовать снижению отказов от вакцинации.

С 2017 г. Российская Федерация признана Европейским региональным бюро ВОЗ территорией, свободной от эндемичной краснухи [19]. Показательная статистика её заболеваемости: в 2017 г. в России было выявлено 6 случаев краснухи, в 2018 – 5, в 2019 г. – ни одного. В 2020 г. в РФ выявлено 3 случая краснухи, показатель заболеваемости составил 0,002 на 100 тыс. населения [20]. В 2021 г. зарегистрирован один случай краснухи на территории РФ: заболел человек, не привитый против этой инфекции. Случаев синдрома врождённой краснухи, как и летальных, на территории Российской Федерации не зарегистрировано. Уровень охвата вакцинацией против краснухи детей второго года жизни в стране в 2021 г. составляет более 97%. В стране продолжает сохраняться период элиминации краснухи [13].

В 2021 г. в Российской Федерации показатель заболеваемости эпидемическим паротитом составил 0,19 на 100 тыс. населения, что в 1,6 раза меньше, чем в 2020 г. (0,3 на 100 тыс. населения). Эпидемический процесс эпидемического паротита поддерживается за счёт непривитых и лиц с неизвестным прививочным анамнезом, на долю которых приходилось 81,1% заболевших. Однократно привитые болели в 13,5% случаев, двукратно привитые – в 5,4%, что свидетельствует об эффективности вакцинопрофилактики [13].

Несмотря на эффективность вакцинопрофилактики, эпидемический паротит продолжает привлекать внимание исследователей, которые отмечают увеличение количества его вспышек с акцентом на взрослое население даже при высоком уровне охвата вакцинацией, в том числе среди правильно привитых [21–23]. Исследователи пришли к выводу, что в ус-

ловиях уменьшения циркуляции дикого вируса эпидемического паротита не происходит бустеризации поствакцинального иммунитета, а существующие штаммы вируса паротита, входящие в комбинированные вакцины с паротитным компонентом, вероятно, не обеспечивают полной невосприимчивости к циркулирующим диким штаммам вируса паротита, что, по-видимому, и приводит к вспышечной заболеваемости среди правильно привитых. Таким образом, появилась необходимость углублённого изучения состояния и продолжительности иммунитета у привитых против паротита [23, 24]. При этом исследователи отмечают, что вакцинация против паротита полезна, потому что, по их наблюдениям, даже если вакцинация против паротита не устраняет риск заражения у всех привитых, то защищает их от тяжёлых клинических проявлений заболевания и осложнений [25].

В связи с существующим риском завоза коревой, краснушной и паротитной инфекции из сопредельных стран очевидно, что защитить население России от названных инфекций можно с помощью максимального охвата вакцинацией, для обеспечения которой необходимы профилактические препараты регламентированного качества [26].

Облегчает работу по увеличению охвата населения прививками применение комбинированной вакцины против кори, паротита и краснухи. В РФ в настоящее время зарегистрирован препарат культуральной живой комбинированной вакцины против кори, краснухи и паротита. Новая трёхвалентная вакцина успешно прошла полный цикл доклинических и клинических испытаний по оценке безопасности, реактогенности и иммуногенности. Первые коммерческие серии препарата поступили в гражданский оборот в конце 2020 г.

В свете выполнения программы по элиминации вышеназванных инфекций важен и необходим анализ качества новой отечественной комбинированной вакцины.

Цель исследования – анализ качества коммерческих серий нового отечественного препарата культуральной живой комбинированной вакцины против кори, краснухи и паротита за время её выпуска с ноября 2020 по март 2022 г.

Материалы и методы

Образцы комбинированной вакцины были представлены АО «НПО Микроген». Анализ качества препарата производился по сводным протоколам производства 86 коммерческих серий и по результатам контроля этих серий в Испытательном центре экспертизы качества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России (далее ИЦ). Испытания всех серий были проведены по показателям спецификации методами, строго соответствующими нормативной документацией (НД) и Государственной фармакопее Российской Федерации:

- подлинность;
- специфическая активность;

- термостабильность;
- pH раствора;
- потеря в массе при высушивании;
- остаточное количество бычьего сывороточного альбумина (БСА);
- содержание гентамицина сульфата [27].

По материалам сводных протоколов производства также сделан анализ качества вакцины по таким показателям, по которым контроль вакцины проводят в процессе производства, а именно: точность розлива и содержание остаточного кислорода в ампулах с препаратом, запаянных в среде инертного газа.

При каждом проведении контроля специфической активности вакцины для подтверждения приемлемости получаемых результатов на предприятии и в ИЦ использовали актуальные серии (сер.) аттестованных отраслевых стандартных образцов (ОСО):

- ОСО активности живой коревой вакцины (ОСО 42-28-347-2017 сер. 10), годен до 01.12.2022;
- ОСО активности живой паротитной вакцины (ОСО 42-28-348-2019 сер. 5), годен до 16.08.2024;
- ОСО активности вакцины против краснухи (ОСО 42-28-426-2018, сер. 1), годен до 13.06.2023;
- ОСО активности вакцины против краснухи (ОСО 42-28-426-2021, сер. 2), годен до 15.03.2026.

При испытаниях активности краснушного компонента вакцины ККП в ИЦ в 5 опытах была использована сер. 1 ОСО и в 12 опытах – сер. 2. ОСО. На предприятии в указанных целях использована сер. 1 ОСО.

С 1 июля 2021 г. перечисленные отраслевые стандартные образцы включены в Реестр фармакопейных стандартных образцов Государственной фармакопеи Российской Федерации в соответствии с пунктами 2 и 3 Приказа Министерства здравоохранения Российской Федерации от 20 марта 2020 г. № 202 [28].

При каждом проведении контроля специфической активности вирусных компонентов вакцины одну ампулу ОСО каждого наименования титровали трижды. Для оценки приемлемости получаемых результатов проводили расчёт доверительного интервала (ДИ) среднего значения титра ОСО, определённого при трёхкратном титровании 1 ампулы. Результаты определения активности вирусных компонентов вакцины считались действительными, если:

1) диапазон ДИ ($P = 0,95$) среднего значения титра ОСО каждого наименования, определённого при трёхкратном титровании 1 ампулы, не превышал $\pm 0,3 \lg \text{ТЦД}_{50}$ (тканевых цитопатогенных доз);

2) активность ОСО каждого наименования не выходила за пределы доверительных границ средней геометрической титра, установленного при его аттестации.

Указанные критерии приемлемости результатов определения активности вируса в вакцине содержатся в НД и соответствуют Европейской фармакопее 10.0 [29].

Статистическую обработку полученных результатов (расчёт среднеарифметического значения (M), стандартного (среднеквадратического) отклонения (SD) и ДИ) проводили общепринятыми методами [30] с помощью программы Microsoft Excel 2007.

Результаты

Препарат для профилактики кори, краснухи и паротита представляет собой лиофилизированную смесь жидких полуфабрикатов коревой, паротитной и краснушной вакцин. Для изготовления вакцины использованы аттенуированные штаммы вируса кори Ленинград-16, вируса паротита Ленинград-3 и вируса краснухи RA 27/3. На основе этих штаммов предприятие производит моновалентные вакцины против кори и паротита с 1967 и 1980 г. соответственно, ассоциированную паротитно-коревую вакцину – с 2002 г.; вакцину против краснухи предприятие производит с 2008 г.

В исследованиях, проведённых нами ранее, мы сообщали о всестороннем изучении названных штаммов и их генетической стабильности, об особенностях технологии производства отечественных вакцин против кори и паротита и о результатах шестнадцатилетнего мониторинга качества вакцин против кори и паротита, а также о результатах пятилетнего мониторинга качества вакцин против краснухи отечественного производства. Результаты этих исследований свидетельствовали о стабильности качества препаратов и технологии их производства за время наблюдения [31, 32].

Материалы анализа коммерческих серий новой вакцины по ряду показателей представлены в **табл. 1**. Точность дозирования вакцины контролируется на производстве и оценивается по коэффициенту вариации массы сухого остатка в ампуле, который в анализируемых сериях колебался от 0,1 до 0,7%. Среднее значение коэффициента вариации массы сухого остатка 86 серий по данным сводных протоколов предприятия составило $0,43 \pm 0,10\%$, при нормативном требовании к этому показателю – не более 10%. Высокая точность розлива препарата обеспечивает равномерное распределение действующего вещества по массе препарата, в том числе равноценное содержание вируса в каждой ампуле серии.

Качество инертного газа, в атмосфере которого производится герметизация препарата, оценивается по количеству остаточного кислорода, которое не должно превышать 1%. Контроль этого показателя осуществляет предприятие при герметизации каждой серии. Среднее содержание остаточного кислорода в азоте, который используется при герметизации вакцины ККП, по данным сводных протоколов предприятия составляло $0,53 \pm 0,11\%$ при колебании числового показателя от серии к серии от 0,4 до 0,8%.

Анализ качества новой вакцины по показателю потери в массе при высушивании показал, что среднее значение, полученное при испытании 86 серий на предприятии, составило $0,76 \pm 0,17\%$, при испытании этих серий в ИЦ – $0,79 \pm 0,23\%$, нормативное требование к этому показателю качества – не более 2%.

Нормативные требования к значению водородного показателя pH восстановленного раствора вакцины – 7,3–7,9. Среднее значение pH 86 серий при контроле на предприятии составило $7,63 \pm 0,05$, при контроле в ИЦ – $7,62 \pm 0,04$. Колебания значений pH при контроле на предприятии и в ИЦ находились в диапазоне 7,5–7,8.

Таблица 1. Показатели качества 86 серий вакцины ККП по данным сводных протоколов предприятия и испытательного центра, M ± SD
Table 1. Quality indicators of 86 series of MRM vaccine according to the summary protocols of manufacturer and tests in the test center, M ± SD

Данные Data	Потеря в массе при высушивании, % Weight loss during drying, %	Точность розлива, % Filling accuracy, %	pH	БСА, нг / 0,5 мл BSA, ng / 0.5 ml	Остаточный кислород, % Residual oxygen, %
	НД: не более 2% ND: not more than 2%	НД: не более 10% ND: not more than 10%	НД: 7,3–7,9 ND: 7,3–7,9	НД: не более 50 нг / 0,5 мл ND: not more than 50 ng / 0.5 ml	НД: не более 1% ND: not more than 1%
Паспортные Passport	0,76 ± 0,17 (0,5–1,0)	0,43 ± 0,10 (0,1–0,7)	7,63 ± 0,05 (7,5–7,8)	6,01 ± 1,80 (2,4–10,4)	0,53 ± 0,11 (0,4–0,8)
Испытательного центра Test center	0,79 ± 0,23 (0,2–1,3)	–	7,62 ± 0,04 (7,5–7,8)	2,23 ± 0,61 (1,2–3,8)	–

Примечание. НД – нормативная документация; прочерк (–) – не определяли. В скобках указан диапазон значений.

Note. ND – normative documentation; dash (–) – not determined. The range of values is given in parentheses.

Таблица 2. Характеристика 86 серий вакцины ККП по активности вирусных компонентов по данным сводных протоколов и испытательного центра, M ± SD

Table 2. Characteristics of 86 series of MRM vaccine on the activity of viral components according to the summary protocols of manufacturer and tests in the test center

Данные Data	Активность компонента в lg ТЦД ₅₀ / 0,5 мл Activity in lg TCD ₅₀ / 0.5 ml			Снижение активности компонента в тесте термостабильности lg ТЦД ₅₀ / 0,5 мл Reduced activity in the thermal stability test lg TCD ₅₀ / 0.5 ml		
	коронового The measles	краснушного The rubella	паротитного The mumps	коронового The measles	краснушного The rubella	паротитного The mumps
	НД: не менее 3 lg ТЦД ₅₀ в дозе ND: not less than 3 lg TCD ₅₀ in dose	НД: не менее 3 lg ТЦД ₅₀ в дозе ND: not less than 3 lg TCD ₅₀ in dose	НД: не менее 4,3 lg ТЦД ₅₀ в дозе ND: not less than 4.3 lg TCD ₅₀ in dose	НД: снижение титра не более чем на 1 lg ND: reduction of the titer by no more than 1 lg		
Паспортные Passport	4,30 ± 0,15 (3,87–4,57)	4,09 ± 0,20 (3,73–4,2)	5,32 ± 0,10 (5,1–5,47)	0,54 ± 0,15	0,27 ± 0,14	0,58 ± 0,15
Испытательного центра Test center	4,23 ± 0,19 (3,87–4,7)	3,84 ± 0,19 (3,53–4,43)	5,44 ± 0,16 (5,03–5,73)	0,56 ± 0,16	0,25 ± 0,16	0,71 ± 0,47

Примечание. НД – нормативная документация. В скобках указан диапазон значений.

Note. ND – normative documentation. The range of values is given in parentheses.

Стабильные значения вышеназванных показателей качества препарата, определённые как на предприятии, так и в ИЦ, свидетельствуют о том, что условия для сохранения активности вирусных компонентов обеспечиваются технологией производства.

Результаты анализа специфической активности корового, паротитного и краснушного компонента в вакцине представлены в **табл. 2**. Нормативное требование к содержанию вируса кори и краснухи в прививочной дозе – не менее 3,0 lg ТЦД₅₀ / 0,5 мл; к содержанию вируса паротита – не менее 4,3 lg ТЦД₅₀ / 0,5 мл. Как видно из таблицы, среднее значение активности корового компонента 86 серий вакцины ККП на предприятии составляло 4,3 ± 0,15, при испытаниях в ИЦ – 4,3 ± 0,19, краснушного компонента: на предприятии – 4,09 ± 0,20, в ИЦ – 3,84 ± 0,19; паротитного компонента: на предприятии – 5,32 ± 0,10, в ИЦ – 5,44 ± 0,16. Таким образом, все анализируемые серии по данным контроля специфической активности вирусных компонентов как на предприятии, так и в ИЦ соответствовали нормативным требованиям; актив-

ность вирусных компонентов во всех сериях была выше минимального регламентированного уровня.

Одновременно с определением специфической активности вирусных компонентов в вакцине, хранившейся в регламентированных условиях, была определена специфическая активность компонентов в тесте термостабильности, т. е. после семидневного выдерживания вакцины при температуре 37 ± 1 °С. По нашим данным, средняя арифметическая величина титра каждого вируса в образцах всех серий вакцины после прогревания снижалась не более чем на 1 lg ТЦД₅₀ / 0,5 мл (**табл. 2**), что соответствовало требованиям НД.

Приемлемость результатов определения активности вирусных компонентов в вакцине подтверждали, анализируя результаты исследования активности вируса кори, паротита и краснухи в ОСО каждого наименования. Аттестованные значения ОСО указаны в **табл. 3**. Как видно из таблицы, активность вируса в ОСО каждого наименования при определении на предприятии и в ИЦ не выходила

за пределы доверительных границ среднего значения титра, установленного при его аттестации, и отличалась от аттестованного значения менее чем на $0,5 \lg \text{TCD}_{50} / 0,5 \text{ мл}$. При расчёте ДИ среднего значения титра ОСО каждого наименования, определённого при трёхкратном титровании 1 ампулы, было установлено, что диапазон ДИ ($P = 0,95$) среднего значения титра ОСО колебался в пределах $\pm 0,3 \lg \text{TCD}_{50}$. Таким образом, данные определения активности вируса в ОСО каждого наименования свидетельствовали об их соответствии критериям приемлемости, указанным в НД, и позволили считать результаты определения активности вирусных компонентов в вакцине достоверными.

В НД на препарат есть ещё два показателя, которые имеют большое значение для качества вакцины. Это остаточное количество БСА и остаточное содержание антибиотика гентамицина сульфата.

Нормативное требование к содержанию БСА – не более 50 нг в одной прививочной дозе. Во всех образцах 86 серий вакцины ККП значение БСА при определении как на предприятии, так и в ИЦ находилось в диапазоне от 1,2 до 9 нг / 0,5 мл, что более чем в 5 раз ниже установленной нормы.

Нормативное требование к содержанию гентамицина сульфата – не более 0,5 мкг в одной прививочной дозе. При испытаниях препарата по этому показателю на предприятии и в ИЦ установлено, что антибиотик не был выявлен ни в одной серии вакцины. В результате анализа показано, что содержание гентамицина сульфата во всех сериях было менее 0,5 мкг в дозе, т. е. меньше предела обнаружения.

Обсуждение

Результаты, полученные при оценке нового отечественного комбинированного препарата для профилактики кори, паротита и краснухи по всем

показателям качества, свидетельствуют о соответствии всех изученных серий препарата, выпущенных с ноября 2020 г. по март 2022 г., требованиям НД, а также требованиям Европейской фармакопеи и ВОЗ [33].

Важно отметить, что БСА и гентамицина сульфат являются технологическими примесями. Полученные нами данные, указывающие на следовое количество или полное отсутствие этих веществ в исследованных препаратах, свидетельствуют о том, что при использовании новой комбинированной вакцины для профилактики кори, краснухи и паротита минимизирован риск сенсibilизации привитых этими веществами. Аналогичные результаты мы отмечаем ранее при многолетнем мониторинге качества моновакцин против кори, паротита и краснухи и паротитно-коровой вакцины, производимых в АО «НПО» Микроген» [31, 32]. Все полученные данные свидетельствуют о стабильности показателей качества названных препаратов в течение многих лет.

Было проведено сравнение результатов контроля специфической активности компонентов нового препарата и компонентов дивакцины против кори и паротита, произведённой предприятием в течение трех лет в 2019–2021 гг., при этом вакцинные штаммы и технология производства этих препаратов были одинаковыми. Из табл. 4, в которой представлены результаты этого исследования, видно, что разброс значений активности вирусных компонентов в новом препарате и в сериях паротитно-коровой вакцины, производящейся в период с 2019 по 2021 г., был минимален и не превышал ± 2 стандартных отклонения, что может свидетельствовать как о валидности методов определения специфической активности вируса кори, краснухи и паротита, так и о стабильности технологии производства препаратов. Значения титров вирусных компонентов этих вакцин, полученные при

Таблица 3. Активность вируса кори, краснухи и паротита в отраслевых стандартных образцах активности живой коревой вакцины, живой паротитной вакцины и вакцины против краснухи, используемых при контроле активности компонентов вакцины ККП, $M \pm SD$

Table 3. Activity of measles virus, rubella and mumps in the in industry standard samples of activity of live measles vaccine, live mumps vaccine and rubella vaccine used in the control of the activity of the MRM vaccine components, $M \pm SD$

Титр вируса кори в ОСО 42-28-347-2017 активности живой коревой вакцины сер. 10, аттестованное значение в $\lg \text{TCD}_{50} - 4,63 \pm 0,5$ The titer of the measles virus in OSO 42-28-347-2017 activity of live measles vaccine ser. 10, certified value in $\lg \text{TCD}_{50} - 4.63 \pm 0.5$		Титр вируса краснухи в ОСО 42-28-426-2018 активности вакцины против краснухи сер. 1, аттестованное значение: в $\lg \text{TCD}_{50} - 4,63 \pm 0,5$ The titer of the rubella virus in OSO 42-28-426-2018 activity of the rubella vaccine ser. 1, certified value: in $\lg \text{TCD}_{50} - 4.63 \pm 0.5$		Титр вируса краснухи в ОСО 42-28-426-2021 активности вакцины против краснухи сер. 2, аттестованное значение: в $\lg \text{TCD}_{50} - 4,60 \pm 0,5$ The titer of the rubella virus in OSO 42-28-426-2021 activity of the rubella vaccine ser. 2, certified value: in $\lg \text{TCD}_{50} - 4.60 \pm 0.5$		Титр вируса паротита в ОСО 42-28-348-2019 активности живой паротитной вакцины сер. 5, аттестованное значение: в $\lg \text{TCD}_{50} - 5,8 \pm 0,5$ The titer of the mumps virus in OSO 42-28-348-2019 activity of live mumps vaccine ser. 5 certified value: in $\lg \text{TCD}_{50} - 5.8 \pm 0.5$	
Предприятие Company	Испытательный центр Test center	Предприятие Company	Испытательный центр Test center	Испытательный центр Test center	Предприятие Company	Испытательный центр Test center	
4,58 ± 0,13 (45)	4,62 ± 0,14 (17)	4,89 ± 0,16 (45)	4,84 ± 0,16 (5)	4,67 ± 0,20 (12)	5,71 ± 0,13 (45)	5,74 ± 0,18 (17)	

Примечание. ОСО – отраслевые стандартные образцы. В скобках указано количество определений.

Note. OSO – industry standard samples. Numbers in parentheses indicate the number of test repetitions.

Таблица 4. Специфическая активность компонентов вакцины ККП и паротитно-коревой вакцины в Ig TCD₅₀ / 0,5 мл по паспортным данным предприятия и данным испытательного центра, M ± SD

Table 4. Specific activity of the components MRM vaccine and mumps-measles vaccine in Ig TCD₅₀ / 0.5 ml according to the passport data of the manufacturer and the data of the test center, M ± SD

Год Year	Вакцина паротитно-коревая культуральная живая Mumps-measles cultured live vaccine				вакцина ККП MRM vaccine					
	Коревой компонент The measles component		Паротитный компонент Mumps component		Коревой компонент The measles component		Паротитный компонент Mumps component		Краснушный компонент The rubella component	
	ПД PD	ИЦ TC	ПД PD	ИЦ TC	ПД PD	ИЦ TC	ПД PD	ИЦ TC	ПД PD	ИЦ TC
2019	4,18 ± 0,13 (142)	4,21 ± 0,17 (57)	5,51 ± 0,10 (142)	5,55 ± 0,11 (57)	–	–	–	–	–	–
2020	4,17 ± 0,13 (138)	4,21 ± 0,19 (138)	5,39 ± 0,10 (138)	5,57 ± 0,13 (138)	–	–	–	–	–	–
2021	4,3 ± 0,10 (64) [4,14–4,4]	4,39 ± 0,14 (64) [4,07–4,63]	5,39 ± 0,09 (64) [5,17–5,54]	5,55 ± 0,11 (64) [5,17–5,8]	4,30 ± 0,15 (86) [3,87–4,57]	4,23 ± 0,19 (86) [3,87–4,7]	5,32 ± 0,10 (86) [5,1–5,47]	5,44 ± 0,16 (86) [5,03–5,73]	4,09 ± 0,20 (86) [3,73–4,2]	3,84 ± 0,19 (86) [3,53–4,43]

Примечание. ПД – паспортные данные; ИЦ – испытательный центр; прочерк (–) – не определяли. В круглых скобках указано количество исследованных серий, в квадратных – диапазон значений.

Note. PD – passport data; TC – testing center; dash (–) – not determined. The number of studied series is indicated in round brackets, the range of values is indicated in square brackets.

испытании на предприятии, воспроизводились при контроле в ИЦ. Активность вирусных компонентов новой отечественной комбинированной вакцины была сопоставима с активностью компонентов паротитно-коревой вакцины в течение последних 3 лет.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высоком качестве нового отечественного комбинированного препарата для профилактики кори, краснухи и паротита, применение которого поможет решить задачу, поставленную Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации на период с 2020 по 2035 г. по элиминации кори и краснухи во всех регионах страны [2].

Выводы

1. Качество нового отечественного комбинированного препарата против кори, краснухи и паротита соответствует национальным и международным требованиям.

2. Материалы, полученные при анализе качества нового препарата, свидетельствуют о стабильности технологии его производства и стандартности качества.

3. Доступность информации о результатах анализа качества нового комбинированного препарата может способствовать снижению количества медицинских отводов, отказов от вакцинации и увеличению охвата населения иммунизацией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ноздрачева А.В., Семенов Т.А. Состояние популяционного иммунитета к кори в России: систематический обзор и метаанализ эпидемиологических исследований. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2020; 97(5): 445–57. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-7>
2. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году». М.; 2021.
3. Болотовский В.М. Корь. В кн.: Покровский В.И., ред. *Руководство по эпидемиологии и инфекционным болезням. Том 2. Частная эпидемиология*. М.: Медицина; 1993: 210–21.
4. Orenstein W.A., Hinman A., Nkowane B., Olive J.M., Reingold A.

- Measles and Rubella Global Strategic Plan 2012–2020: midterm review. *Vaccine*. 2018; 36(Suppl. 1): A1–34. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.09.026>
5. О программе «Элиминация кори и краснухи в Российской Федерации (2016–2020 гг.)». Available at: http://25.rospotrebnadzor.ru/rss_all/-/asset_publisher/Kq6j/content/id/336749
6. Plemper R.K. Measles resurgence and drug development. *Curr. Opin. Virol*. 2020; 41: 8–17. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.02.007>
7. Wang H., Zhang Y., Mao N., Zhu Z., Cui A., Xu S., et al. Molecular characterization of measles viruses in China: Circulation dynamics of the endemic H1 genotype from 2011 to 2017. *Plos One*. 2019; 14(6): e0218782. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218782>
8. ВОЗ. Показатели смертности от кори во всем мире в период с 2016 по 2019 г. возросли на 50%, и в 2019 г. эта болезнь унесла более 207 500 жизней 12 ноября 2020 г.; 2020. Available at: <https://www.who.int/ru/news/item/12-11-2020-worldwide-measles-deaths-climb-50-from-2016-to-2019-claiming-over-207-500-lives-in-2019>
9. Сагова Д.И., Медведева П.С., Степанова А.В., Халтурина Е.О. Актуальность нерешенной проблемы кори. В кн.: *XIII Международная студенческая научная конференция Студенческий научный форум – 2020*. Available at: <https://scienceforum.ru/2020/article/2018020442>
10. ВОЗ. COVID-19 по-прежнему затрудняет оказание основных услуг здравоохранения в 90% стран; 2021. Available at: <https://www.who.int/ru/news/item/23-04-2021-covid-19-continues-to-disrupt-essential-health-services-in-90-of-countries>
11. РИА. В ВОЗ обеспокоены возросшим риском вспышек кори; 2021. Available at: <https://ria.ru/20211110/kor-i-758475953.html>
12. Семенов Т.А., Ноздрачева А.В. Анализ и перспективы развития эпидемиологической ситуации по кори в условиях пандемии COVID-19. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2021; 20(5): 21–31. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-5-21-31>
13. Программа «Элиминация кори и краснухи в Российской Федерации» (2016 – 2020 гг.). Available at: https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/bcf/programma_elyuminatsii_kori_i_krasnuhi_v_rf_2016_2020_gg.pdf
14. Dutchen S. *Inside Immune Amnesia*. Harvard: Harvard Medical School News & Research; 2019.
15. Mina M.J., Kula T., Leng Y., Li M., de Vries R.D., Kip M., et al. Measles virus infection diminishes preexisting antibodies that offer protection from other pathogens. *Science*. 2019; 366(6465): 599–606. <https://doi.org/10.1126/science.aay6485>
16. Petrova V.N., Sawatsky B., Han A.X., Laksono B.M., Walz L., Parker E., et al. Incomplete genetic reconstitution of B cell pools contributes to prolonged immunosuppression after measles. *Sci. Immunol*. 2019; 4(41): eaay6125. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aay6125>
17. ScienceNews. Sanders L. Measles erases the immune system’s memory; 2019. Available at: <https://www.sciencenews.org/article/measles-immune-system-memory-infection>
18. CNN Health. Yeung J. Measles wipe immune system’s memory of other illnesses, studies find. Available at: <https://edition.cnn.com/2019/11/01/health/measles-amnesia-study-intl-hnk-scli-scn/index.html>
19. Распоряжение Правительства РФ № 2390-р. Стратегия развития

- иммунопрофилактики инфекционных болезней на период до 2035 года. М.; 2020.
- Naked Science. Краснеть не придется: как в России победили краснуху; 2020. Available at: <https://naked-science.ru/article/column/krasnet-ne-pridetsya-kak-v-rossii-pobedili-krasnuhu>
 - Семериков В.В., Юминова Н.В., Постановова Н.О., Софронова Л.В., Контаров Н.А. Эпидемический паротит в России: эпидемическая ситуация, основные задачи и пути решения. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2019; 18(6): 75–80. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-6-75-80>
 - Connell A.R., Connell J., Leahy T.R., Hassan J. Mumps outbreaks in vaccinated populations – is it time to re-assess the clinical efficacy of vaccines? *Front. Immunol.* 2020; 11: 2089. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02089>
 - Тураева Н.В., Фролов Р.А., Цвиркун О.В., Герасимова А.Г. Характеристика эпидемиологической ситуации по эпидемическому паротиту в мире на современном этапе. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2021; 20(2): 74–82. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-2-74-82>
 - Marshall H.S., Plotkin S. The changing epidemiology of mumps in a high vaccination era. *Lancet Infect. Dis.* 2019; 19(2): 118–9. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30541-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30541-3)
 - Ramanathan R., Voigt E.A., Kennedy R.B., Poland G.A. Knowledge gaps persist and hinder progress in eliminating mumps. *Vaccine*. 2018; 36(26): 3721–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.067>
 - СвободнаяПресса. Сачивко С. Подхватили заразу: В России начинается эпидемия кори; 2019. Available at: <https://svpressa.ru/health/article/225140/>
 - НД ЛП-005859-171019. ВАКТРИВИР Комбинированная вакцина против кори, краснухи и паротита культуральная живая.
 - Приказ МЗ РФ № 202 «О метрологической службе министерства здравоохранения российской федерации в сфере обращения лекарственных средств для медицинского применения». М.; 2020.
 - Вакцина для профилактики кори, паротита и краснухи (живая). Европейская фармаколея; 2019.
 - Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. Пер. с англ. М.: Практика; 1998.
 - Бинятова А.С., Юнасова Т.Н., Саркисян К.А., Давыдов Д.С., Ильясова Т.Н., Мовсесянц А.А. Мониторинг качества отечественных вакцин для профилактики кори. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2021; 20(2): 58–67. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-2-58-67>
 - Юнасова Т.Н., Бинятова А.С., Фадейкина О.В., Саркисян К.А., Мовсесянц А.А., Игнатъев Г.М. и др. Анализ качества отечественной вакцины для профилактики краснухи. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(2): 90–6. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-90-96>
 - Серия технических докладов ВОЗ № 840. Доклад 43; 1994. Available at: https://extranet.who.int/iris/restricted/bitstream/handle/10665/91309/WHO_TRS_840_part1_rus.pdf
 - evance of the unresolved measles problem. In: *XII International Student Scientific Conference Student Scientific Forum – 2020 [XII Mezhdunarodnaya studencheskaya nauchnaya konferentsiya Studencheskiy nauchnyy forum – 2020]*. Available at: <https://scienceforum.ru/2020/article/2018020442> (in Russian)
 - WHO. COVID-19 continues to disrupt essential health services in 90% of countries; 2021. Available at: <https://www.who.int/news/item/23-04-2021-covid-19-continues-to-disrupt-essential-health-services-in-90-of-countries>
 - RIA. WHO concerned about increased risk of measles outbreaks. Available at: <https://ria.ru/20211110/kor-1758475953.html> (in Russian)
 - Semenenko T.A., Nozdracheva A.V. Analysis and outlook for the development of measles epidemic situation during the Covid-19 pandemic. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2021; 20(5): 21–31. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-5-21-31> (in Russian)
 - The program «Elimination of measles and rubella in the Russian Federation» (2016-2020). Available at: https://www.rospotrebnadzor.ru/upload/iblock/bcf/programma_elyuminatsii_kori_i_krasnukhi_v_rf_2016_2020_gg.pdf (in Russian)
 - Dutchen S. *Inside Immune Amnesia*. Harvard: Harvard Medical School News & Research; 2019.
 - Mina M.J., Kula T., Leng Y., Li M., de Vries R.D., Knip M., et al. Measles virus infection diminishes preexisting antibodies that offer protection from other pathogens. *Science*. 2019; 366(6465): 599–606. <https://doi.org/10.1126/science.aay6485>
 - Petrova V.N., Sawatsky B., Han A.X., Laksono B.M., Walz L., Parker E., et al. Incomplete genetic reconstitution of B cell pools contributes to prolonged immunosuppression after measles. *Sci. Immunol.* 2019; 4(41): eaay6125. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aay6125>
 - ScienceNews. Sanders L. Measles erases the immune system's memory; 2019. Available at: <https://www.sciencenews.org/article/measles-immune-system-memory-infection>
 - CNN Health. Yeung J. Measles wipe immune system's memory of other illnesses, studies find. Available at: <https://edition.cnn.com/2019/11/01/health/measles-amnesia-study-intl-hnk-scli-scn/index.html>
 - Decree of the Government of the Russian Federation № 2390-R. Strategy for the development of immunoprophylaxis of infectious diseases for the period up to 2035. Moscow; 2020. (in Russian)
 - Naked Science. You don't have to blush: how rubella was defeated in Russia; 2020. Available at: <https://naked-science.ru/article/column/krasnet-ne-pridetsya-kak-v-rossii-pobedili-krasnuhu> (in Russian)
 - Semerikov V.V., Yuminova N.V., Postanogova N.O., Sofronova L.V., Kontarov N.A. Epidemic mumps in Russia: Epidemic situation, key challenges and solutions. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2019; 18(6): 75–80. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-6-75-80> (in Russian)
 - Connell A.R., Connell J., Leahy T.R., Hassan J. Mumps outbreaks in vaccinated populations – is it time to re-assess the clinical efficacy of vaccines? *Front. Immunol.* 2020; 11: 2089. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.02089>
 - Turaeva N.V., Frolov R.A., Tsvirkun O.V., Gerasimova A.G. Characteristics of the epidemiological situation of mumps in the world at the present stage. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2021; 20(2): 74–82. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-2-74-82> (in Russian)
 - Marshall H.S., Plotkin S. The changing epidemiology of mumps in a high vaccination era. *Lancet Infect. Dis.* 2019; 19(2): 118–9. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30541-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30541-3)
 - Ramanathan R., Voigt E.A., Kennedy R.B., Poland G.A. Knowledge gaps persist and hinder progress in eliminating mumps. *Vaccine*. 2018; 36(26): 3721–6. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.067>
 - SvobodnayaPressa. Sachivko S. Caught an infection: A measles epidemic begins in Russia. Available at: <https://svpressa.ru/health/article/225140/> (in Russian)
 - ND LP-005859-171019. ВАКТРИВИР Комбинированная вакцина против кори, краснухи и паротита культуральная живая. (in Russian)
 - Order of the Ministry of Health of the Russian Federation № 202 «On the Metrological Service of the Ministry of Health of the Russian Federation in the field of circulation of medicines for medical use». Moscow; 2020. (in Russian)
 - Vaccine for the prevention of measles, mumps and rubella (live). European Pharmacopoeia; 2019.
 - Glanz S.A. *Primer of Biostatistics*. New-York: McGraw-Hill; 1994.
 - Binyatova A.S., Yunasova T.N., Sarkisyan K.A., Davydov D.S., Il'yasova T.N., Movsesyants A.A. Monitoring the quality of domestic measles prevention vaccines. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika*. 2021; 20(2): 58–67. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2021-20-2-58-67> (in Russian)
 - Yunasova T.N., Binyatova A.S., Fadeykina O.V., Sarkisyan K.A., Movsesyants A.A., Ignat'ev G.M., et al. Analysis of the quality of national vaccine against rubella. *Voprosy virusologii*. 2018; 63(2): 90–6. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-90-96> (in Russian)
 - WHO technical report series № 840. Report 43; 1994. [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39048/WHO_TRS_840_\(part1\).pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39048/WHO_TRS_840_(part1).pdf)

REFERENCES

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-133>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Распространённость и молекулярно-генетическая характеристика вирусов парентеральных гепатитов В, С и D у ВИЧ-позитивных лиц в Новосибирской области

Карташов М.Ю.^{1,2}, Свирин К.А.¹, Кривошеина Е.И.¹, Чуб Е.В.¹, Терновой В.А.¹, Кочнева Г.В.¹¹ФБУН «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;²ФГБОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», 630090, Новосибирск, Россия

Введение. Вирусы парентеральных гепатитов В, С, D (ВГВ, ВГС, ВГD) и иммунодефицита человека (ВИЧ) характеризуются сходными путями передачи и группами риска, в которых повышена вероятность приобретения одновременно сразу двух и более из этих инфекций. Взаимное усугубление течения вирусных инфекций является важной проблемой, возникающей при коинфицировании ВИЧ-положительных пациентов парентеральными вирусными гепатитами.

Цель работы. Определение встречаемости и молекулярно-эпидемиологической характеристики генетических вариантов ВГВ, ВГС и ВГD, выявленных среди ВИЧ-положительных пациентов в Новосибирской области.

Материалы и методы. В 185 исследуемых пробах определяли наличие суммарных антител к ВГС, РНК ВГС, ДНК ВГВ и РНК ВГD. Положительные образцы генотипировали путём амплификации фрагмента гена *NS5b* для изолятов ВГС, гена *pol* для изолятов ВГВ и полногеномной последовательности для изолятов ВГD.

Результаты. Среди 185 исследуемых образцов суммарные антитела к ВГС были обнаружены в 51,9% (95% ДИ 44,7–58,9), РНК ВГС – в 32,9% (95% ДИ 26,6–39,5). Распределение генетического материала ВГС в различных половозрастных группах полностью повторяло распределение серологических маркеров. Инфицирование ВГС у ВИЧ-позитивных лиц имеет тенденцию к увеличению с возрастом. Распределение субгенотипов в изучаемой выборке изолятов ВГС имеет следующие особенности: 1b – 52,5%, 3a – 34,5%, 1a – 11,5%, 2a – 1,5%. 84,3% изолятов ВГС субгенотипа 1b имеют мутацию С316N, ассоциируемую с развитием резистентности к лечению софосбувиром и дацабувиром. Встречаемость ДНК ВГВ в исследуемых пробах составила 15,2% (95% ДИ 10,7–21,0). В одном изоляте ВГВ определена мутация М204I, связанная с устойчивостью к лечению ламивудином и телбивудином. Среди ВИЧ-/ВГВ-инфицированных пациентов обнаружено 2 изолята ВГD, относящихся к генотипу 1.

Заключение. Полученные данные подтверждают факт более широкого распространения инфицирования парентеральными вирусными гепатитами среди ВИЧ-позитивных лиц Новосибирской области по сравнению с условно здоровым населением. Генетическое разнообразие вариантов этих вирусов среди ВИЧ-инфицированных аналогично разнообразию, наблюдаемому в общей популяции.

Ключевые слова: коинфицирование; вирус гепатита В; вирус гепатита С; вирус гепатита D; ВИЧ; генотипирование; Новосибирская область

Для цитирования: Карташов М.Ю., Свирин К.А., Кривошеина Е.И., Чуб Е.В., Терновой В.А., Кочнева Г.В. Распространённость и молекулярно-генетическая характеристика вирусов парентеральных гепатитов В, С и D у ВИЧ-позитивных лиц в Новосибирской области. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(5): 423-438. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-133>

Для корреспонденции: Карташов Михаил Юрьевич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 630559, Новосибирская область, Кольцово, Россия. E-mail: mikkartash@yandex.ru

Участие авторов: Карташов М.Ю. – проведение экспериментальных исследований, обработка данных, написание текста; Свирин К.А. – проведение экспериментальных исследований; Кривошеина Е.И. – проведение экспериментальных исследований; Чуб Е.В. – организация и контроль проведения исследований; Терновой В.А. – общее редактирование статьи; Кочнева Г.В. – общее руководство, написание текста статьи.

Финансирование. Исследование проведено в рамках государственного задания ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора ГЗ-2/22 (№ 122040600156-3 в ЕГИСУ НИОКТР).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен решением этического комитета ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (протокол № 5 от 21.07.2022).

Поступила 27.07.2022

Принята в печать 16.09.2022

Опубликована 31.10.2022

ORIGINAL ARTICLE

https://doi.org/10.36233/0507-4088-133

Prevalence and molecular genetic characteristics of parenteral hepatitis B, C and D viruses in HIV positive persons in the Novosibirsk region

Mikhail Yu. Kartashov^{1,2}, Kirill A. Svirin¹, Ekaterina I. Krivosheina¹, Elena V. Chub¹, Vladimir A. Ternovoi¹, Galina V. Kochneva¹

¹State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector” of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 630559, Novosibirsk Region, Koltsovo, Russia;

²Novosibirsk National Research State University, 630090, Novosibirsk, Russia

Introduction. Parenteral viral hepatitis (B, C, D) and HIV share modes of transmission and risk groups, in which the probability of infection with two or more of these viruses simultaneously is increased. Mutual worsening of the course of viral infections is important issue that occurs when HIV positive patients are coinfecting with parenteral viral hepatitis. **The aim of the study** was to determine the prevalence of HCV, HBV and HDV in HIV positive patients in the Novosibirsk region and to give molecular genetic characteristics of their isolates.

Materials and methods. Total 185 blood samples were tested for the presence of total antibodies to HCV, HCV RNA, HBV DNA and HDV RNA. The identified isolates were genotyped by amplification of the NS5B gene fragment for HCV, the polymerase gene for HBV and whole genome for HDV.

Results. The total antibodies to HCV were detected in 51.9% (95% CI: 44.7–58.9), HCV RNA was detected in 32.9% (95% CI: 26.6–39.5) of 185 studied samples. The distribution of HCV RNA positive cases completely repeated the distribution of HCV serological markers in different sex and age groups. The number of HCV infected among HIV positive patients increases with age. HCV subgenotypes distribution was as follows: 1b (52.5%), 3a (34.5%), 1a (11.5%), 2a (1.5%). 84.3% of detected HCV 1b isolates had C316N mutation associated with resistance to sofosbuvir and dasabuvir. The prevalence of HBV DNA in the studied samples was 15.2% (95% CI: 10.7–21.0). M204I mutation associated with resistance to lamivudine and telbivudine was identified in one HBV isolate. Two HDV isolates that belonged to genotype 1 were detected in HIV/HBV coinfecting patients.

Conclusion. The data obtained confirm the higher prevalence of infection with parenteral viral hepatitis among people living with HIV in the Novosibirsk region compared to the general population of that region. The genetic diversity of these viruses among HIV infected individuals is similar to that observed in the general population.

Keywords: coinfection; hepatitis B virus; hepatitis C virus; hepatitis D virus; HIV; genotyping, Novosibirsk region

For citation: Kartashov M.Yu., Svirin K.A., Krivosheina E.I., Chub E.V., Ternovoi V.A., Kochneva G.V. Prevalence and molecular genetic characteristics of parenteral hepatitis B, C and D viruses in HIV positive persons in the Novosibirsk region. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(5): 423–438 (In Russ.). DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-133

For correspondence: Mikhail Yu. Kartashov, Ph.D. (Biol.), Senior Researcher, State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector” of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), 630559, Novosibirsk Region, Koltsovo, Russia. E-mail: mikkartash@yandex.ru

Information about the authors:

Kartashov M.Yu., https://orcid.org/0000-0002-7857-6822

Svirin K.A., https://orcid.org/0000-0001-9083-1649

Krivosheina E.I., https://orcid.org/0000-0001-5181-0415

Chub E.V., https://orcid.org/0000-0003-1521-897X

Ternovoi V.A., https://orcid.org/0000-0003-1275-171X

Kochneva G.V., http://orcid.org/0000-0002-2420-0483

Contribution: Kartashov M.Yu. – performing the experiments, data analysis and interpretation, text preparation and editing; Svirin K.A. – performing the experiments; Krivosheina E.I. – performing the experiments; Chub E.V. – organization and control of research; Ternovoi V.A. – research management; Kochneva G.V. – general guidance, text preparation and editing.

Funding. This study was performed as part of state assignment State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector” of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор) GZ-2/22 (No. 122040600156-3 in EGISU R&D).

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

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the study participants. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector” of the Federal Service for Surveillance of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор) (Protocol No. 5 dated July 5, 2022).

Received 27 July 2022

Accepted 16 September 2022

Published 31 October 2022

Введение

Эпидемиологическая ситуация по ВИЧ-инфекции (вирус иммунодефицита человека) в Российской Федерации продолжает оставаться напряжённой. Наиболее неблагоприятная обстановка наблюдается в ряде регионов Сибири, в том числе в Новосибирской области, где в 2021 г. показатель поражённости ВИЧ-инфекцией составил 1373,1 на 100 тыс. населения при среднем по России 782,0 на 100 тыс. населения (согласно государственному докладу «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 г.»). Вирусы гепатита В (ВГВ) и С (ВГС) характеризуются сходными с ВИЧ путями передачи: через кровь, при половом контакте и вертикально от матери к ребёнку. Данные инфекции имеют схожие группы риска, в которых повышена вероятность приобретения одновременно сразу нескольких вирусов (коинфицирование). Взаимное усугубление течения вирусных инфекций, возникающее при коинфицировании ВИЧ-положительных пациентов парентеральными вирусными гепатитами, достаточно широко описано в литературе и является важной проблемой здравоохранения. Среди ВИЧ-инфицированных лиц, проживающих на территории Российской Федерации, одной из наиболее распространённых форм вирусного гепатита является хронический гепатит С. Показан более высокий уровень Т-клеточной активации у пациентов с сочетанной ВГС-/ВИЧ-инфекцией по сравнению с моноинфицированными ВИЧ [1, 2]. Хроническая иммунная активация может стать причиной иммунной дисфункции и продукции цитокинов, вызывая усиление репликации ВИЧ, ВГС и снижение уровней Т-клеток [2]. Истощение CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток приводит к вирусной персистенции и переходу заболевания из острой стадии в хроническую [3]. Вероятность спонтанной элиминации ВГС при коинфицировании с ВИЧ снижается почти до нуля, скорость перехода заболевания из острой в хроническую стадию увеличивается, а тяжесть поражения печени, интенсивность фиброза, вероятность возникновения цирроза печени и развития гепатоцеллюлярной карциномы возрастают в 3–5 раз [4, 5]. При коинфекции ВГВ/ВИЧ также наблюдаются повышение интенсивности размножения ВГВ и ускоренные темпы прогрессирования заболевания печени (более высокие показатели фиброза), чем при моноинфицировании [6]. Имеются данные, что гликопротеины ВИЧ стимулируют гепатоциты к экспрессии TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), что индуцирует апоптоз гепатоцитов посредством активации каспазы 8 [7, 8]. Кроме того, gp120 ВИЧ стимулирует секрецию гепатоцитами интерлейкина-8 (IL-8), играющего ключевую роль в поддержании воспалительного процесса в печени и развитии гепатоцеллюлярной карциномы [9]. Повышать уровень IL-8 может и белок X ВГВ путём активации экспрессии IL-8 через NF-κB (транскрипционный ядерный фактор каппа В) и С/ЕВР-подобные (ССАТ (Cytidine-Cytidine-Adenosine-Adenosine-Thymidine) /

enhancer binding proteins – цитидин-цитидин-аденозин-аденозин-тимидин / энхансер-связывающие белки) цис-элементы. Белок X ВГВ также способен стимулировать наработку циклооксигеназы-2, гиперэкспрессия которой наблюдается при циррозе печени [10, 11]. Ещё одной гипотезой утяжеления поражения печени при ВГВ-/ВИЧ-коинфицировании является истощение пула CD4⁺ Т-клеток в желудочно-кишечном тракте, что способствует увеличению микробной обсеменённости и повышению уровня циркулирующих липополисахаридов, которые способны связываться с Toll-подобным рецептором 4-го типа и индуцировать секрецию провоспалительных цитокинов через путь NF-κB [12, 13].

В мире насчитывается примерно 4–5 млн человек, одновременно инфицированных ВИЧ и ВГС, что является большой проблемой для здравоохранения [14]. Среди ВИЧ-положительных лиц ВГС обнаруживается у 20–30% в США и примерно у 34% в Европе, однако уровень коинфицирования в группе потребителей инъекционных наркотиков может достигать 50–70% и более. При этом вследствие низкой эффективности передачи ВГС половым путём коинфицирование ВГС среди ВИЧ-положительных гомосексуальных лиц составляет 4–8% [15, 16].

Среди 40 млн ВИЧ-инфицированных пациентов во всём мире 2–4 млн инфицированы ВГВ. Основной путь коинфицирования ВИЧ/ВГВ в Америке и Европе реализуется через половые контакты (как гомо-, так и гетеросексуальные), а также при употреблении наркотиков. В странах Азии и Африки к югу от Сахары основным путём передачи ВГВ является вертикальный от матери к новорождённому. Имеются данные о том, что в ряде стран региона около 90% ВИЧ-положительных лиц коинфицированы ВГВ, в то время как в среднем по миру хроническая инфекция ВГВ выявляется у 5–15% больных ВИЧ. Для ВГВ критичным является возраст инфицирования, поскольку заражение при рождении или в раннем детстве ведёт к персистенции ВГВ-инфекции в 50–90% случаях [15, 16].

Суперинфицирование вирусом гепатита D (ВГД) при хроническом гепатите В, как правило, ускоряет развитие более тяжёлого поражения печени вплоть до выраженного фиброза в любом возрасте у 70–90% людей. Наблюдения за пациентами, инфицированными ВГД, показали, что у пациентов с активным хроническим гепатитом В с дельта-инфекцией быстрее развивается цирроз печени и формируется гепатоцеллюлярная карцинома, несмотря на то что ВГД подавляет репликацию ВГВ.

Актуализация данных по генотипическому разнообразию изолятов ВГВ, ВГС и ВГД позволяет отслеживать пути передачи, появление и распространение на территории Российской Федерации новых вариантов вирусов. Это, в свою очередь, позволяет своевременно планировать необходимые санитарно-эпидемиологические мероприятия. Изучение разнообразия и генетических характеристик изолятов ВГВ, ВГС и ВГД является основой диагностики и персонализированной терапии вирусных гепатитов. Разные со-

четания коинфекции ВИЧ с парентеральными гепатитами влияют на клинические проявления и течение болезни, снижают эффективность терапии и ухудшают прогноз заболевания, поэтому распространение и генетическое разнообразие парентеральных вирусных гепатитов среди ВИЧ-инфицированных пациентов являются актуальной задачей.

Цель данной работы состоит в определении встречаемости и молекулярно-эпидемиологической характеристики генетических вариантов ВГС, ВГВ и ВГД, выявленных среди ВИЧ-положительных пациентов Новосибирской области.

Материалы и методы

Исследование проведено на 185 образцах сывороток / плазмы крови от ВИЧ-инфицированных пациентов, проживающих на территории Новосибирской области, среди которых было 96 мужчин (51,9%; 95% доверительный интервал (ДИ) 44,7–58,4%) и 89 женщин (48,1%; 95% ДИ 41,8–56,2). Средний возраст обследованных равен 38,6 года (95% ДИ 36,4–39,6). Все пациенты были зарегистрированы в региональном Центре по профилактике и борьбе со СПИД с диагнозом «ВИЧ-инфекция» (диагноз ВИЧ-инфекции подтверждён в иммунном блоттинге при положительных результатах иммуноферментного анализа и определении уровня рибонуклеиновой кислоты (РНК) ВИЧ-1). Поскольку большинство исследований коинфицирования ВИЧ с вирусами парентеральных гепатитов проводится на группе потребителей инъекционных наркотиков, то в данной работе сформирована сплошная выборка ВИЧ-инфицированных пациентов путём использования генератора случайных чисел¹ из общей лабораторной базы. Обследуемые лица разделены на 5 возрастных групп, размер которых прямо пропорционален их представленности в генеральной совокупности ВИЧ-инфицированных, зарегистрированных в региональном Центре по профилактике и борьбе со СПИД. Исследование проведено с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с «Основными законами Российской Федерации об охране здоровья граждан», у всех пациентов получено добровольное информированное согласие. Протокол исследования одобрен решением этического комитета ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (протокол № 5 от 21.07.2022).

Определение наличия серологических маркеров ВГС (суммарных антител к ВГС) проводили иммуноферментным анализом с использованием набора «Бест анти-ВГС» («Вектор-Бест», Россия). Выделение нуклеиновых кислот проводили с использованием коммерческого набора «АмплиПрайм РИБО-преп» («НексБио», Россия), получение комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК) в реакции обратной транскрипции выполнялось с помощью

коммерческого набора «РЕВЕРТА-L» («АмплиСенс», Россия) согласно инструкциям производителей. Образцы анализировали на наличие генетического материала ВГС, ВГВ и ВГД методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени с использованием наборов реагентов HCV-FL, HBV-FL и HDV-FL («АмплиСенс», Россия). Выявленные положительные образцы изолятов ВГС генотипировали путём амплификации фрагмента гена *NS5b* (около 380 пар нуклеотидов) в двухраундовой ПЦР с последующим определением нуклеотидной последовательности ампликонов методом Сенгера. Изоляты ВГВ, выявленные на скрининге, были генотипированы путём секвенирования гена *pol* (около 1200 пар нуклеотидов). Для выявленных изолятов ВГД проведено определение полногеномных последовательностей. Праймеры, используемые в данной работе, координаты амплифицируемых участков генома и температуры отжига представлены в **табл. 1**.

Секвенирование очищенных ампликонов проводили с использованием набора реагентов Big-Dye Terminator v3.1 на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, США). Анализ полученных хроматограмм проводили с помощью программы SeqMan (DNASTAR, США). Филогенетический анализ проводили с помощью пакета филогенетических программ MEGA X [16] методом максимального правдоподобия с использованием трёхпараметрической модели эволюции Тамуры T92. Показатели статистической надёжности узлов филогенетического дерева рассчитывались с помощью бутстреп-анализа с использованием 500 случайных реплик.

Анализ на наличие мутаций резистентности для изучаемого фрагмента NS5b региона изолятов ВГС проводили по следующим позициям: S282T (для 1a, 1b, 2a, 3a), C316H/N/Y (1a, 1b), V321I (2a). Резистентность изолятов ВГВ оценивали по наличию мутаций A181T, N236T (для адефовира и тенофовира), I169T, V173L, L180M, A181T, T184G, S202I, M204V/I, M250V (для ламивудина и энтекавира).

Для статистической обработки использовали стандартные методы описательной статистики с применением пакета программ Statistica 12.6 (StatSoft, США). Средние значения оценивали с учетом 95% ДИ по методу Клоппера–Пирсона.

Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в международную базу GenBank под номерами ON814585 – ON814645 (фрагмент гена *NS5b* изолятов ВГС), ON814646 – ON814673 (фрагмент гена *pol* изолятов ВГВ), MW556198 – MW556199 (полногеномные последовательности изолятов ВГД).

Результаты

Среди 185 исследуемых образцов крови ВИЧ-инфицированных лиц суммарные антитела к ВГС были обнаружены в 51,9% (95% ДИ 44,7–58,9), уровень обнаружения генетического материала ВГС составил 32,9% (95% ДИ 26,6–39,5), при этом РНК ВГС ожидаемо обнаруживалась только среди пациентов,

¹Рандомайзер для чисел и другие сервисы. Режим доступа: <https://randomus.ru/>.

Таблица 1. Используемые в работе праймеры

Table 1. Primers used in the study

Агент (мишень) Agent (target)	Праймер Primer	Структура праймера (5'→3') Primer sequence (5'→3')	Позиция в референс-геноме* Position in the reference genome*	Температура отжига, °C Annealing temperature, °C
HCV (NS5B)	R52	TGGGSTTCYCRTATGATACCCGCTGCTTTGA	8056-8087	55
	R54	GCCAGAGTACCTRGTCATAGCCTCCGTGAA	8662-8632	
	R53	GCTGYTTTGACTCMACRGTCCTG	8147-8171	55
	R55	CTRGTCATAGCCTCCGTGAAGYCTC	8527-8502	
HBV (Pol/RT)	Pol_F	CTGCTGGTGGCTCCAGTT	1354-1371	56
	Pol_R	GCTAGGAGTTCGCGCAGTATGG	2583-2563	
HDV	HDV-57F	GAGAAMYCACCTCCAGAGGA	299-318	56
	HDV-58R	CGTCCACTCGGATGGCTA	842-825	
	HDV-63F	TCGGTAATGGCGAATGGGR	752-770	56
	HDV-08R	GGAAGGCCCTCGAGAACAAG	770-754	
	HDV-69F	AGTTCCTCTTCTCCTCCYTGTCT	1212-1234	56
	HDV-46R	AAGGGGTCTCTGGAGGTG	324-306	
	HDV-74F	AGSTCCCTCTCGAGTTCCTC	1500-1519	56
	HDV-54R	CCGGGATAAGCCTCACTCG	485-467	

Примечание. *Позиция генома для HCV указана для референса EU155342; позиция генома для HBV указана для референса MW999678; позиция генома для HDV указана для референса NC001653.

Note. *Genome positions for HCV are indicated for reference EU155342; the genome positions for HBV are indicated for reference MW999678; the genome positions for HDV are indicated for reference NC001653.

положительных на присутствие серологических маркеров ВГС. Обнаружение, помимо антител к ВГС, и самой РНК свидетельствует о наличии активной репликации вируса и развитии хронического гепатита С. Распределение генетического материала ВГС в различных возрастных группах полностью повторяет распределение серологических маркеров. Инфицирование ВГС (по наличию РНК ВГС) у ВИЧ-положительных лиц имеет тенденцию к увеличению с возрастом: в группе до 30 лет встречаемость коинфицирования ВИЧ/ВГС составила 18,7% (95% ДИ 6,6–43,0); в группе 30–35 лет – 29,4% (95% ДИ 16,8–46,1); в группе 35–40 лет – 36,4% (95% ДИ 24,9–49,5); в группе старше 40 лет – 35,1% (95% ДИ 25,5–45,9) (рис. 1).

Филогенетический анализ показал, что доминирующими субгенотипами ВГС в изучаемой выборке ВИЧ-инфицированных в Новосибирской области являются 1b (52,5%) и 3a (34,5%), с меньшей частотой встречаются субгенотипы 1a (11,5%) и 2a (1,5%) (рис. 2 и 3). Проведённый нами статистический анализ не выявил различий в распределении генотипов между обследованными мужчинами и женщинами. Анализ мутаций резистентности к препаратам прямого противовирусного действия среди выявленных изолятов ВГС показал, что 27 вариантов субгенотипа 1b обладают мутацией С316N в NS5b, ассоциированной с развитием лекарственной устойчивости к лечению софосбувиром и дацабувиром. Таким образом, доля резистентных к лечению препаратами

прямого противовирусного действия изолятов субгенотипа 1b в исследуемой популяции чрезвычайно высока и составляет 84,3%. Среди изолятов, относящихся к субгенотипам 1a, 2a и 3a, мутаций резистентности выявлено не было, но стоит отметить, что анализ проводился по фрагменту гена NS5b, в который часть известных мутационных позиций нуклеотидов не входит.

ДНК ВГВ была обнаружена в 15,2% (95% ДИ 10,7–21,0) исследуемых проб. Из 28 выявленных изолятов ВГВ 27 относятся к субгенотипу D2, один – к субгенотипу D3 (рис. 4). По аналогии с ВГС инфицирование ВГВ у ВИЧ-положительных лиц имеет тенденцию к увеличению с возрастом: в группе до 30 лет встречаемость коинфицирования ВГВ/ВИЧ составила 6,3% (95% ДИ 1,2–28,3), 30–35 лет – 14,7% (95% ДИ 6,5–30,1), 35–40 лет – 14,5% (95% ДИ 7,6–26,1), старше 40 лет – 17,5% (95% ДИ 10,7–27,2) (рис. 1). Статистически значимых различий встречаемости коинфицирования ВГВ/ВИЧ у мужчин и женщин не выявлено. Анализ на наличие мутаций резистентности показал, что один изолят имеет мутацию M204I, ассоциированную с устойчивостью к лечению ламивудином и телбивудином.

Среди ВИЧ-/ВГВ-инфицированных пациентов обнаружено 2 изолята ВГД, которые при филогенетическом анализе были отнесены к генотипу 1 (рис. 5). Уровень инфицированности ВГД составил 1,1% (95% ДИ 0,3–3,8) среди общей выборки и 7,1% (95%

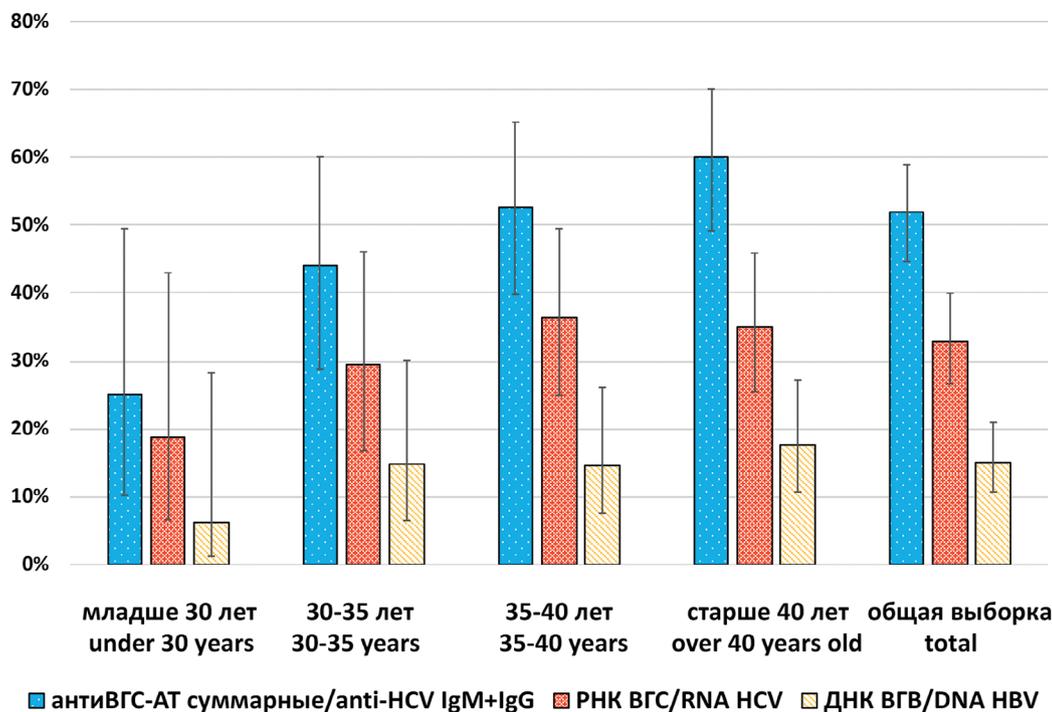


Рис. 1. Распределение маркеров вируса гепатита В и С среди различных возрастных групп ВИЧ-инфицированных лиц.
Fig. 1. Distribution of HBV and HCV markers among different age groups of HIV infected persons.

ДИ 2,1–22,6) среди ВИЧ-/ВГВ-инфицированных. В обоих случаях изоляты ВГД были определены у мужчин старше 40 лет.

У трех из обследуемых пациентов (1,6%; 95% ДИ 0,6–4,6) было обнаружено коинфицирование ВГВ/ВГС/ВИЧ, у одного из них определялась и РНК ВГД. Эти три пациента относились к группе мужчин старше 40 лет, причём у всех был выявлен субгенотип ВГС 3а.

Обсуждение

Встречаемость как серологических маркеров ВГС-инфекции, так и генетического материала ВГС среди ВИЧ-инфицированных пациентов Новосибирской области значительно (в 25–30 раз) превышает аналогичные показатели среди условно здорового населения России и сопредельных стран (табл. 2) [17–25]. Наибольшее количество информации о распространённости маркеров ВГС, согласно литературным данным, приводится для группы потребителей инъекционных наркотиков, являющихся основной группой риска инфицирования ВГС. Полученные данные показывают, что в сплошной когорте ВИЧ-инфицированных Новосибирской области распространение ВГС-инфекции всё же ниже, чем у потребителей инъекционных наркотиков в других регионах России (данные наиболее близки к ситуации, сложившейся в Алтайском крае – соседнем с Новосибирской областью регионе). Полученные данные, возможно, связаны с наблюдаемой тенденцией к преобладанию по-

лового пути передачи ВИЧ-инфекции и постепенной замене потребления инъекционных наркотиков на синтетические курительные смеси, спайсы [17].

Филогенетический анализ выявленных генетических вариантов ВГС у ВИЧ-позитивных лиц Новосибирской области показывает, что они хорошо кластеризуются с ранее обнаруженными вариантами, циркулирующими в различных регионах России (прежде всего Западной Сибири) среди населения без ВИЧ-инфекции. Уровень гомологии геновариантов генотипа 1 с прототипными изолятами составил 90–95%, генотипа 2 – 94–95%, генотипа 3 – 91–92%. Однако выделяются 7 вариантов субгенотипа 1а (ON814585 – ON814591), образующих на филодендрограмме отдельную кладу и имеющих гораздо меньшую степень гомологии с прототипными российскими изолятами.

Определение генотипа ВГС имеет немаловажное значение при проведении противовирусной терапии с использованием пролонгированных форм интерферона-α (α2а, α2b) в сочетании с рибавирином. Известно, что генотип является одним из важнейших прогностических факторов устойчивого вирусологического ответа [27]. При лечении пациентов, имеющих генотип 1 ВГС, устойчивый вирусологический ответ достигается в 55% случаев, тогда как у лиц с генотипом 2 или 3 – более чем в 80%. Вопросы, касающиеся влияния генотипа ВГС на тяжесть течения инфекции гепатита С, скорость развития заболевания и успех трансплантации печени, остаются не до конца выясненными. Представители всех генотипов и субтипов

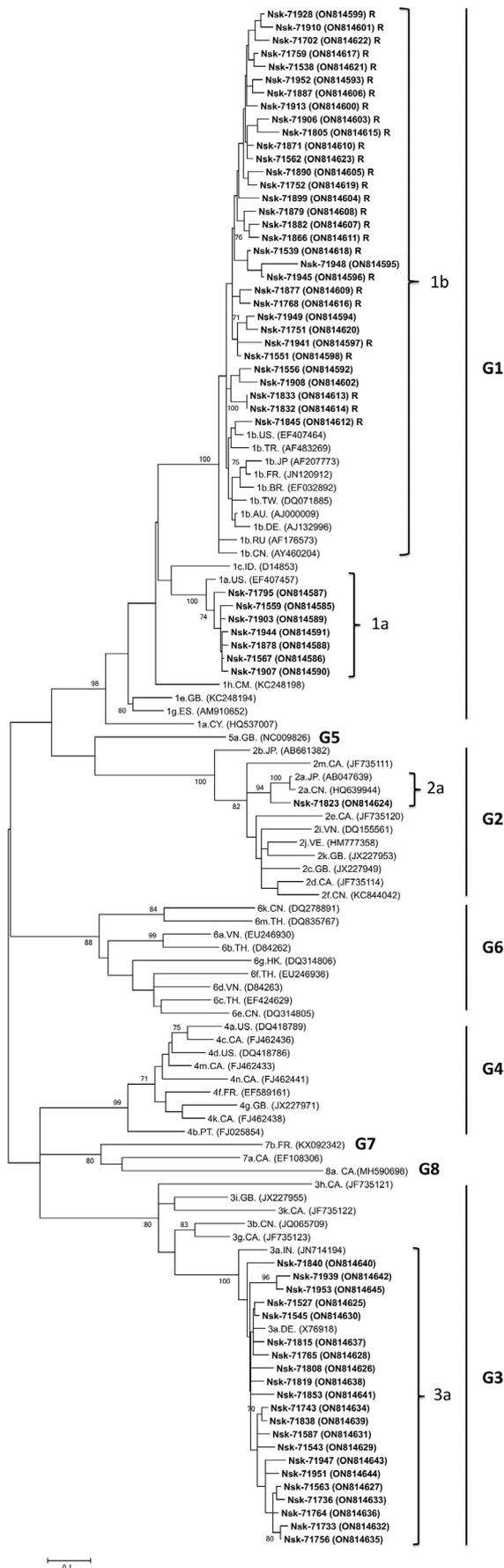


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия, для нуклеотидных последовательностей фрагментов гена *NS5b* вируса гепатита С (380 нуклеотидов) геновариантов вируса гепатита С, полученных от ВИЧ-инфицированных пациентов Новосибирской области (отмечены жирным шрифтом и шифром Nsk); буквой R обозначены варианты ВГС, имеющие мутацию С316N, ассоциированную с развитием резистентности к лечению ингибиторами *NS5b* (софосбувир, дацабувир).

Fig. 2. Phylogenetic tree constructed by the maximum-likelihood method for the nucleotide sequences of HCV NS5b gene fragments (380 nt) of HCV isolates obtained from HIV infected persons from the Novosibirsk region (marked in bold type and code Nsk). The letter R marks HCV variants with the C316N mutation associated with resistance to treatment with NS5b inhibitors (sofosbuvir, dactabuvir).

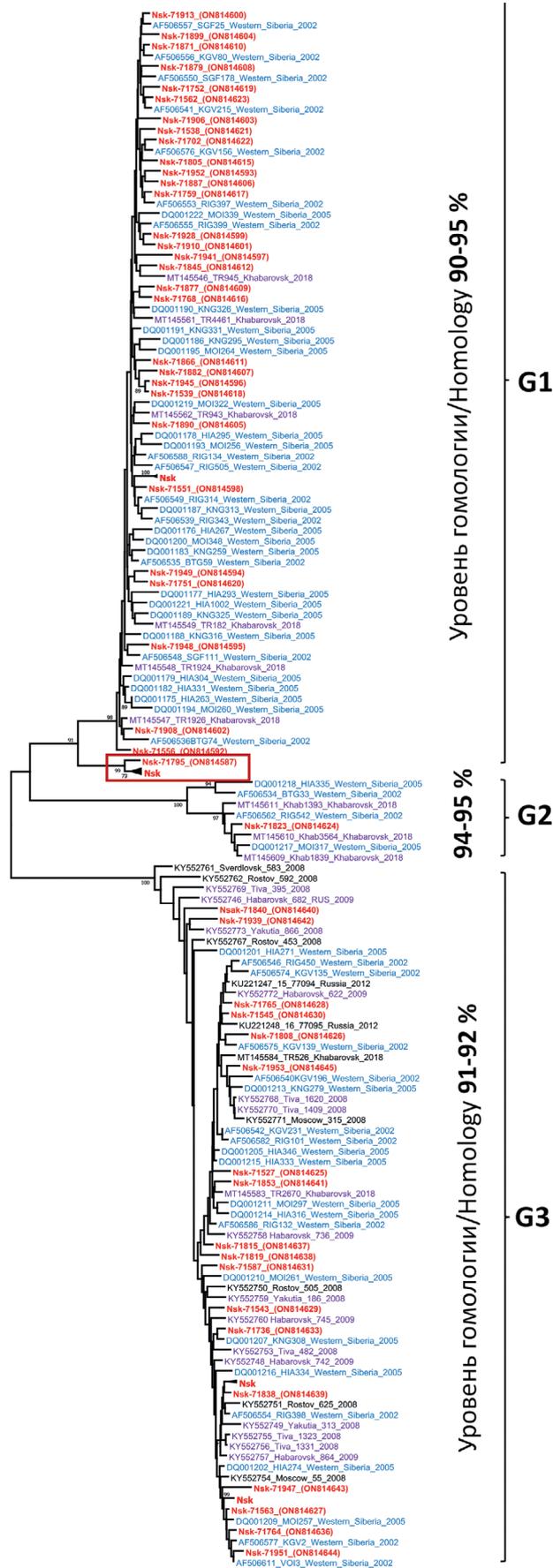


Рис. 3. Филогенетический анализ изучаемых нуклеотидных последовательностей фрагментов гена *NS5b* вируса гепатита С (265 нуклеотидов) геновариантов вируса гепатита С, полученных от ВИЧ-инфицированных пациентов Новосибирской области (отмечены красным жирным шрифтом и шифром Nsk) с ранее циркулирующими вариантами вируса гепатита С на территории России и сопредельных стран: синим цветом обозначены варианты вируса гепатита С, циркулирующие на территории Западной Сибири; фиолетовым – варианты вируса гепатита С, циркулирующие на территории Восточной Сибири и Дальнего Востока; красным прямоугольником выделены варианты субгенотипа 1a, кластеризующиеся в отдельную кладу.

Fig. 3. Phylogenetic analysis of the studied nucleotide sequences of HCV NS5b gene fragments (265 nt) of HCV isolates obtained from HIV infected patients from the Novosibirsk region (marked in red bold type and code Nsk) with HCV variants that previously circulated in Russia and neighboring countries. Blue color indicates HCV variants circulating in Western Siberia; purple color indicates HCV variants circulating in Eastern Siberia and the Far East. Variants of subgenotype 1a, clustered into a separate clade, are marked with a red rectangle.

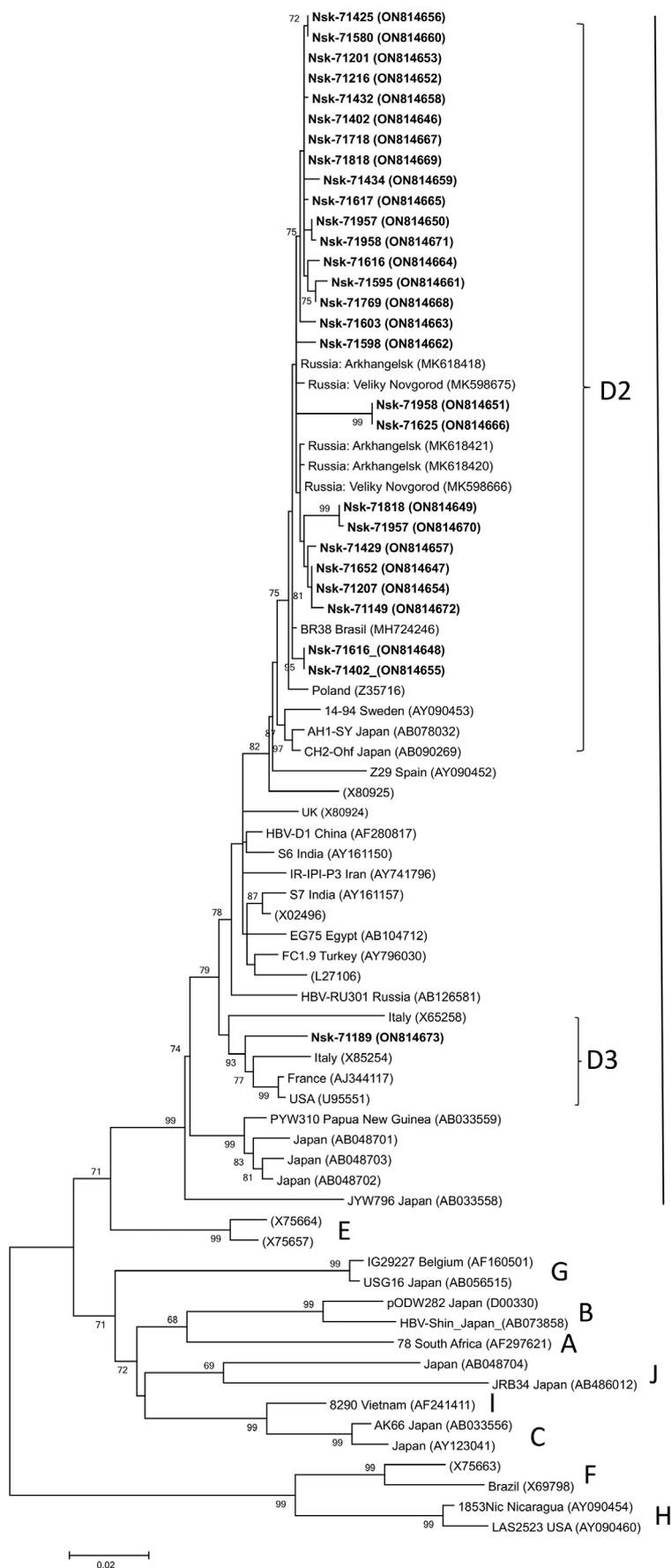


Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия, для нуклеотидных последовательностей фрагментов гена *pol* вируса гепатита В (1200 нуклеотидов) изолятов вируса гепатита В, полученных от ВИЧ-инфицированных пациентов Новосибирской области (отмечены жирным шрифтом и шифром Nsk).

Fig. 4. Phylogenetic tree constructed by the maximum-likelihood method for the nucleotide sequences of HBV *pol* gene fragments (1200 nt) of HBV isolates obtained from HIV infected persons from the Novosibirsk region (marked in bold type and code Nsk).

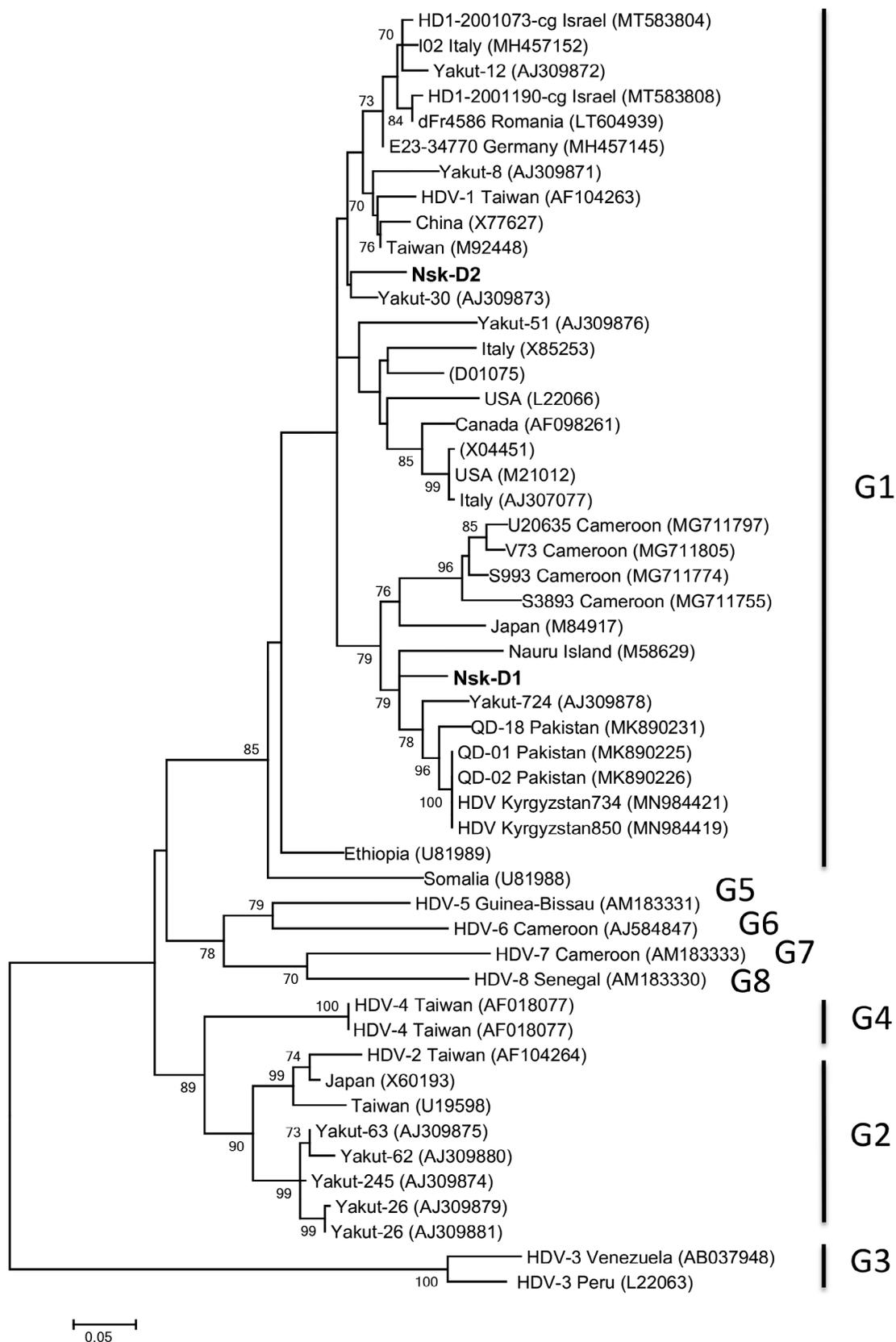


Рис. 5. Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия, для полногеномных нуклеотидных последовательностей изолятов ВГД (Nsk_D1 и Nsk_D2), полученных от ВИЧ-инфицированных пациентов Новосибирской области.

Fig. 5. Phylogenetic tree constructed by the maximum likelihood method for complete genome nucleotide sequences of HDV isolates (Nsk-D1 and Nsk-D2) obtained from HIV infected persons from the Novosibirsk region.

Таблица 2. Встречаемость маркеров вируса гепатита С среди разных групп населения в различных регионах России и сопредельных странах

Table 2. Prevalence of HCV markers among different population groups in different regions of Russia and neighboring countries

Исследуемая выборка Study sample	Регион / страна Region / country	Встречаемость маркеров вируса гепатита С, % Prevalence of HCV markers, %		Год исследования Year of research	Источник Reference		
		Суммарные антитела к вирусу гепатита С Total anti-HCV	РНК вируса гепатита С RNA HCV				
Сплошная выборка (условно здоровое население) Conditionally healthy population	Московская область Moscow region	1,7	0,9	2017	[18]		
	Ростовская область Rostov region	2,1	1,3				
	Свердловская область Sverdlovsk region	3	0,6				
	Республика Саха (Якутия) The Republic of Sakha (Yakutia)	3,3	1,2				
	Республика Тыва Tuva Republic	3,3	1,3				
	Россия Russia	2,2	-				
	Узбекистан Uzbekistan	4,1	-			2019	[19]
	Молдова Moldova	2,7	-			2007	[20]
	Беларусь Belarus	1,26	-				
	Беларусь Belarus	2	-				
Потребители инъекционных наркотиков Injecting drug users	Украина Ukraine	5	-	2021	[21]		
	Московская область Moscow region	68	-	2006	[22]		
	Волгоградская область Volgograd region	70	-				
	Алтайский край Altai region	54	-				
	Санкт-Петербург St. Petersburg	98,9	-			2016	[23]
	Тольятти Togliatti	93	-			2005	[24]
Россия Russia	79,6	56,2	2002			[25]	
Потребители инъекционных наркотиков с ВИЧ-инфекцией	Восточная Европа и Центральная Азия Eastern Europe and Central Asia	10–96	-	2007	[26]		
	Западная Европа Western Europe	2–93	-				
	Юго-Восточная Азия South-East Asia	10–100	-				
	Северная Африка и Ближний Восток North Africa and the Middle-East	5–60	-				
	Северная Америка North America	8–90	-				
ВИЧ-позитивные лица	Новосибирская область Novosibirsk region	51,9	32,9	2021–2022	Данное исследование		

ВГС являются гепатотропными, могут вызывать развитие хронической инфекции, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы. Однако в ряде исследований было показано, что субгенотип 1b может быть связан с более тяжёлым течением гепатита, быстрым развитием декомпенсированной стадии заболевания, тре-

бующей трансплантации печени [28]. Генотип 3 ассоциируют с более быстрым прогрессированием фиброза [29], а также с развитием стеатоза (жирового гепатоза) вне зависимости от индекса массы тела пациента [30]. Распределение генотипов также связано с различными путями передачи инфекции. Традици-

онно субгенотипы 1a и 3a связывают с употреблением наркотиков, в то время как субгенотип 1b чаще передаётся с продуктами крови посредством медицинских процедур [31]. Интенсивное распространение субгенотипа 3a в нашей стране связывают с его проникновением в среду инъекционных наркоманов в 1980-е гг. из стран Центральной и Юго-Восточной Азии. Распределение генотипов среди ВИЧ-инфицированных лиц Новосибирской области сопоставимо с распределением генотипов ВГС в клинических образцах, собранных в 2005–2014 гг. в Новосибирске [32], однако доля субгенотипов 1a и 3a у ВИЧ-позитивных ожидаемо выше, чем в среднем в популяции.

В последние годы стали доступны высокоэффективные препараты прямого противовирусного действия (ПППД), мишенями которых являются белки ВГС, играющие ключевые роли в жизненном цикле вируса. ПППД демонстрируют высокую эффективность, хорошую переносимость пациентами, снижение взаимодействия с другими лекарственными препаратами, сокращение курса лечения, многие из них эффективны в отношении разных генотипов, т. е. являются пангенотипными [33–35]. Однако на сегодняшний день известно, что в генах ВГС, отвечающих за синтез белков, являющихся мишенями ПППД, встречаются мутации, повышающие устойчивость вируса к этиотропной терапии. В настоящее время описано множество мутаций, которые в той или иной степени влияют на устойчивость к конкретному ПППД [36, 37]. В нашем исследовании показано, что 84,3% изолятов мажорного субгенотипа 1b, имеющего наихудшую прогностическую значимость в клиническом течении инфекции, обладают также и мутацией С316N, ассоциированной с развитием резистентности к таким препаратам, как софосбувир [38, 39] и дацабувир [40, 41]. Важно отметить особую значимость софосбувира, который является препаратом выбора для лечения гепатита С у людей, живущих с ВИЧ. У него минимальное количество нежелательных взаимодействий с антиретровирусной терапией, которую принимают люди с ВИЧ, и схемы с использованием софосбувира для них входят в число предпочтительных [42]. В ранее проведённых исследованиях показано, что мутация С316N является наиболее часто встречаемой (56%; 95% ДИ 33,2–76,9) среди пациентов, инфицированных субгенотипом 1b с неудачным опытом терапии софосбувиром [43]. Следует отметить, что определяемый в исследовании фрагмент *NS5b* региона не покрывает ряд других мутаций резистентности к ПППД, таких как V411S (для 1b), M414I/V (1a, 1b), R422K (1a, 1b), M423I/T/V (1a, 1b), что актуализирует продолжение исследования.

Распространённость РНК ВГВ среди ВИЧ-позитивных лиц Новосибирской области также оказалась более высокой по сравнению с условно здоровым населением России даже таких гиперэндемичных регионов, как республики Саха (Якутия) и Тыва. Полученные по Новосибирской области результаты соотносятся с литературными данными, согласно которым в группе ВИЧ-позитивных пациентов ДНК ВГВ вы-

являлась с частотой от 10–11,3 [44, 45] до 16,7–31,5% [46, 47]. В Российской Федерации распространены генотипы А, С и D ВГВ с доминированием генотипа D в большинстве регионов. Разные генотипы ВГВ отличаются резистентностью к противовирусным препаратам, подверженностью мутациям, риском хронизации и темпами прогрессирования поражения печени. Гепатит В, вызванный генотипом А, чаще принимает хроническое течение и имеет больший риск трансформации в цирроз печени и гепатоцеллюлярную карциному по сравнению с генотипом D. Доказано, что генотип С связан с более тяжёлым течением болезни и, вероятно, ведёт к развитию гепатокарциномы через стадию цирроза в более старшем возрасте, в то время как генотип В связан с развитием гепатокарциномы в раннем возрасте.

Для лечения хронического гепатита В широко используются аналоги нуклеозидов/нуклеотидов, такие как ламивудин, телбивудин, адефовир, энтекавир, однако обнаруживаются варианты ВГВ, проявляющие устойчивость к данным препаратам. Мутации устойчивости определяются прежде всего заменами в высоко консервативном мотиве «тирозин – метионин – аспарагиновая кислота – аспарагиновая кислота» (YMDD) С-домена полимеразы ВГВ (в положении 203–206). Наиболее часто встречаются замены метионина на валин в 204-м положении обратной транскриптазы (M204V) либо метионина на изолейцин (M204I) [48]. Сведения о вариантах ВГВ, несущих мутации в гене полимеразы среди ВГВ-/ВИЧ-коинфицированных пациентов, малочисленны, что обуславливает актуальность изучения циркуляции лекарственно-устойчивых вариантов ВГВ среди этой группы населения. Раннее определение изолятов ВГВ с мутациями в гене полимеразы, ассоциированных с развитием лекарственной устойчивости, имеет важное клиническое значение прежде всего для предупреждения обострения заболевания. Для пациентов с высоким риском прогрессирования гепатита В, к которым можно отнести ВИЧ-/ВГВ-инфицированных, раннее выявление таких вариантов ВГВ наиболее значимо как до начала применения нуклеозидных аналогов, так и в процессе лечения, когда вирусная нагрузка может быть очень низкой и (или) мутантные варианты ВГВ присутствуют в общей вирусной популяции в меньшей доле.

Среди исследуемых нами изолятов ВГВ от ВИЧ-инфицированных лиц, проживающих в Новосибирской области, в одном варианте обнаружена мутация M204I, связанная с развитием невосприимчивости к ламивудину, энтекавиру, телбивудину и тенофовиру. Следует сказать, что мутации в полимеразе, к которым относится и обнаруженная нами, влияют также и на поверхностный белок. Данные мутации снижают синтез HBsAg, затрудняя серологическую верификацию ВГВ и способствуя развитию ускользающих от вакцин штаммов вируса [49]. Результаты согласуются с проведённой ранее отечественной работой, в которой среди 30 ВИЧ-/ВГВ-инфицированных пациентов в одном случае (3,3%) установлено значимое

аминокислотное замещение M204I, ещё в двух случаях определены потенциально значимые мутации L179S (ассоциирована с развитием лекарственной устойчивости при терапии хронического гепатита В ламивудином) и V214Y (связана с развитием лекарственной устойчивости к адефовиру) [50].

В России об эпидемической ситуации по гепатиту D можно судить только по результатам отдельных региональных исследований, основанных на частоте выявления анти-ВГД среди людей, положительных на наличие HBsAg. Показано, что ВГД относительно редко встречается на территории европейской части России и широко распространён на отдельных территориях азиатской части страны – в Тыве, Якутии, на Чукотке, достигая здесь 35% среди больных хроническим гепатитом В [51]. Среди 28 пациентов, в крови которых была обнаружена ДНК ВГВ, нам удалось обнаружить РНК ВГД у двух пациентов. Оба пациента являются мужчинами 42 и 45 лет. Один из изолятов ВГД кластеризуется с прототипными изолятами, циркулирующими на территории Средней Азии и Пакистана, однако имеет уровень гомологии нуклеотидной последовательности с прототипами не более 90%. Другой изолят кластеризуется с прототипными изолятами, циркулирующими на территории Румынии, Германии и Израиля, гомология нуклеотидной последовательности с которыми составляет около 95%.

Заключение

Полученные данные подтверждают факт более широкого распространения инфицирования парентеральными вирусными гепатитами среди ВИЧ-положительных лиц Новосибирской области по сравнению с условно здоровым населением. Генетическое разнообразие вариантов этих вирусов среди ВИЧ-инфицированных аналогично разнообразию, наблюдаемому в общей популяции.

В работе определены уровни встречаемости у ВИЧ-инфицированных пациентов Новосибирской области серологических маркеров ВГС (суммарные антитела) – 51,9%, РНК ВГС – 32,9%, ДНК ВГВ – 15,2%, РНК ВГД – 1,1%. Показано генотипическое разнообразие выявленных изолятов ВГС: 1b (52,5%), 3a (34,5%), 1a (11,5%), 2a (1,5%); ВГВ: D2 (96,5%), D3 (3,5%); выявленные изоляты ВГД отнесены к первому генотипу. Встречаемость маркеров вирусов парентеральных гепатитов у ВИЧ-положительных лиц имеет тенденцию увеличения с возрастом. Статистически достоверных различий в распределении маркеров парентеральных гепатитов среди ВИЧ-инфицированных мужчин и женщин на изучаемой выборке выявить не удалось. Среди вариантов ВГС, относящихся к 1b субгенотипу, определена значительная доля изолятов (84,3%), имеющих мутацию С316N, ассоциированную с развитием резистентности к лечению софосбувиром и дацабувиром. Мутация M204I, связанная с устойчивостью к лечению ламивудином и телбивудином, была выявлена у одного изолята ВГВ.

Результаты исследования свидетельствуют о целесообразности проведения тщательного обследования

ВИЧ-положительных лиц на наличие серологических и молекулярно-генетических маркеров инфицирования парентеральными вирусными гепатитами, что является крайне важным для выбора тактики лечения пациентов, своевременной профилактики возможных осложнений и предотвращения дальнейшего распространения данной группы вирусов в популяции.

ЛИТЕРАТУРА

- Gonzalez V.D., Falconer K., Blom K.G., Reichard O., Mørn B., Laursen A.L., et al. High levels of chronic immune activation in the T-cell compartments of patients coinfecting with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 and on highly active antiretroviral therapy are reverted by alpha interferon and ribavirin treatment. *J. Virol.* 2009; 83(21): 11407–11. <https://doi.org/10.1128/JVI.01211-09>
- Kovacs A., Karim R., Mack W.J., Xu J., Chen Z., Operskalski E., et al. Activation of CD8 T cells predicts progression of HIV infection in women coinfecting with hepatitis C virus. *J. Infect. Dis.* 2010; 201(6): 823–34. <https://doi.org/10.1086/650997>
- Rauch A., James I., Pfafferoth K., Nolan D., Klenerman P., Cheng W., et al. Divergent adaptation of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 to human leukocyte antigen-restricted immune pressure. *Hepatology.* 2009; 50(4): 1017–29. <https://doi.org/10.1002/hep.23101>
- Tengan F.M., Ibrahim K.Y., Dantas B.P., Manchiero C., Magri M.C., Bernardo W.M. Seroprevalence of hepatitis C virus among people living with HIV/AIDS in Latin America and the Caribbean: a systematic review. *BMC Infect. Dis.* 2016; 16(1): 663. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1988-y>
- Zuckerman A.D., Douglas A., Whelchel K., Choi L., DeClercq J., Chastain C.A., et al. Pharmacologic management of HCV treatment in patients with HCV mono-infection vs. HIV/HCV coinfection: Does coinfection really matter? *PLoS One.* 2019; 14(11): e0225434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225434>
- Cheng Z., Lin P., Cheng N. HBV/HIV coinfection: impact on the development and clinical treatment of liver diseases. *Front. Med. (Lausanne).* 2021; 8: 713981. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.713981>
- Babu C.K., Suwansrinon K., Bren G.D., Badley A.D., Rizza S.A. HIV induces TRAIL sensitivity in hepatocytes. *PLoS One.* 2009; 4(2): e4623. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004623>
- Herbeval J.P., Boasso A., Grivel J.C., Hardy A.W., Anderson S.A., Dolan M.J., et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells. *Blood.* 2005; 105(6): 2458–64. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3058>
- Yu Y., Gong R., Mu Y., Chen Y., Zhu C., Sun Z., et al. Hepatitis B virus induces a novel inflammation network involving three inflammatory factors, IL-29, IL-8, and cyclooxygenase-2. *J. Immunol.* 2011; 187(9): 4844–60. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100998>
- Lara-Pezzi E., Gómez-Gavira M.V., Gálvez B.G., Mira E., Iñiguez M.A., Fresno M., et al. The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J. Clin. Invest.* 2002; 110(12): 1831–8. <https://doi.org/10.1172/JCI15887>
- Mohammed N.A., Abd El-Aleem S.A., El-Hafiz H.A., McMahon R.F. Distribution of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrhosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrhosis. *J. Clin. Pathol.* 2004; 57(4): 350–4. <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.012120>
- Singh K.P., Crane M., Audsley J., Avihingsanon A., Sasadeusz J., Lewin S.R. HIV-hepatitis B virus coinfection: epidemiology, pathogenesis, and treatment. *AIDS.* 2017; 31(15): 2035–52. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001574>
- Brenchley J.M., Price D.A., Schacker T.W., Asher T.E., Silvestri G., Rao S., et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med.* 2006; 12(12): 1365–71. <https://doi.org/10.1038/nm1511>
- Qadir M.I. Hepatitis in AIDS patients. *Rev. Med. Virol.* 2018; 28(1). <https://doi.org/10.1002/rmv.1956>
- Sulkowski M.S. Viral hepatitis and HIV coinfection. *J. Hepatol.* 2008; 48(2): 353–67. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.11.009>

16. Kumar S., Stecher G., Li M., Niyaz 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>
17. Титаренко Р.В. Особенности наркоситуации и проблемы профилактики наркомании среди российских подростков. *Гуманитарные, социально-экономические и общественные науки.* 2015; (11-1): 191–4.
18. Соболева Н.В., Карлсен А.А., Кожанова Т.В., Кичатова В.С., Клушкина В.В., Исаева О.В. и др. Распространенность вируса гепатита С среди условно здорового населения Российской Федерации. *Журнал инфектологии.* 2017; 9(2): 56–64. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2017-9-2-56-64>
19. Guntipalli P., Pakala R., Kumari Gara S., Ahmed F., Bhatnagar A., Endaya Coronel M.K., et al. Worldwide prevalence, genotype distribution and management of hepatitis C. *Acta Gastroenterol. Belg.* 2021; 84(4): 637–56. <https://doi.org/10.51821/84.4.015>
20. Olinger C.M., Lazouskaya N.V., Eremin V.F., Muller C.P. Multiple genotypes and subtypes of hepatitis B and C viruses in Belarus: similarities with Russia and western European influences. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008; 14(6): 575–81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.01988.x>
21. Isakov V., Tsykunov V., Nikityuk D. Is elimination of hepatitis C virus realistic by 2030: Eastern Europe. *Liver Int.* 2021; 41(Suppl. 1): 50–5. <https://doi.org/10.1111/liv.14836>
22. Rhodes T., Platt L., Maximova S., Koshkina E., Latishevskaya N., Hickman M., et al. Prevalence of HIV, hepatitis C and syphilis among injecting drug users in Russia: a multi-city study. *Addiction.* 2006; 101(2): 252–66. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2006.01317.x>
23. Tsui J.I., Ko S.C., Krupitsky E., Lioznov D., Chaisson C.E., Gnatienco N., et al. Insights on the Russian HCV care cascade: minimal HCV treatment for HIV/HCV co-infected PWID in St. Petersburg. *Hepatol. Med. Policy.* 2016; 1: 13. <https://doi.org/10.1186/s41124-016-0020-x>
24. Rhodes T., Platt L., Judd A., Mikhailova L.A., Sarang A., Wallis N., et al. Hepatitis C virus infection, HIV co-infection, and associated risk among injecting drug users in Togliatti, Russia. *Int. J. STD AIDS.* 2005; 16(11): 749–54. <https://doi.org/10.1258/095646205774763180>
25. Бобкова М.Р., Самохвалов Е.И., Буравцова Е.В., Деткова Н.В., Кравченко А.В., Саламов Г.Г. и др. Гепатит С среди ВИЧ-инфицированных потребителей внутривенных наркотиков в России. *Мир вирусных гепатитов.* 2002; (6): 6–9.
26. Aceijas C., Rhodes T. Global estimates of prevalence of HCV infection among injecting drug users. *Int. J. Drug Policy.* 2007; 18(5): 352–8. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2007.04.004>
27. Munir S., Saleem S., Idrees M., Tariq A., Butt S., Rauff B., et al. Hepatitis C treatment: current and future perspectives. *Virology.* 2010; 7: 296. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-296>
28. Zein N.N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13(2): 223–35. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.2.223>
29. Probst A., Dang T., Bochud M., Egger M., Negro F., Bochud P.Y. Role of hepatitis C virus genotype 3 in liver fibrosis progression—a systematic review and meta-analysis. *J. Viral. Hepat.* 2011; 18(11): 745–59. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2011.01481.x>
30. Ramalho F. Hepatitis C virus infection and liver steatosis. *Antiviral Res.* 2003; 60(2): 125–7. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2003.08.007>
31. Esteban J.I., Sauleda S., Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J. Hepatol.* 2008; 48(1): 148–62. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.07.033>
32. Шустов А.В., Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., Гаврилова И.В., Акинфеева Л.А. Встречаемость маркеров, распределение генотипов и факторы риска вирусного гепатита С среди некоторых групп населения Новосибирской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2004; 71(5): 20–5.
33. Schinazi R., Halfon P., Marcellin P., Asselah T. HCV direct-acting antiviral agents: the best interferon-free combinations. *Liver Int.* 2014; 34(Suppl. 1): 69–78. <https://doi.org/10.1111/liv.12423>
34. D'Ambrosio R., Degasperis E., Colombo M., Aghemo A. Direct-acting antivirals: the endgame for hepatitis C? *Curr. Opin. Virol.* 2017; 24: 31–7. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.03.017>
35. Feld J.J. Direct-acting antivirals for Hepatitis C Virus (HCV): The progress continues. *Curr. Drug Targets.* 2017; 18(7): 851–62. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150825111314>
36. Zhang Y., Cao Y., Zhang R., Zhang X., Lu H., Wu C., et al. Pre-existing HCV variants resistant to DAAs and their sensitivity to PegIFN/RBV in Chinese HCV genotype 1b patients. *PLoS One.* 2016; 11(11): e0165658. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165658>
37. Palanisamy N., Kalaghatgi P., Akaberi D., Lundkvist Å., Chen Z.W., Hu P., et al. Worldwide prevalence of baseline resistance-associated polymorphisms and resistance mutations in HCV against current direct-acting antivirals. *Antivir. Ther.* 2018; 23(6): 485–93. <https://doi.org/10.3851/IMP3237>
38. Ikeda H., Watanabe T., Shimizu H., Hiraishi T., Kaneko R., Baba T., et al. Efficacy of ledipasvir/sofosbuvir with or without ribavirin for 12 weeks in genotype 1b HCV patients previously treated with a nonstructural protein 5A inhibitor-containing regimen. *Hepatol. Res.* 2018; 48(10): 802–9. <https://doi.org/10.1111/hepr.13074>
39. Wang G.P., Terrault N., Reeves J.D., Liu L., Li E., Zhao L., et al. Prevalence and impact of baseline resistance-associated substitutions on the efficacy of ledipasvir/sofosbuvir or simeprevir/sofosbuvir against GT1 HCV infection. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 3199. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21303-2>
40. Kati W., Koev G., Irvin M., Beyer J., Liu Y., Krishnan P., et al. In vitro activity and resistance profile of dasabuvir, a nonnucleoside hepatitis C virus polymerase inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 59(3): 1505–11. <https://doi.org/10.1128/AAC.04619-14>
41. Di Maio V.C., Cento V., Lenci I., Aragri M., Rossi P., Barbaliscia S., et al. Multiclass HCV resistance to direct-acting antiviral failure in real-life patients advocates for tailored second-line therapies. *Liver Int.* 2017; 37(4): 514–28. <https://doi.org/10.1111/liv.13327>
42. European Association for the Study of the Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. *J. Hepatol.* 2018; 69(2): 461–511. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.026>
43. Popping S., Cento V., Seguin-Devaux C., Boucher C.A.B., de Salazar A., Heger E., et al. The European prevalence of resistance associated substitutions among direct acting antiviral failures. *Viruses.* 2022; 14(1): 16. <https://doi.org/10.3390/v14010016>
44. Barth R.E., Huijgen Q., Tempelman H.A., Mudrikova T., Wensing A.M., Hoepelman A.I. Presence of occult HBV, but near absence of active HBV and HCV infections in people infected with HIV in rural South Africa. *J. Med. Virol.* 2011; 83(6): 929–34. <https://doi.org/10.1002/jmv.22026>
45. Tramuto F., Maida C.M., Colomba G.M., Di Carlo P., Vitale F. Prevalence of occult hepatitis B virus infection in a cohort of HIV-positive patients resident in Sicily, Italy. *Biomed. Res. Int.* 2013; 2013: 859583. <https://doi.org/10.1155/2013/859583>
46. Laguno M., Larrousse M., Blanco J.L., Leon A., Milinkovic A., Martínez-Rebozler M., et al. Prevalence and clinical relevance of occult hepatitis B in the fibrosis progression and antiviral response to INF therapy in HIV-HCV-coinfected patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2008; 24(4): 547–53. <https://doi.org/10.1089/aid.2007.9994>
47. Panigrahi R., Majumder S., Gooptu M., Biswas A., Datta S., Chandra P.K., et al. Occult HBV infection among anti-HBc positive HIV-infected patients in apex referral centre, Eastern India. *Ann. Hepatol.* 2012; 11(6): 870–5.
48. Hann H.W., Gregory V.L., Dixon J.S., Barker R.F. A review of the one-year incidence of resistance to lamivudine in the treatment of chronic hepatitis B. *Hepatol. Int.* 2008; 2(4): 440–56. <https://doi.org/10.1007/s12072-008-9105-y>
49. Еллаева Е.А., Писарева М.М., Никитина О.Е., Кижло С.Н., Груднин М.П., Дуданова О.П. Роль мутантных форм вируса гепатита В в прогрессирующем течении хронического гепатита В. *Ученые записки Петрозаводского государственного университета.* 2014; (6): 41–6.
50. Кожанова Т.В., Ильченко Л.Ю., Исаева О.В., Алексеева М.Н., Сарыглар А.А., Миронова Н.И. и др. Циркуляция вариантов вируса гепатита В, несущих мутации в гене полимеразы, среди ВГВ-инфицированных и ВГВ/ВИЧ-коинфицированных пациентов. *Современные технологии в медицине.* 2013; 5(2): 60–4.
51. Исаева О.В., Кюрегян К.К. Вирусный гепатит дельта: недооцененная угроза. *Инфекционные болезни: новости, мнения,*

обучение. 2019; 8(2): 72–9. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-12010>

REFERENCES

- Gonzalez V.D., Falconer K., Blom K.G., Reichard O., Mørn B., Laursen A.L., et al. High levels of chronic immune activation in the T-cell compartments of patients coinfecting with hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 and on highly active antiretroviral therapy are reverted by alpha interferon and ribavirin treatment. *J. Virol.* 2009; 83(21): 11407–11. <https://doi.org/10.1128/JVI.01211-09>
- Kovacs A., Karim R., Mack W.J., Xu J., Chen Z., Operskalski E., et al. Activation of CD8 T cells predicts progression of HIV infection in women coinfecting with hepatitis C virus. *J. Infect. Dis.* 2010; 201(6): 823–34. <https://doi.org/10.1086/650997>
- Rauch A., James I., Pfafferoth K., Nolan D., Klenerman P., Cheng W., et al. Divergent adaptation of hepatitis C virus genotypes 1 and 3 to human leukocyte antigen-restricted immune pressure. *Hepatology.* 2009; 50(4): 1017–29. <https://doi.org/10.1002/hep.23101>
- Tengan F.M., Ibrahim K.Y., Dantas B.P., Manchiero C., Magri M.C., Bernardo W.M. Seroprevalence of hepatitis C virus among people living with HIV/AIDS in Latin America and the Caribbean: a systematic review. *BMC Infect. Dis.* 2016; 16(1): 663. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1988-y>
- Zuckerman A.D., Douglas A., Whelchel K., Choi L., DeClercq J., Chastain C.A., et al. Pharmacologic management of HCV treatment in patients with HCV mono-infection vs. HIV/HCV coinfection: Does coinfection really matter? *PLoS One.* 2019; 14(11): e0225434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225434>
- Cheng Z., Lin P., Cheng N. HBV/HIV coinfection: impact on the development and clinical treatment of liver diseases. *Front. Med. (Lausanne).* 2021; 8: 713981. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.713981>
- Babu C.K., Suwansrinon K., Bren G.D., Badley A.D., Rizza S.A. HIV induces TRAIL sensitivity in hepatocytes. *PLoS One.* 2009; 4(2): e4623. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004623>
- Herbeuval J.P., Boasso A., Grivel J.C., Hardy A.W., Anderson S.A., Dolan M.J., et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in HIV-1-infected patients and its in vitro production by antigen-presenting cells. *Blood.* 2005; 105(6): 2458–64. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-08-3058>
- Yu Y., Gong R., Mu Y., Chen Y., Zhu C., Sun Z., et al. Hepatitis B virus induces a novel inflammation network involving three inflammatory factors, IL-29, IL-8, and cyclooxygenase-2. *J. Immunol.* 2011; 187(9): 4844–60. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100998>
- Lara-Pezzi E., Gómez-Gaviró M.V., Gálvez B.G., Mira E., Iñiguez M.A., Fresno M., et al. The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J. Clin. Invest.* 2002; 110(12): 1831–8. <https://doi.org/10.1172/JCI15887>
- Mohammed N.A., Abd El-Aleem S.A., El-Hafiz H.A., McMahon R.F. Distribution of constitutive (COX-1) and inducible (COX-2) cyclooxygenase in postviral human liver cirrhosis: a possible role for COX-2 in the pathogenesis of liver cirrhosis. *J. Clin. Pathol.* 2004; 57(4): 350–4. <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.012120>
- Singh K.P., Crane M., Audsley J., Avihingsanon A., Sasadeusz J., Lewin S.R. HIV-hepatitis B virus coinfection: epidemiology, pathogenesis, and treatment. *AIDS.* 2017; 31(15): 2035–52. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000001574>
- Brenchley J.M., Price D.A., Schacker T.W., Asher T.E., Silvestri G., Rao S., et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med.* 2006; 12(12): 1365–71. <https://doi.org/10.1038/nm1511>
- Qadir M.I. Hepatitis in AIDS patients. *Rev. Med. Virol.* 2018; 28(1). <https://doi.org/10.1002/rmv.1956>
- Sulkowski M.S. Viral hepatitis and HIV coinfection. *J. Hepatol.* 2008; 48(2): 353–67. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.11.009>
- 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>
- Titarenko R.V. Features of the drug situation and the problems of drug abuse prevention among Russian teenagers. *Gumanitarnye, sotsial'no-ekonomicheskie i obshchestvennye nauki.* 2015; (11-1): 191–4. (in Russian)
- Soboleva N.V., Karlsen A.A., Kozhanova T.V., Kichatova V.S., Klushkina V.V., Isaeva O.V., et al. The prevalence of the hepatitis C virus among the conditionally healthy population of the Russian Federation. *Zhurnal infektologii.* 2017; 9(2): 56–64. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2017-9-2-56-64> (in Russian)
- Guntipalli P., Pakala R., Kumari Gara S., Ahmed F., Bhatnagar A., Endaya Coronel M.K., et al. Worldwide prevalence, genotype distribution and management of hepatitis C. *Acta Gastroenterol. Belg.* 2021; 84(4): 637–56. <https://doi.org/10.51821/84.4.015>
- Olinger C.M., Lazouskaya N.V., Eremin V.F., Muller C.P. Multiple genotypes and subtypes of hepatitis B and C viruses in Belarus: similarities with Russia and western European influences. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008; 14(6): 575–81. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.01988.x>
- Isakov V., Tsyrukunov V., Nikityuk D. Is elimination of hepatitis C virus realistic by 2030: Eastern Europe. *Liver Int.* 2021; 41(Suppl. 1): 50–5. <https://doi.org/10.1111/liv.14836>
- Rhodes T., Platt L., Maximova S., Koshkina E., Latishevskaya N., Hickman M., et al. Prevalence of HIV, hepatitis C and syphilis among injecting drug users in Russia: a multi-city study. *Addiction.* 2006; 101(2): 252–66. <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2006.01317.x>
- Tsui J.L., Ko S.C., Krupitsky E., Lioznov D., Chaisson C.E., Gnatienco N., et al. Insights on the Russian HCV care cascade: minimal HCV treatment for HIV/HCV co-infected PWID in St. Petersburg. *Hepatol. Med. Policy.* 2016; 1: 13. <https://doi.org/10.1186/s41124-016-0020-x>
- Rhodes T., Platt L., Judd A., Mikhailova L.A., Sarang A., Wallis N., et al. Hepatitis C virus infection, HIV co-infection, and associated risk among injecting drug users in Togliatti, Russia. *Int. J. STD AIDS.* 2005; 16(11): 749–54. <https://doi.org/10.1258/095646205774763180>
- Bobkova M.R., Samokhvalov E.I., Buravtsova E.V., Detkova N.V., Kravchenko A.V., Salamov G.G., et al. Hepatitis C among HIV-infected intravenous drug users in Russia. *Mir virusnykh gepatitov.* 2002; (6): 6–9. (in Russian)
- Aceijas C., Rhodes T. Global estimates of prevalence of HCV infection among injecting drug users. *Int. J. Drug Policy.* 2007; 18(5): 352–8. <https://doi.org/10.1016/j.drugpo.2007.04.004>
- Munir S., Saleem S., Idrees M., Tariq A., Butt S., Rauff B., et al. Hepatitis C treatment: current and future perspectives. *Virol. J.* 2010; 7: 296. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-296>
- Zein N.N. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin. Microbiol. Rev.* 2000; 13(2): 223–35. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.2.223>
- Probst A., Dang T., Bochud M., Egger M., Negro F., Bochud P.Y. Role of hepatitis C virus genotype 3 in liver fibrosis progression—a systematic review and meta-analysis. *J. Viral. Hepat.* 2011; 18(11): 745–59. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2011.01481.x>
- Ramalho F. Hepatitis C virus infection and liver steatosis. *Antiviral Res.* 2003; 60(2): 125–7. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2003.08.007>
- Esteban J.I., Sauleda S., Quer J. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. *J. Hepatol.* 2008; 48(1): 148–62. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.07.033>
- Shustov A.V., Kochneva G.V., Sivolobova G.F., Grazhdantseva A.A., Gavrilova I.V., Akinfeeva L.A. The occurrence of markers, the distribution of genotypes and risk factors for viral hepatitis C among some groups of the population of the Novosibirsk region. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2004; 71(5): 20–5. (in Russian)
- Schinazi R., Halfon P., Marcellin P., Asselah T. HCV direct-acting antiviral agents: the best interferon-free combinations. *Liver Int.* 2014; 34(Suppl. 1): 69–78. <https://doi.org/10.1111/liv.12423>
- D'Ambrosio R., Degasperis E., Colombo M., Aghemo A. Direct-acting antivirals: the endgame for hepatitis C? *Curr. Opin. Virol.* 2017; 24: 31–7. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.03.017>
- Feld J.J. Direct-acting antivirals for Hepatitis C Virus (HCV): The progress continues. *Curr. Drug Targets.* 2017; 18(7): 851–62. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150825111314>
- Zhang Y., Cao Y., Zhang R., Zhang X., Lu H., Wu C., et al. Pre-existing HCV variants resistant to DAAs and their sensitivity to PegIFN/RBV in Chinese HCV genotype 1b patients. *PLoS One.* 2016; 11(11): e0165658. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165658>

37. Palanisamy N., Kalaghatgi P., Akaberi D., Lundkvist Å., Chen Z.W., Hu P., et al. Worldwide prevalence of baseline resistance-associated polymorphisms and resistance mutations in HCV against current direct-acting antivirals. *Antivir. Ther.* 2018; 23(6): 485–93. <https://doi.org/10.3851/IMP3237>
38. Ikeda H., Watanabe T., Shimizu H., Hiraishi T., Kaneko R., Baba T., et al. Efficacy of ledipasvir/sofosbuvir with or without ribavirin for 12 weeks in genotype 1b HCV patients previously treated with a nonstructural protein 5A inhibitor-containing regimen. *Hepatol. Res.* 2018; 48(10): 802–9. <https://doi.org/10.1111/hepr.13074>
39. Wang G.P., Terrault N., Reeves J.D., Liu L., Li E., Zhao L., et al. Prevalence and impact of baseline resistance-associated substitutions on the efficacy of ledipasvir/sofosbuvir or simeprevir/sofosbuvir against GT1 HCV infection. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 3199. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21303-2>
40. Kati W., Koev G., Irvin M., Beyer J., Liu Y., Krishnan P., et al. In vitro activity and resistance profile of dasabuvir, a nonnucleoside hepatitis C virus polymerase inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 59(3): 1505–11. <https://doi.org/10.1128/AAC.04619-14>
41. Di Maio V.C., Cento V., Lenci I., Aragri M., Rossi P., Barbaliscia S., et al. Multiclass HCV resistance to direct-acting antiviral failure in real-life patients advocates for tailored second-line therapies. *Liver Int.* 2017; 37(4): 514–28. <https://doi.org/10.1111/liv.13327>
42. European Association for the Study of the Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C 2018. *J. Hepatol.* 2018; 69(2): 461–511. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.026>
43. Popping S., Cento V., Seguin-Devaux C., Boucher C.A.B., de Salazar A., Heger E., et al. The European prevalence of resistance associated substitutions among direct acting antiviral failures. *Viruses.* 2022; 14(1): 16. <https://doi.org/10.3390/v14010016>
44. Barth R.E., Huijgen Q., Tempelman H.A., Mudrikova T., Wensing A.M., Hoepelman A.I. Presence of occult HBV, but near absence of active HBV and HCV infections in people infected with HIV in rural South Africa. *J. Med. Virol.* 2011; 83(6): 929–34. <https://doi.org/10.1002/jmv.22026>
45. Tramuto F., Maida C.M., Colomba G.M., Di Carlo P., Vitale F. Prevalence of occult hepatitis B virus infection in a cohort of HIV-positive patients resident in Sicily, Italy. *Biomed. Res. Int.* 2013; 2013: 859583. <https://doi.org/10.1155/2013/859583>
46. Laguno M., Larrousse M., Blanco J.L., Leon A., Milinkovic A., Martinez-Rebozler M., et al. Prevalence and clinical relevance of occult hepatitis B in the fibrosis progression and antiviral response to INF therapy in HIV-HCV-coinfected patients. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2008; 24(4): 547–53. <https://doi.org/10.1089/aid.2007.9994>
47. Panigrahi R., Majumder S., Gooptu M., Biswas A., Datta S., Chandra P.K., et al. Occult HBV infection among anti-HBc positive HIV-infected patients in apex referral centre, Eastern India. *Ann. Hepatol.* 2012; 11(6): 870–5.
48. Hann HW., Gregory V.L., Dixon J.S., Barker R.F. A review of the one-year incidence of resistance to lamivudine in the treatment of chronic hepatitis B. *Hepatol. Int.* 2008; 2(4): 440–56. <https://doi.org/10.1007/s12072-008-9105-y>
49. Elpaeva E.A., Pisareva M.M., Nikitina O.E., Kizhlo S.N., Grudin M.P., Dudanova O.P. Role of hepatitis B virus mutant forms in progressive course of chronic hepatitis B. *Uchenye zapiski Petrozavodskogo gosudarstvennogo universiteta.* 2014; (6): 41–6. (in Russian)
50. Kozhanova T.V., Il'chenko L.Yu., Isaeva O.V., Alekseeva M.N., Saryglar A.A., Mironova N.I., et al. Circulation of hepatitis B virus variants carrying mutations in the polymerase gene among HBV-infected and HBV/HIV-coinfected patients. *Sovremennye tekhnologii v meditsine.* 2013; 5(2): 60–4. (in Russian)
51. Isaeva O.V., Kyuregyan K.K. Viral hepatitis delta: an underestimated threat. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie.* 2019; 8(2): 72–9. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2019-12010> (in Russian)

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-135>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Сравнительное изучение Ухань-подобного и омикрон-подобного вариантов SARS-CoV-2 на экспериментальных животных моделях

Ленева И.А.¹, Смирнова Д.И.¹, Карташова Н.П.¹, Грачева А.В.¹, Иванина А.В.¹, Глубокова Е.А.¹, Корчевая Е.Р.¹, Панкратов А.А.², Трунова Г.В.², Хохлова В.А.², Свитич О.А.¹, Зверев В.В.¹, Файзулов Е.Б.¹

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», 105064, г. Москва, Россия;

²ФГБУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А. Герцена» Минздрава России, 125284, г. Москва, Россия

Введение. Изменчивость SARS-CoV-2 оказалась выше ожидаемой, а появление новых вариантов вызывает обеспокоенность об их потенциально более высокой вирулентности, трансмиссивности, способности уклоняться от иммунных реакций, вызванных предыдущей инфекцией или вакцинацией. В связи с этим важно изучение патогенеза таких вариантов на экспериментальных моделях SARS-CoV-2.

Цель работы – сравнение патогенности вариантов Ухань и BA.1.1 (омикрон) у мышей BALB/c и сирийских хомяков.

Материал и методы. В исследовании использованы штаммы SARS-CoV-2 Dubrovka, филогенетически близкий к штамму Wuhan-Hu-1, и LIA, филогенетически близкий к штамму омикрон, мыши BALB/c, трансгенные мыши B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Pr1mn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2Pr1mn, сирийские золотистые хомяки. Заражение животных проводили интраназально, определение вирулентности выполняли посредством комплекса клинических, патоморфологических и вирусологических методов.

Результаты. Сравнительные исследования штаммов SARS-CoV-2 Dubrovka (Ухань-подобного) и LIA (омикрон-подобного) на моделях животных продемонстрировали их различную патогенность. При параллельном заражении мышей BALB/c вариантами Dubrovka и LIA инфекция протекала без серьезных клинических признаков и повреждений лёгких. Заражение штаммом LIA приводило к системному заболеванию с высоким содержанием вирусной РНК в лёгких и тканях мозга животных. Вирусная РНК у мышей при заражении штаммом Dubrovka была преходящей и не обнаруживалась в лёгких уже на 7-й день после заражения. Напротив, у хомяков штамм Dubrovka обладал большей патогенностью, чем штамм LIA. При инфицировании штаммом Dubrovka поражения лёгких были значительнее, наблюдались потеря массы тела и распространение вируса по органам, в частности в ткани головного мозга, в то время как при заражении штаммом LIA вирус в тканях головного мозга не определялся.

Заключение. Изучение различных вариантов SARS-CoV-2 у видов, изначально невосприимчивых к инфекции, важно для мониторинга зоонозных резервуаров, создающих риск распространения новых вариантов у людей.

Ключевые слова: варианты SARS-CoV-2; мыши K18-hACE2; BALB/c; сирийские хомяки; экспериментальное моделирование COVID-19

Для цитирования: Ленева И.А., Смирнова Д.И., Карташова Н.П., Грачева А.В., Иванина А.В., Глубокова Е.А., Корчевая Е.Р., Панкратов А.А., Трунова Г.В., Хохлова В.А., Свитич О.А., Зверев В.В., Файзулов Е.Б. Сравнительное изучение Ухань-подобного и омикрон-подобного вариантов SARS-CoV-2 на экспериментальных животных моделях. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(5): 439-449. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-135>

Для корреспонденции: Ленева Ирина Анатольевна, д-р биол. наук, заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», г. 105064, Москва, Россия. E-mail: wnyfd385@yandex.ru

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

Финансирование. Исследование выполнено за счет государственного бюджета.

Благодарность. Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 23 July, 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом организации (протокол № 11 от 01.12.2021).

Поступила 18.08.2022

Принята в печать 04.10.2022

Опубликована 31.10.2022

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-135>

Comparative study of Wuhan-like and omicron-like variants of SARS-CoV-2 in experimental animal models

Irina A. Leneva¹, Daria I. Smirnova¹, Nadezhda P. Kartashova¹, Anastasiia V. Gracheva¹, Anna V. Ivanina¹, Ekaterina A. Glubokova¹, Ekaterina R. Korchevaya¹, Andrey A. Pankratov², Galina G. Trunova², Varvara A. Khokhlova², Oxana A. Svitich¹, Vitaly V. Zverev¹, Evgeny B. Faizuloev¹

¹Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Department of Virology, 105064, Moscow, Russia;

²Herzen Moscow Research Institute of Oncology of the Ministry of Health of Russia, 125284, Moscow, Russia

Introduction. The variability of SARS-CoV-2 appeared to be higher than expected, the emergence of new variants raises concerns.

The **aim** of the work was to compare the pathogenicity of the Wuhan and BA.1.1/Omicron variants in BALB/c mice and Syrian hamsters.

Materials and methods. The study used strains of SARS-CoV-2: Dubrovka phylogenetically close to Wuhan-Hu-1, and LIA phylogenetically close to Omicron, BALB/c mice, transgenic mice B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2PrImn, Syrian golden hamsters. Animals were infected intranasally, pathogenicity was estimated by a complex of clinical, pathomorphological and virological methods.

Results. Comparative studies of SARS-CoV-2 Dubrovka and LIA strains on animal models demonstrated their heterogeneous pathogenicity. In parallel infection of BALB/c mice with Dubrovka and LIA variants, the infection proceeded without serious clinical signs and lung damage. Infection with the LIA strain resulted to a systemic disease with a high concentration of viral RNA in the lungs and brain tissues of animals. The presence of viral RNA in mice infected with the Dubrovka strain was transient and undetectable in the lungs by day 7 post-infection. Unlike the mouse model, in hamsters, the Dubrovka strain had a greater pathogenicity than the LIA strain. In hamsters infected with the Dubrovka strain lung lesions were more significant, and the virus spread through organs, in particular in brain tissue, was observed. In hamsters infected with the LIA strain virus was not detected in brain tissue.

Conclusion. The study of various variants of SARS-CoV-2 in species initially unsusceptible to SARS-CoV-2 infection is important for monitoring zoonotic reservoirs that increase the risk of spread of new variants in humans.

Keywords: SARS-CoV-2 variants; BALB/c mice; transgenic B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2PrImn mice; Syrian golden hamsters; SARS-CoV-2 animal models

For citation: Leneva I.A., Smirnova D.I., Kartashova N.P., Gracheva A.V., Ivanina A.V., Glubokova E.A., Korchevaya E.R., Pankratov A.A., Trunova G.G., Khokhlova V.A., Svitich O.A., Zverev V.V., Faizuloev E. B. Comparative study of Wuhan-like and omicron-like variants of SARS-CoV-2 in experimental animal models. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(5): 439-449 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-135>

For correspondence: Irina A. Leneva, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Experimental Virology, Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Department of Virology, 105064, Moscow, Russia. E-mail: wnyfd385@yandex.ru

Information about the authors:

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

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

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

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

Ivanina A.V., <https://orcid.org/0000-0002-7289-693X>

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

Korchevaya E.R., <https://orcid.org/0000-0002-6417-3301>

Pankratov A.A., <https://orcid.org/0000-0001-7291-9743>

Trunova G.V., <https://orcid.org/0000-0003-2917-4496>

Khokhlova V.A., <https://orcid.org/0000-0002-0339-2068>

Svitich O.A., <https://orcid.org/0000-0003-1757-8389>

Zverev V.V., <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

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

Contribution: All the authors made a substantial contribution to the conception of the work, experiments, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

Funding. The research was funded by the State budget.

Acknowledgement. The study was performed using the equipment of the Center for Collective Use of Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera.

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July, 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the institution (protocol No 11 dated 01.12.2021).

Received 08 August 2022
Accepted 04 October 2022
Published 31 October 2022

Введение

SARS-CoV-2 – вирус зоонозного происхождения, вызвавший новую коронавирусную инфекцию в 2019 г. (COVID-19) в Ухане, Китайская Народная Республика [1, 2], откуда он быстро распространился по всему миру, и в марте 2020 г. Всемирная организация здравоохранения объявила пандемию. Изменчивость вируса оказалась выше ожидаемой, появление новых вариантов SARS-CoV-2 вызывало беспокойство тем, что потенциально они могут быть более заразными и (или) уклоняться от иммунных реакций, вызванных предыдущей инфекцией или вакцинацией [3, 4].

К настоящему времени наиболее широкое распространение [5–13] получил сильно мутировавший по сравнению с первоначальным вариантом Ухань вариант B.1.1.529 (омикрон), демонстрирующий беспрецедентное накопление мутаций в белке S, некоторые из которых связаны с повышенной трансмиссивностью и уклонением от антител [14–18]. Такие мутации могут изменить восприимчивость других видов-хозяев к вирусу, тем самым потенциально расширяя область его обитания в животных [19, 20], а также создать новые возможности для моделирования инфекции в них.

Модели лабораторных животных, которые воспроизводят клинические и патологические особенности COVID-19 у человека, являются инструментами для изучения патогенеза, механизмов и путей передачи возбудителя. Кроме того, моделированию новой коронавирусной инфекции и её последствий на животных, дальнейшему сопоставлению полученных в этой модели данных с клиническими наблюдениями принадлежит важная роль в оценке эффективности противовирусных препаратов и вакцин.

Модель вирусной инфекции должна воспроизводить клинические признаки заболевания, его тяжесть и сопоставимый уровень вирусной репликации, а также у модельного животного должны быть клеточные рецепторы, аналогичные человеческим [21]. В качестве рецептора для взаимодействия с SARS-CoV-2 был идентифицирован человеческий ангиотензинпревращающий фермент 2 (angiotensin-converting enzyme 2 – ACE2) [20]. Ландшафт восприимчивых видов животных определяется мутациями S-белка, которые могут модулировать родство с ACE2 [22]. Инбредные мыши (WT, BALB/c, C57BL6, 129S) поддерживают репликацию вируса штамма Ухань, но клинические признаки заболевания не выявляются. Была разработана специальная трансгенная модель мыши, имеющая рецептор ACE2, аналогичный человеческому [23], и в которой инфекция носит летальный характер. Однако экспрессируемый человеческий рецептор ACE2 в таких

трансгенных мышях не является физиологическим, эти мыши труднодоступны и очень дороги. Появились сообщения о том, что новые варианты, такие как B.1.351 (бета) и B.1.1.529 (омикрон), могут заражать устойчивых к SARS-CoV-2 мышей дикого типа (WT) [24–27], однако полный анализ чувствительности *in vivo* этих вирусов к настоящему времени не проведён. В отличие от мышинной модели, у сирийских хомяков клиническая картина SARS-CoV-2, патология лёгких, включая пневмонию, наиболее близко воссоздаёт инфекцию у человека [28].

Изучение штаммов SARS-CoV-2 в этой модели выявило их гетерогенность и различную патогенность, при этом данные по варианту B.1.1.529 (омикрон) неоднозначны, отличаются в различных исследованиях и зависят от штамма [29–31]. Нами от пациентов с лабораторно-подтверждённой инфекцией COVID-19 были выделены и охарактеризованы штаммы Dubrovka, филогенетически близкий к штамму Ухань, и LIA, филогенетически близкий к штамму омикрон, однако их изучение в моделях лабораторных животных не проводилось и данные об их патогенности у животных отсутствуют.

Целью нашей работы являлось сравнение инфекционности штаммов Dubrovka (Ухань-подобного) и LIA (омикрон-подобного) SARS-CoV-2 в моделях мышей BALB/c и сирийских хомяков, характеристика патогенеза и прогрессирования инфекции в этих моделях.

Материалы и методы

Вирусы и клетки

В работе использовались лабораторные штаммы коронавируса SARS-CoV-2: Dubrovka (идент. № GenBank: MW514307.1, выделен от пациента 4 июня 2020 г., классификация по Pango B.1.1.317), филогенетически близкий к штамму Wuhan-Hu-1, идент. № GenBank: MN908947.3) [29] и LIA (идент. № GenBank: ON032858.1, выделен от пациента 27 января 2022 г., классификация по Pango BA.1.15), филогенетически близкий к штамму омикрон. Штаммы вирусов SARS-CoV-2 были выделены на культуре клеток Vero CCL81 из назофарингеальных мазков больных COVID-19. Культивирование вирусов проводили на клетках эпителия почки африканской зелёной мартышки Vero CCL81 (ATCC) из коллекции Научно-исследовательского института вакцин и сывороток (НИИВС) имени И.И. Мечникова при 37 °C в питательной среде DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium) с L-глутамином (300 мкг/мл) и глюкозой 4,5 г/л, смесью антибиотиков (пенициллин 100 МЕ/мл и стрептомицин 100 мкг/мл) в атмосфере 5% CO₂. Штамм Dubrovka прошёл 20 последовательных пассажей и вызывал вы-

раженное цитопатогенное действие (ЦПД). Штамм LA прошёл 5 последовательных пассажей и вызывал менее выраженное ЦПД с гибелью до 20% клеток через 96 ч после заражения. Образцы вирусного материала для проведения работы хранились при температуре -80°C в виде аликвот. Для титрования вирусов для заражения животных, вирусного материала из лёгких животных и характеристики вирусов также использовали перевиваемую культуру клеток эпителия почки африканской зелёной мартышки Vero CCL81.

Животные и эксперименты с ними

В опытах использовали самок мышей линии BALB/c массой 12–14 г, полученных из питомника «Стезар» (Владимирская обл.), самок и самцов трансгенных мышей линии B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Pr1mn/HEMI Hemizygous for Tg(K18-ACE2)2Pr1mn (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA), а также самок сирийских золотистых хомяков массой 50–60 г, полученных из ФИБХ РАН «Питомник «Пушино» (р. п. Столбовая, Московская обл.). Содержание животных соответствовало правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник. Кормили животных брикетированными кормами в соответствии с утверждёнными нормами. Все эксперименты были утверждены Этическим комитетом по работе с животными НИИВС имени И.И. Мечникова (протокол № 11 от 01.12.2021).

Мышей и хомяков заражали интраназально под лёгким эфирным наркозом в объёме 30 и 100 мкл соответственно на обе ноздри в указанных для каждого опыта дозах. За животными велось ежедневное наблюдение в течение последующих 4–7 дней, проводилось ежедневное взвешивание. Уменьшение или увеличение массы тела рассчитывалось отдельно для каждой мыши и выражалось в процентах. При этом за 100% принималась масса животного перед инфицированием. Для всех мышей одной группы определялось среднее значение процента потери или увеличения массы.

Получение лёгких и других органов животных

В указанные дни после инфицирования вирусом в каждой группе забивали по 3–4 мыши или хомяка и в стерильных условиях извлекали лёгкие, ткани головного мозга, другие органы. Органы трёхкратно промывали в растворе 0,01 М фосфатно-солевого буфера (ФСБ). Далее левые лёгкие, головной мозг и другие органы гомогенизировали и ресуспендировали в 1 мл холодного стерильного раствора 0,01 М ФСБ. Суспензию осветляли от клеточного дебриса центрифугированием при 2000 г в течение 10 мин, супернатант использовали для определения инфекционного титра вируса в культуре клеток и проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Хранение полученных образцов осуществлялось при -80°C до постановки экспериментов. Правые лёгкие фиксировали в 10% растворе формалина для гистологических исследований.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию

лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 23 July, 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом организации (протокол № 11 от 01.12.2021).

Определение титра вируса в лёгких животных

Для определения инфекционного титра вируса из лёгких мышей или хомяков клетки Vero CCL81 рассаживали в 96-луночные планшеты фирмы Costar со средней плотностью 10 000 клеток на лунку и выращивали в среде DMEM в присутствии 5% фетальной сыворотки телят, 10 мМ глутамин и антибиотиков (пенициллин 100 МЕ/мл и стрептомицин 100 мкг/мл) до формирования полного монослоя (в течение 3 дней). Перед заражением вирусом культуру клеток 2 раза промывали средой DMEM без сыворотки. Готовили 10-кратные разведения каждой пробы вируса из лёгких с 10^{-1} до 10^{-7} . Приготовленные разведения в объёме 200 мкл вносили в планшеты с культурой клеток и инкубировали в атмосфере 5% CO_2 при 37°C в течение 5 суток до появления ЦПД в клетках вирусного контроля. Расчёт титра вируса проводили с использованием формулы М.А. Ramakrishnan в программе Excel [30] и выражали в $\lg \text{ТЦИД}_{50} / 0,1 \text{ мл}$ (тканевой цитопатической инфекционной дозы 50). Далее рассчитывали среднее значение титра для проб от мышей одной группы.

Количественное определение РНК коронавируса SARS-CoV-2 в органах животных методом ПЦР

Для выделения рибонуклеиновой кислоты (РНК) использовали осветлённые центрифугированием гомогенаты лёгких и других органов животных. Выделение вирусной РНК проводили коммерческим набором реагентов для экстракции ДНК/РНК из биологического материала «МагноПрайм ЮНИ» (ТУ 21.20.23-024-09286667-2018, ООО «НекстБио», Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Количественное определение РНК вируса SARS-CoV-2 проводили методом обратной транскрипции и ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ), как описано А.В. Gracheva и соавт. [31]. Для выявления вирусной РНК были использованы праймеры и зонды к гену *N* (нуклеокапсида) вируса COVID-19-N-F, COVID-19-N-R, COVID-19-N-P (таблица). Реакцию ОТ-ПЦР-РВ проводили с использованием реагентов «2,5x реакционная смесь для ПЦР-РВ с Tag-полимеразой» и «обратная транскриптаза MMLV» («Синтол», Россия). Реакционная смесь объёмом 25 мкл содержала по 10 пмоль каждого праймера и 5 пмоль зонда, 10 мкл 2,5x реакционной смеси с Taq-ДНК полимеразой, 0,6 мкл обратной транскриптазы. Температурно-временной режим: 45°C – 10 мин (1 цикл); 95°C – 5 мин (1 цикл); 95°C – 5 сек, 55°C – 45 сек (45 циклов). Учёт флуоресцентного сигнала проводили на канале FAM. Все олигонуклеотиды синтезированы в ООО «Синтол» (Россия) [31].

Реакции ОТ и ПЦР-РВ проводили в амплификаторе «ДТпрайм-4» («ДНК-технология», Россия). Значение порогового цикла в ПЦР-РВ определялось автома-

Таблица. Последовательности олигонуклеотидов, использованные в работе

Table. Oligonucleotide sequences used in the work

Название Name	Последовательность 5'-3' Sequence 5'-3'
COVID-19-N-F	GCGTTCCTTCGGAATGTCG
COVID-19-N-R	TTGGATCTCTTTGTCATCCAATTG
COVID-19-N-P	FAM-AACGTGGTTGACCTACAGGT-BHQ1
COVN-PC	GCGTTCCTTCGGAATGTCGCGCGCATTTGGCATGGAAGTCACCTTCGGAACCTTCGGAACCGGAACGTGTGTT GACACCTACAGGTGCCATCAAATTGGAATGACAAAGATCCAA

тически с помощью программы RealTime_PCR v.7.7 («ДНК-Технология») на основе математического анализа формы кривой амплификации (метод геометрический, Ср). Для построения калибровочного графика использовали десятикратные разведения синтетического олигонуклеотида COVN-PC (таблица). Для расчёта концентрации вирусной РНК применяли тип анализа оптических данных «количественный со стандартами». Количество выражали в Ig копий РНК в 1 мл гомогената соответствующего органа при изучении содержания вируса в крови животных в 1 мл сыворотки крови.

Гистологическое изучение лёгких животных

Для гистологического исследования правое лёгкое мышей фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине в течение 24 ч, обезживали и заливали в гистомикс. На этапе заливки материал ориентировали вдоль длинной оси. Серийные срезы толщиной 3–5 мкм изготавливали на ротационном микротоме Leica RM 2125 RTS (Leica, Германия), затем окрашивали гематоксилином и эозином и заключали в канадский балзам. Полученные гистологические препараты исследовали под световым микроскопом Olympus BX51 (Olympus, Япония) с системой фоторегистрации гистопрепаратов и обработки изображений.

Результаты

Сравнительное изучение патогенеза инфекции у мышей различных линий при заражении их вариантами SARS-CoV-2 Dubrovka (Ухань-подобным) и LIA (омикрон-подобным)

При изучении патогенеза инфекции при заражении штаммами Dubrovka (Ухань-подобным) и LIA (омикрон-подобным) были использованы мыши линии BALB/c. В качестве контрольных мышей при заражении штаммом Dubrovka (Ухань-подобным) использовали трансгенных мышей K18-hACE2, экспрессирующих человеческий ACE2-рецептор, используемый SARS-CoV-2 для проникновения в клетки. Состояние, смертность и массу животных контролировали ежедневно. При параллельном заражении мышей BALB/c штаммами Dubrovka и LIA в обоих случаях инфекция протекала без серьёзных клинических признаков болезни, смертности и практически без потери массы (рис. 1). Напротив, при заражении трансгенных мышей K18-hACE2 дозой $10^{3.5}$ ТЦИД₅₀ на 7-й

день после инфицирования 3 из 7 животных погибли, а у оставшихся 4 фиксировалось тяжёлое состояние (низкая температура, невозможность принимать пищу и воду, потеря способности к движению) и потеря около 25% первоначальной массы. В связи с этим на основании Правил обращения с лабораторными животными они были гуманно умерщвлены и рассматривались как умершие в этот день. Таким образом, гибель всех животных в этой группе на 7-й день после заражения можно рассматривать как полную (100%), потеря массы достигала максимума к этому дню, составляя примерно 25% (рис. 1).

Изучение органов животных, взятых на 4-й день после инфицирования штаммом LIA (омикрон-подобным), выявило высокое содержание вирусной РНК в лёгких, тканях сердца, головного мозга и крови (на уровне 5,0–7,0 Ig копий РНК/мл). При заражении штаммом Dubrovka (Ухань-подобным) вирусная РНК у мышей была преходящей: 2,1–2,5 Ig копий РНК/мл Dubrovka против более 6 Ig копий РНК/мл LIA на 4-й день после инфекции и не обнаруживалась в лёгких уже на 7-й день после заражения (рис. 1). Также не было выявлено вируса в тканях головного мозга и в крови. Напротив, при заражении этим же штаммом трансгенных мышей K18-hACE2, взятых в качестве контроля, титр вируса в лёгких был наибольшим на 4-й день после инфицирования (на 7-й день после инфекции титр был ниже, оставаясь относительно высоким – $6,9 \pm 0,69$ Ig ТЦИД₅₀ / 0,1 мл против $4,9 \pm 0,57$ Ig ТЦИД₅₀ / 0,1 мл). Высокие титры вируса в лёгких и других органах трансгенных мышей K18-hACE2 при заражении штаммом Dubrovka (Ухань-подобным) свидетельствуют об остром развитии системной инфекции, которая закончилась смертью животных.

Гистологическое исследование показало, что структура лёгких мышей BALB/c, инфицированных штаммом Dubrovka (Ухань-подобным), в целом соответствовала таковой у интактных мышей (рис. 2). Однако в лёгких мышей этой группы чаще, чем у незаражённых животных, встречались небольшие скопления лимфоцитов, располагавшиеся в стенке бронхов либо периваскулярно (рис. 2 в, г). Эти слабо выраженные воспалительные изменения, вероятно, являются иммунным ответом на антигенную стимуляцию и не оказывают значительного повреждающего действия. Несмотря на высокое содержание вируса в лёгких, при заражении мышей BALB/c вариантом LIA (омикрон-подобным)

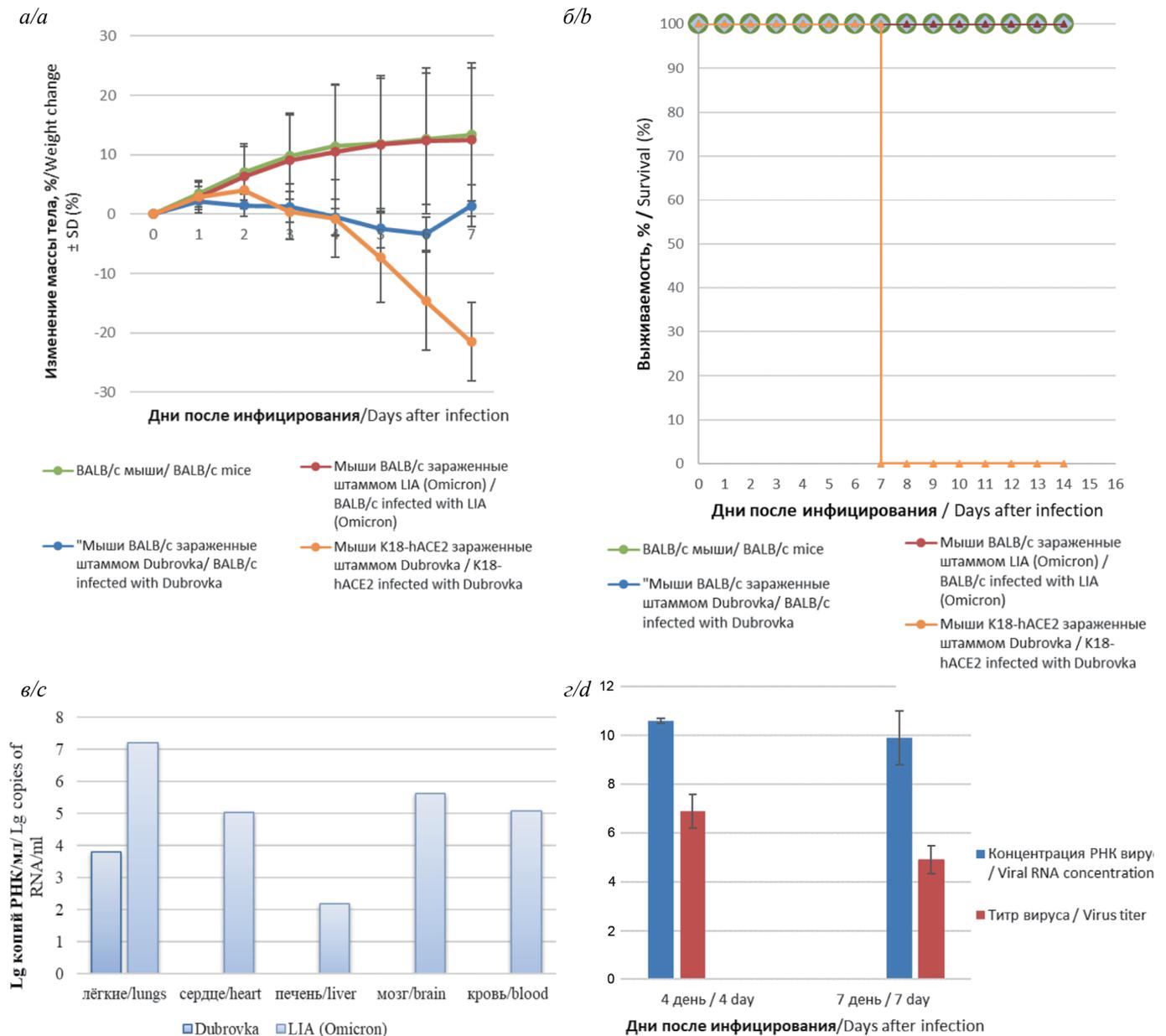


Рис. 1. Показатели мышей линий BALB/c и K18-hACE2, заражённых штаммами Dubrovka и LIA: *a* – масса тела (линия показывает значение массы $M \pm SD$); *b* – выживаемость; *c* – средние значения концентраций РНК SARS-CoV-2 в тканях различных органов мышей линии BALB/c, зараженных штаммами Dubrovka и LIA; *d* – инфекционный титр вируса (\lg ТЦИД₅₀/мл) и содержание вирусной РНК (\lg копий РНК/мл) SARS-CoV-2 штамма Dubrovka в лёгких мышей K18-hACE2 на 4-й и 7-й день после инфицирования.

Fig. 1. Parameters of BALB/c and K18-hACE2 mice infected with Dubrovka and LIA strains: *a* – the body weight (the line shows the weight value $M \pm SD$); *b* – survival rate; *c* – average values of SARS-CoV-2 RNA concentrations in tissues of various organs of BALB/c mice infected with Dubrovka and LIA strains; *d* – viral titer (\lg TCID₅₀/ml) and the concentration of viral RNA (\lg copies of RNA/ml) of SARS-CoV-2 Dubrovka strain in the lungs of K18-hACE2 mice on days 4 and 7 days post-infection.

в различных дозах (от $10^{3.5}$ до $10^{4.5}$ \lg ТЦИД₅₀) признака развития интерстициальной (вирусной) пневмонии, так же как и в случае заражения штаммом Dubrovka (Ухань-подобный), не обнаружены.

Сравнительное изучение патогенеза инфекции у золотистых сирийских хомяков при заражении их вариантами SARS-CoV-2 Dubrovka (Ухань-подобным) и LIA (омикрон-подобным)

Интраназальное заражение сирийских хомяков штаммом Dubrovka (Ухань-подобным) в дозе $10^{4.5}$ ТЦИД₅₀

вызывало снижение массы животных на 8–10% без проявления явных клинических признаков заболевания и смертности (рис. 3). Вирусологическое изучение органов хомяков, зараженных штаммом Dubrovka (Ухань-подобный), взятых на 4-й день после инфицирования, выявило высокую концентрацию РНК SARS-CoV-2 в лёгких (8,2 \lg копий РНК/мл) и тканях головного мозга (7,7 \lg копий РНК/мл). Кроме того, РНК надёжно определялась в тканях сердца и в крови (на уровне 6,5–6,7 \lg копий РНК/мл) (рис. 3).

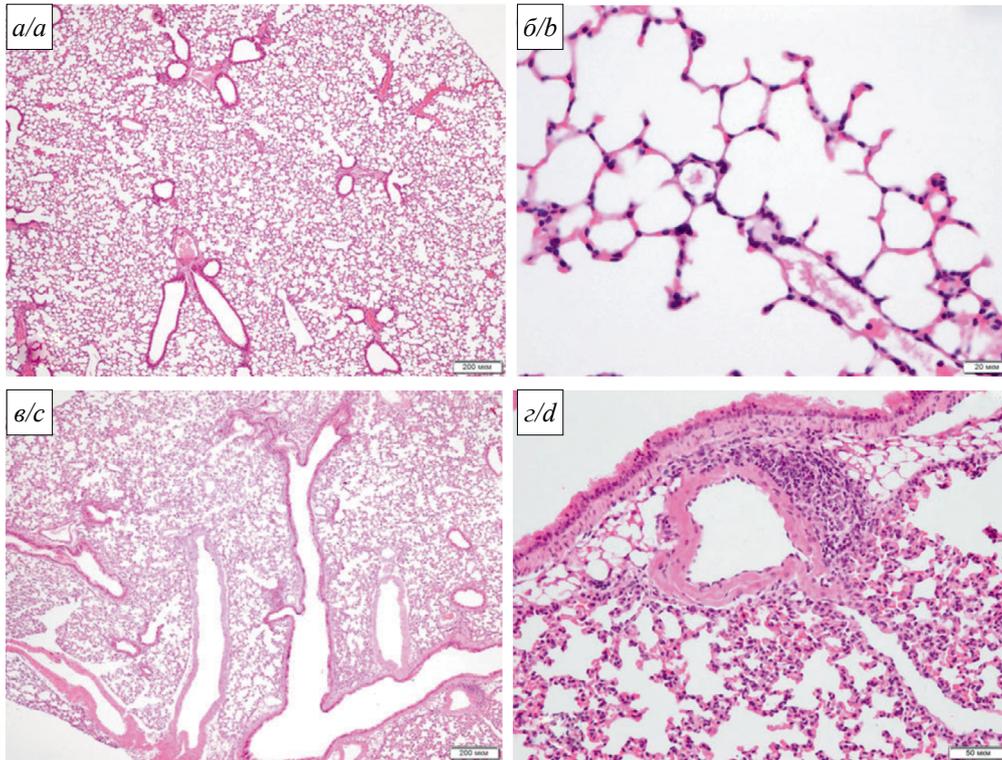


Рис. 2. Морфологическая характеристика лёгких интактных (*a, б*) и инфицированных штаммом Dubrovka (Ухань-подобным) (*в, г*) мышей линии BALB/c: *a* – просветы бронхов и бронхиол свободные, паренхима органа выглядит воздушной; *б* – просветы альвеол равномерно воздушные, межальвеолярные перегородки тонкие, сосуды и капилляры умеренно полнокровны; *в* – гистоструктура лёгкого соответствует варианту нормы; *г* – небольшое лимфоидное скопление (бронхо-ассоциированная лимфоидная ткань) в области контакта бронха и кровеносного сосуда. Увеличение: *a, в* – $\times 40$; *б* – $\times 400$; *г* – $\times 200$; окрашивание: гематоксилин и эозин.

Fig. 2. Morphological characteristics of the lungs of mock-infected BALB/c (*a, b*) mice and infected with the Dubrovka strain (Wuhan-like) (*c, d*): *a* – the bronchial lumen are free, the organ parenchyma looks airy; *b* – the alveolar lumen is uniformly airy, the interalveolar septa are thin, the vessels and capillaries with moderately hyperemia; *c* – the histostucture of the lung corresponds to the variant of the norm; *d* – a small lymphoid accumulation (bronchoassociated lymphoid tissue) in the area of contact between the bronchus and the blood vessel. Magnification: *a, c* – $40 \times$; *b* – $400 \times$; *d* – $200 \times$. Staining: hematoxylin and eosin.

Заражение сирийских хомяков штаммом LIA (омикрон-подобным) в различных дозах (от $10^{3,5}$ до $10^{4,5}$ ТЦИД₅₀) не вызывало видимых признаков заболевания и потери массы у животных (**рис. 3**). При вирусологическом изучении лёгких в них обнаружился одинаково высокий, не зависящий от дозы заражения уровень вирусной РНК (около $9 \lg$ копий РНК/мл), однако вирус в тканях головного мозга и других органах практически определялся (**рис. 3**).

Макроскопическое сравнение лёгких сирийских хомяков выявило у инфицированных штаммом Dubrovka (Ухань-подобным) скопления и (или) кровоизлияния, которые отсутствовали у инфицированных LIA (омикрон-подобным). На микроскопическом уровне в гистологических препаратах лёгких у всех животных, инфицированных штаммом Dubrovka (Ухань-подобным), наблюдали выраженные воспалительные изменения, морфологическая картина которых соответствовала вирусной пневмонии. В некоторых долях лёгких площадь обширных сливных безвоздушных зон и прилегающих к ним участков со сниженной воздушностью, оценённая на качественном уровне, достигала 80% от площади доли (**рис. 4 а, б**). Воспа-

лительные изменения в стенке бронхов и бронхиол, расположенных в очагах пневмонии, были незначительными. Лимфогистиоцитарный инфильтрат редко проникал глубже их адвентициальной оболочки. В их просвете содержались немногочисленные десквамированные эпителиоциты, единичные макрофаги и нейтрофилы. Сосуды в очагах пневмонии были полнокровны, окружены умеренно выраженным воспалительным инфильтратом из диффузно рассеянных лимфоцитов, гистиоцитов и небольшой примеси полиморфноядерных лейкоцитов. Наблюдали выраженный периваскулярный отёк.

Окружающая паренхима в лёгких животных, инфицированных штаммом Dubrovka (Ухань-подобным), представляла собой безвоздушные поля, в которых просвет альвеол не определялся, межальвеолярные перегородки были разрушены за счёт воспалительного инфильтрата, интерстициального отёка и гибели респираторного эпителия. Воспалительный инфильтрат состоял из гистиоцитов, лимфоцитов, единичных нейтрофилов, среди них были видны остатки ядер погибших клеток, островки пролиферирующего респираторного эпителия и фибробласты.

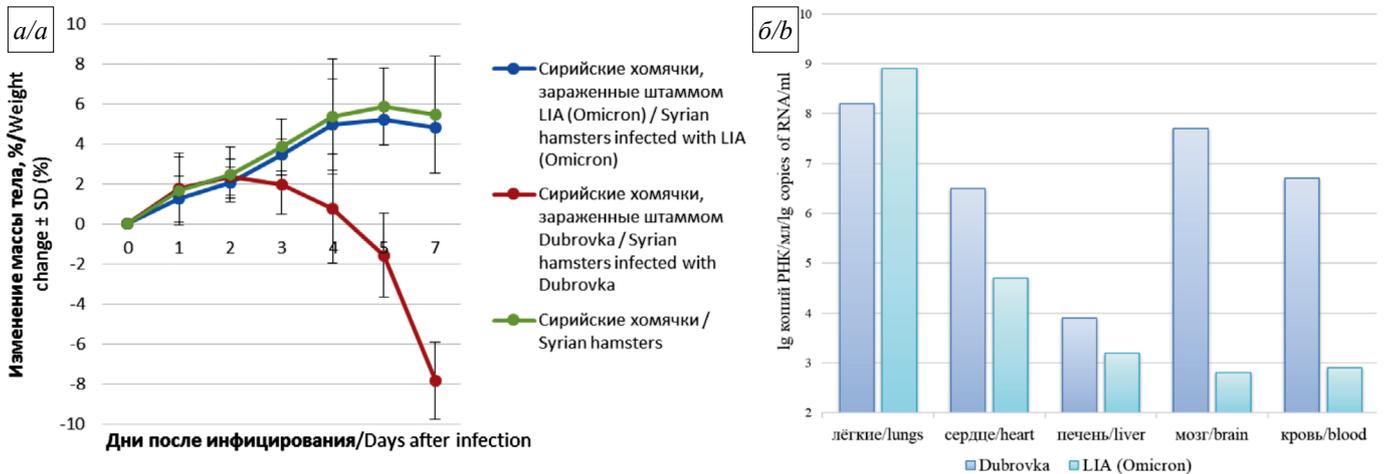


Рис. 3. Показатели золотистых сирийских хомячков, заражённых штаммами Dubrovka и LIA: *a* – масса тела (линия показывает значение массы $M \pm SD$); *b* – средние значения концентраций РНК SARS-CoV-2 в тканях различных органов.

Fig. 3. Indicators of golden Syrian hamsters infected with Dubrovka and LIA strains: *a* – body weight (the line shows the weight value $M \pm SD$); *b* – average values of SARS-CoV-2 RNA concentrations in tissues of various organs.

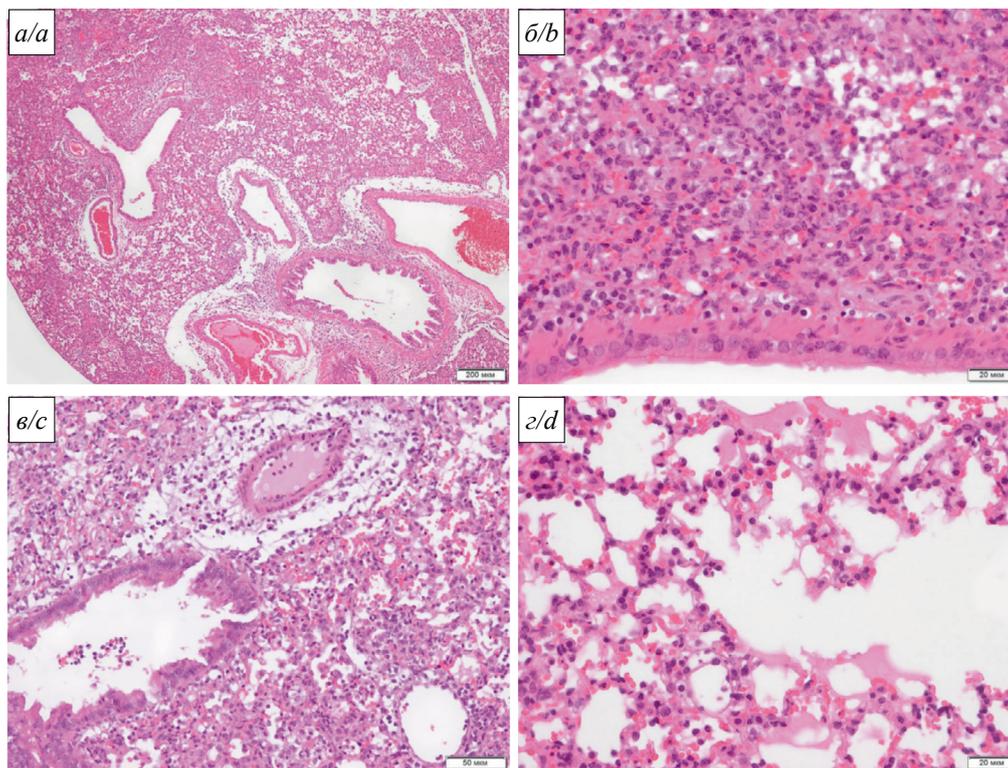


Рис. 4. Альтеративно-воспалительные изменения в лёгких сирийских хомячков на 4-е сутки после инфицирования SARS-CoV-2 штаммом Dubrovka (Ухань-подобный): *a* – сливные очаги вирусной пневмонии; *b* – перибронхиальный безвоздушный очаг пневмонии: просвет бронха свободный; эпителиальная выстилка сохранена, слабая воспалительная инфильтрация стенки бронха; в прилегающей паренхиме межальвеолярные перегородки разрушены за счёт воспалительного инфильтрата, отёка и гибели респираторного эпителия; *в* – участок паренхимы лёгкого со сниженной воздушностью: выраженный периваскулярный отёк, просветы альвеол щелевидные, в них отёчная жидкость, десквамированный эпителий, макрофаги, эритроциты, лимфоциты; *г* – участок паренхимы лёгкого со сниженной воздушностью: интраальвеолярный отёк, интраальвеолярные кровоизлияния, утолщённые за счёт лимфогистиоцитарного инфильтрата и интерстициального отёка, межальвеолярные перегородки, резкое полнокровие капилляров. Увеличение: *a* – $\times 40$, *в* – $\times 200$, *б*, *г* – $\times 400$; окрашивание: гематоксилин и эозин.

Fig. 4. Alternative and inflammatory changes in the lungs of Syrian hamsters on day 4 post-infection with SARS-CoV-2 strain Dubrovka (Wuhan): *a* – foci of viral pneumonia; *b* – peribronchial airless focus of pneumonia: bronchial lumen is free; epithelial lining is preserved, weak inflammatory infiltration of the bronchial wall; in the adjacent parenchyma, the interalveolar septa are destroyed due to inflammatory infiltration, edema and death of the respiratory epithelium; *c* – section of the lung parenchyma with reduced airiness: pronounced perivascular edema, slit-like lumen of the alveoli, in them – exudate fluid, desquamated epithelium, macrophages, erythrocytes, lymphocytes; *d* – section of the lung parenchyma with reduced airiness: intraalveolar swelling, intraalveolar hemorrhages, thickened interalveolar septa due to lymphohistiocytic infiltration and interstitial swelling, hyperemia of capillaries. Magnification: *a* – $40 \times$; *c* – $200 \times$; *b*, *d* – $400 \times$. Staining: hematoxylin and eosin.

Сосуды и капилляры были в состоянии резкого полнокровия. В прилегающих участках паренхимы со сниженной воздушностью отмечено утолщение межальвеолярных перегородок за счёт полнокровия микрососудов, интерстициального отёка и лимфогистиоцитарного инфильтрата. Просветы альвеол в этих участках содержали отёчную жидкость, эритроциты, единичные десквамированные альвеолоциты, макрофаги, лимфоциты, редко нити фибрина.

В лёгких всех хомяков, заражённых штаммом LIA (омикрон-подобным) в наиболее высокой из всех изученных доз ($10^{4.5}$ ТЦИД₅₀), также развивались выраженные альтеративно-воспалительные изменения, соответствовавшие интерстициальной (вирусной) пневмонии, морфологическая картина которой была идентична таковой при заражении штаммом Dubrovka (Ухань-подобным). Однако в этом случае площадь крупных очагов пневмонии была значительно меньше, чем при заражении штаммом Dubrovka (Ухань-подобным) (не более 30–50% от площади гистологических срезов наиболее поражённых долей при заражении штаммом LIA (омикрон-подобным) против 80% при заражении штаммом Dubrovka (Ухань-подобным) (рис. 4). Несмотря на то что содержание вируса в лёгких хомяков, заражённых штаммом LIA (омикрон-подобным), при всех дозах заражения было примерно одинаковым, при гистологическом изучении было выявлено, что общая площадь очагов пневмонии, оценённая на качественном уровне, снижалась с уменьшением дозы заражения и составляла не более 15–20 и 5% от общей площади гистологического среза долей при заражении дозами 10^4 и $10^{3.5}$ ТЦИД₅₀ соответственно.

Обсуждение

Ранее было показано, что различные линии инбредных мышей не восприимчивы к первоначальному штамму SARS-CoV-2, вызвавшему COVID-19. Ключевым рецептором при взаимодействии с SARS-CoV-2 у людей является ACE2, взаимодействие с которым происходит через рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка вируса SARS-CoV-2. Мышиный ACE2 (mACE2) не допускает заражения SARS-CoV-2, что явилось основанием для использования специальной модельной трансгенной мыши K18-hACE2, экспрессирующей рецептор ACE2, аналогичный человеческому (hACE2) [23]. Полученные нами вирусологические и патологические характеристики показали, что штамм Dubrovka (Ухань-подобный) не вызывает продуктивной инфекции у мышей BALB/c, что совпадает с предыдущими исследованиями [24–27]. Напротив, при заражении штаммом LIA (омикрон-подобным) у мышей BALB/c наблюдалось размножение вируса в лёгких, тканях головного мозга, сердца, в крови. Важным аспектом этой инфекции являлось отсутствие смертности, явных клинических и неврологических проявлений и повреждения лёгких, выявляемых в гистологических исследованиях, в отличие от трансгенных мышей, экспрессирующих hACE2, у которых при заражении штаммом Dubrovka (Ухань-подобным) развилось тяжёлое клиническое

течение, приводящее к смерти. Показано, что вариант омикрон также патогенен для трансгенных мышей K18-hACE2, однако потеря массы, смертность, воспалительные реакции выражены слабее, чем при инфицировании вариантом Ухань [29]. Наши результаты подтверждают данные об адаптации вируса к мышам, однако механизм этого процесса остаётся невыясненным. Молекулярные и генетические исследования показали, что наличие мутаций в S-гене у варианта BA.1 (омикрон) приводит к повышенному сродству только с рецептором mACE2, что даёт основание предполагать, что пониженная вирулентность этого штамма, вероятно, связана, помимо сродства RBD с ACE2, с другими факторами, в частности с более низкой фузогенностью [32, 33].

В наших экспериментах при параллельном моделировании инфекции обоими штаммами у сирийских хомяков мы не обнаружили значительных различий в концентрации вирусной РНК в лёгких на 4-й день после инфицирования. Однако у хомяков, инфицированных штаммом Dubrovka (Ухань-подобным), по данным гистологических исследований поражения лёгких были значительно сильнее, наблюдались потеря массы и распространение вируса по органам. Наиболее значимым отличием между вариантами в модели сирийских хомяков было наличие инфекции в тканях головного мозга при заражении штаммом Dubrovka (Ухань-подобным), в то время как при заражении штаммом LIA (омикрон-подобным) вирус в тканях головного мозга не определялся. Таким образом, в отличие от мышинной модели, у сирийских хомяков штамм Dubrovka (Ухань-подобный) был более вирулентным, чем штамм LIA (омикрон-подобный), что сопоставимо с более лёгким течением болезни у людей, инфицированных коронавирусом BA.1 (омикрон).

Интересным фактом является то, что, несмотря на активное размножение вируса в лёгких сирийских хомяков при заражении обоими штаммами и мышей линии BALB/c при инфицировании штаммом LIA (омикрон-подобным), у заражённых животных не наблюдаются смертность и явные клинические и неврологические симптомы заболевания, что может быть обусловлено быстрым и эффективным иммунным ответом [34] или неспособностью вируса поддерживать множественные циклы репликации. Для лучшего понимания этого процесса необходимы дальнейшее изучение гуморального и клеточного иммунитета в этих моделях, корреляция их с вирусологическими, патоморфологическими, клиническими характеристиками и исследованиями у людей.

Заключение

Доброкачественное течение болезни, при которой, однако, фиксируется размножение вируса в лёгких, приводящее к развитию вирусной пневмонии, наблюдаемое нами на моделях сирийских хомяков и мышей линии BALB/c, сопоставимо с инфекцией, вызванной SARS-CoV-2 на других моделях животных, в частности у приматов и хорьков. Благоприятный исход заболевания как в этих моделях, так

и у людей в конечном счёте устраняется действием иммунного ответа [34]. Наши данные об адаптации омикрон-подобного штамма SARS-CoV-2 к мышам в совокупности с этим обстоятельством вызывают опасения по поводу распространения тропизма новых вариантов к новым хозяевам, которые изначально были невосприимчивы к данной инфекции. Это создаёт потенциальный риск возникновения новых зоонозных резервуаров и распространения новых вариантов у людей, что диктует необходимость постоянного мониторинга возникающих вариантов SARS-CoV-2.

ЛИТЕРАТУРА

- Holmes E.C., Goldstein S.A., Rasmussen A.L., Robertson D.L., Crits-Christoph A., Wertheim J.O., et al. The origins of SARS-CoV-2: A critical review. *Cell*. 2021; 184(19): 4848–56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.017>
- Rasmussen A.L. On the origins of SARS-CoV-2. *Nat. Med.* 2021; 27(1): 9. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01205-5>
- Trinité B., Pradenas E., Marfil S., Roviroso C., Ureña V., Tarrés-Freixas F., et al. Previous SARS-CoV-2 infection increases B.1.1.7 cross-neutralization by vaccinated individuals. *Viruses*. 2021; 13(6): 1135. <https://doi.org/10.3390/v13061135>
- Wang P., Nair M.S., Liu L., Iketani S., Luo Y., Guo Y., et al. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. *Nature*. 2021; 593(7857): 130–5. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03398-2>
- Mullen J.L., Tsueng G., Latif A.A., Alkuzweny M., Cano M., Haag E., et al. Center for Viral Systems Biology. *Outbreak.info*. 2020. Available at: <https://outbreak.info/>
- Wang R., Chen J., Gao K., Hozumi Y., Yin C., Wei G.W. Analysis of SARS-CoV-2 mutations in the United States suggests presence of four substrains and novel variants. *Commun. Biol.* 2021; 4(1): 228. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01754-6>
- Dejnirattisai W., Zhou D., Supasa P., Liu C., Mentzer A.J., Ginn H.M., et al. Antibody evasion by the P.1 strain of SARS-CoV-2. *Cell*. 2021; 184(11): 2939–54.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.055>
- Planas D., Bruel T., Grzelak L., Guivel-Benhassine F., Staropoli I., Porrot F., et al. Sensitivity of infectious SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 variants to neutralizing antibodies. *Nat. Med.* 2021; 27(5): 917–24. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01318-5>
- Dhar M.S., Marwal R., Vs R., Ponnusamy K., Jolly B., Bhojar R.C., et al. Genomic characterization and epidemiology of an emerging SARS-CoV-2 variant in Delhi, India. *Science*. 2021; 374(6570): 995–9. <https://doi.org/10.1126/science.abj9932>
- Parums D. Editorial: Revised World Health Organization (WHO) terminology for variants of concern and variants of interest of SARS-CoV-2. *Med. Sci. Monit.* 2021; 27: e933622. <https://doi.org/10.12659/MSM.933622>
- Karim S.S.A., Karim Q.A. Omicron SARS-CoV-2 variant: a new chapter in the COVID-19 pandemic. *Lancet*. 2021; 398(10317): 2126–8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02758-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02758-6)
- Allen H., Tessier E., Turner C., Anderson C., Blomquist P., Simons D., et al. Comparative transmission of SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) and Delta (B.1.617.2) variants and the impact of vaccination: national cohort study, England. *medRxiv*. 2022. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2022.02.15.22271001>
- Lambrou A.S., Shirk P., Steele M.K., Paul P., Paden C.R., Cadwell B., et al. Genomic surveillance for SARS-CoV-2 variants: Predominance of the Delta (B.1.617.2) and omicron (B.1.1.529) variants – United States, June 2021 – January 2022. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2022; 71(6): 206–11. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7106a4>
- Petersen E., Ntoumi F., Hui D.S., Abubakar A., Kramer L.D., Obiero C., et al. Emergence of new SARS-CoV-2 Variant of Concern Omicron (B.1.1.529) – highlights Africa’s research capabilities, but exposes major knowledge gaps, inequities of vaccine distribution, inadequacies in global COVID-19 response and control efforts. *Int. J. Infect. Dis.* 2022; 114: 268–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.11.040>
- Andrews N., Stowe J., Kirsebom F., Toffa S., Ricketts T., Gallagher E., et al. Covid-19 vaccine effectiveness against the omicron (B.1.1.529) variant. *N. Engl. J. Med.* 2022; 386(16): 1532–46. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2119451>
- Grabowski F., Kochańczyk M., Lipniacki T. The spread of SARS-CoV-2 variant omicron with a doubling time of 2.0–3.3 days can be explained by immune evasion. *Viruses*. 2022; 14(2): 294. <https://doi.org/10.3390/v14020294>
- Liu L., Iketani S., Guo Y., Chan J.F.W., Wang M., Liu L., et al. Striking antibody evasion manifested by the Omicron variant of SARS-CoV-2. *Nature*. 2022; 602(7898): 676–81. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04388-0>
- Planas D., Saunders N., Maes P., Guivel-Benhassine F., Planchais C., Buchrieser J., et al. Considerable escape of SARS-CoV-2 Omicron to antibody neutralization. *Nature*. 2022; 602(7898): 671–5. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04389-z>
- Conceicao C., Thakur N., Human S., Kelly J.T., Logan L., Bialy D., et al. The SARS-CoV-2 Spike protein has a broad tropism for mammalian ACE2 proteins. *PLoS Biol.* 2020; 18(12): e3001016. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001016>
- Liu Y., Hu G., Wang Y., Ren W., Zhao X., Ji F., et al. Functional and genetic analysis of viral receptor ACE2 orthologs reveals a broad potential host range of SARS-CoV-2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2021; 118(12): e2025373118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025373118>
- Gretebeck L.M., Subbarao K. Animal models for SARS and MERS coronaviruses. *Curr. Opin. Virol.* 2015; 13: 123–9. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.06.009>
- Garry R.F. Mutations arising in SARS-CoV-2 spike on sustained human-to-human transmission and human-to-animal passage. *Virological*. 2021. Available at: <https://virological.org/t/mutations-arising-in-sars-cov-2-spike-on-sustained-human-to-human-transmission-and-human-to-animal-passage/578/14>
- Bao L., Deng W., Huang B., Gao H., Liu J., Ren L., et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature*. 2020; 583(7818): 830–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2312-y>
- Kant R., Kareinen L., Smura T., Freitag T.L., Jha S.K., Alitalo K., et al. Common laboratory mice are susceptible to infection with the SARS-CoV-2 beta variant. *Viruses*. 2021; 13(11): 2263. <https://doi.org/10.3390/v13112263>
- Montagutelli X., Prot M., Levillayer L., Salazar E.B., Jouvion G., Conquet L., et al. *bioRxiv*. 2021. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.03.18.436013>
- Shuai H., Chan J.F.W., Yuen T.T.T., Yoon C., Hu J.C., Wen L., et al. Emerging SARS-CoV-2 variants expand species tropism to murines. *EBioMedicine*. 2021; 73: 103643. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103643>
- Zhang Y.N., Zhang Z.R., Zhang H.Q., Li N., Zhang Q.Y., Li X.D., et al. Different pathogenesis of SARS-CoV-2 Omicron variant in wild-type laboratory mice and hamsters. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022 Feb 25; 7(1): 62. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00930-2>
- Imai M., Iwatsuki-Horimoto K., Hatta M., Loeber S., Halfmann P.J., Nakajima N., et al. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2020; 117(28): 16587–95. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009799117>
- Грачёва А.В., Корчевая Е.Р., Кудряшова А.М., Борисова О.В., Петруша О.А., Смирнова Д.И. и др. Адаптация МТТ-теста для определения нейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(3): 253–65. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-136>
- Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* 2016; 5(2): 85–6. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>
- Gracheva A.V., Korchevaya E.R., Ammour Y.I., Smirnova D.I., Sokolova O.S., Glukhov G.S., et al. Immunogenic properties of SARS-CoV-2 inactivated by ultraviolet light. *Arch. Virol.* 2022; 167(11): 2181–91. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05530-7>
- Meng B., Abdullahi A., Ferreira I.A.T.M., Goonawardane N., Saito A., Kimura I., et al. Altered TMPRSS2 usage by SARS-CoV-2 Omicron impacts infectivity and fusogenicity. *Nature*. 2022; 603(7902): 706–14. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04474-x>

33. Suzuki R., Yamasoba D., Kimura I., Wang L., Kishimoto M., Ito J., et al. Attenuated fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron variant. *Nature*. 2022; 603(7902): 700–5. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04462-1>
34. Kim Y.I., Kim S.G., Kim S.M., Kim E.H., Park S.J., Yu K.M., et al. Infection and rapid transmission of SARS-CoV-2 in ferrets. *Cell Host Microbe*. 2020; 27(5): 704–9.e2. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.023>

REFERENCES

1. Holmes E.C., Goldstein S.A., Rasmussen A.L., Robertson D.L., Crits-Christoph A., Wertheim J.O., et al. The origins of SARS-CoV-2: A critical review. *Cell*. 2021; 184(19): 4848–56. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.017>
2. Rasmussen A.L. On the origins of SARS-CoV-2. *Nat. Med.* 2021; 27(1): 9. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01205-5>
3. Trinité B., Pradenas E., Marfil S., Roviroso C., Urrea V., Tarrés-Freixas F., et al. Previous SARS-CoV-2 infection increases B.1.1.7 cross-neutralization by vaccinated individuals. *Viruses*. 2021; 13(6): 1135. <https://doi.org/10.3390/v13061135>
4. Wang P., Nair M.S., Liu L., Iketani S., Luo Y., Guo Y., et al. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7. *Nature*. 2021; 593(7857): 130–5. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03398-2>
5. Mullen J.L., Tsueng G., Latif A.A., Alkuzweny M., Cano M., Haag E., et al. Center for Viral Systems Biology. *Outbreak.info*. 2020. Available at: <https://outbreak.info/>
6. Wang R., Chen J., Gao K., Hozumi Y., Yin C., Wei G.W. Analysis of SARS-CoV-2 mutations in the United States suggests presence of four substrains and novel variants. *Commun. Biol.* 2021; 4(1): 228. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01754-6>
7. Dejnirattisai W., Zhou D., Supasa P., Liu C., Mentzer A.J., Ginn H.M., et al. Antibody evasion by the P.1 strain of SARS-CoV-2. *Cell*. 2021; 184(11): 2939–54.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.03.055>
8. Planas D., Bruel T., Grzelak L., Guivel-Benhassine F., Staropoli I., Porrot F., et al. Sensitivity of infectious SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 variants to neutralizing antibodies. *Nat. Med.* 2021; 27(5): 917–24. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01318-5>
9. Dhar M.S., Marwal R., Vs R., Ponnusamy K., Jolly B., Bhojar R.C., et al. Genomic characterization and epidemiology of an emerging SARS-CoV-2 variant in Delhi, India. *Science*. 2021; 374(6570): 995–9. <https://doi.org/10.1126/science.abj9932>
10. Parums D. Editorial: Revised World Health Organization (WHO) terminology for variants of concern and variants of interest of SARS-CoV-2. *Med. Sci. Monit.* 2021; 27: e933622. <https://doi.org/10.12659/MSM.933622>
11. Karim S.S.A., Karim Q.A. Omicron SARS-CoV-2 variant: a new chapter in the COVID-19 pandemic. *Lancet*. 2021; 398(10317): 2126–8. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02758-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02758-6)
12. Allen H., Tessier E., Turner C., Anderson C., Blomquist P., Simons D., et al. Comparative transmission of SARS-CoV-2 Omicron (B.1.1.529) and Delta (B.1.617.2) variants and the impact of vaccination: national cohort study, England. *medRxiv*. 2022. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2022.02.15.22271001>
13. Lambrou A.S., Shirk P., Steele M.K., Paul P., Paden C.R., Cadwell B., et al. Genomic surveillance for SARS-CoV-2 variants: Predominance of the Delta (B.1.617.2) and omicron (B.1.1.529) variants – United States, June 2021 – January 2022. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 2022; 71(6): 206–11. <https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7106a4>
14. Petersen E., Ntoumi F., Hui D.S., Abubakar A., Kramer L.D., Obiero C., et al. Emergence of new SARS-CoV-2 Variant of Concern Omicron (B.1.1.529) – highlights Africa’s research capabilities, but exposes major knowledge gaps, inequities of vaccine distribution, inadequacies in global COVID-19 response and control efforts. *Int. J. Infect. Dis.* 2022; 114: 268–72. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.11.040>
15. Andrews N., Stowe J., Kirsebom F., Toffa S., Rickeard T., Gallagher E., et al. Covid-19 vaccine effectiveness against the omicron (B.1.1.529) variant. *N. Engl. J. Med.* 2022; 386(16): 1532–46. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2119451>
16. Grabowski F., Kochańczyk M., Lipniacki T. The spread of SARS-CoV-2 variant omicron with a doubling time of 2.0-3.3 days can be explained by immune evasion. *Viruses*. 2022; 14(2): 294. <https://doi.org/10.3390/v14020294>
17. Liu L., Iketani S., Guo Y., Chan J.F.W., Wang M., Liu L., et al. Striking antibody evasion manifested by the Omicron variant of SARS-CoV-2. *Nature*. 2022; 602(7898): 676–81. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04388-0>
18. Planas D., Saunders N., Maes P., Guivel-Benhassine F., Planchais C., Buchrieser J., et al. Considerable escape of SARS-CoV-2 Omicron to antibody neutralization. *Nature*. 2022; 602(7898): 671–5. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04389-z>
19. Conceicao C., Thakur N., Human S., Kelly J.T., Logan L., Bialy D., et al. The SARS-CoV-2 Spike protein has a broad tropism for mammalian ACE2 proteins. *PLoS Biol.* 2020; 18(12): e3001016. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001016>
20. Liu Y., Hu G., Wang Y., Ren W., Zhao X., Ji F., et al. Functional and genetic analysis of viral receptor ACE2 orthologs reveals a broad potential host range of SARS-CoV-2. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2021; 118(12): e2025373118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2025373118>
21. Gretebeck L.M., Subbarao K. Animal models for SARS and MERS coronaviruses. *Curr. Opin. Virol.* 2015; 13: 123–9. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.06.009>
22. Garry R.F. Mutations arising in SARS-CoV-2 spike on sustained human-to-human transmission and human-to-animal passage. *Virological*. 2021. Available at: <https://virological.org/t/mutations-arising-in-sars-cov-2-spike-on-sustained-human-to-human-transmission-and-human-to-animal-passage/578/14>
23. Bao L., Deng W., Huang B., Gao H., Liu J., Ren L., et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature*. 2020; 583(7818): 830–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2312-y>
24. Kant R., Kareinen L., Smura T., Freitag T.L., Jha S.K., Alitalo K., et al. Common laboratory mice are susceptible to infection with the SARS-CoV-2 beta variant. *Viruses*. 2021; 13(11): 2263. <https://doi.org/10.3390/v13112263>
25. Montagutelli X., Prot M., Levillayer L., Salazar E.B., Jouvion G., Conquet L., et al. *bioRxiv*. 2021. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.03.18.436013>
26. Shuai H., Chan J.F.W., Yuen T.T.T., Yoon C., Hu J.C., Wen L., et al. Emerging SARS-CoV-2 variants expand species tropism to murines. *EBioMedicine*. 2021; 73: 103643. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103643>
27. Zhang Y.N., Zhang Z.R., Zhang H.Q., Li N., Zhang Q.Y., Li X.D., et al. Different pathogenesis of SARS-CoV-2 Omicron variant in wild-type laboratory mice and hamsters. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022 Feb 25; 7(1): 62. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00930-2>
28. Imai M., Iwatsuki-Horimoto K., Hatta M., Loeber S., Halfmann P.J., Nakajima N., et al. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proc. Natl Acad. Sci USA*. 2020; 117(28): 16587–95. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009799117>
29. Gracheva A.V., Korchevaya E.R., Kudryashova A.M., Boriso-va O.V., Petrusheva O.A., Smirnova D.I., et al. Adaptation of the MTT assay for detection of neutralizing antibodies against the SARS-CoV-2 virus. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021; 98(3): 253–65. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-136> (in Russian)
30. Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* 2016; 5(2): 85–6. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>
31. Gracheva A.V., Korchevaya E.R., Ammour Y.I., Smirnova D.I., Sokolova O.S., Glukhov G.S., et al. Immunogenic properties of SARS-CoV-2 inactivated by ultraviolet light. *Arch. Virol.* 2022; 167(11): 2181–91. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05530-7>
32. Meng B., Abdullahi A., Ferreira I.A.T.M., Goonawardane N., Saito A., Kimura I., et al. Altered TMPRSS2 usage by SARS-CoV-2 Omicron impacts infectivity and fusogenicity. *Nature*. 2022; 603(7902): 706–14. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04474-x>
33. Suzuki R., Yamasoba D., Kimura I., Wang L., Kishimoto M., Ito J., et al. Attenuated fusogenicity and pathogenicity of SARS-CoV-2 Omicron variant. *Nature*. 2022; 603(7902): 700–5. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04462-1>
34. Kim Y.I., Kim S.G., Kim S.M., Kim E.H., Park S.J., Yu K.M., et al. Infection and rapid transmission of SARS-CoV-2 in ferrets. *Cell Host Microbe*. 2020; 27(5): 704–9.e2. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.023>

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-137>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Адаптация вируса оспы овец (*Poxviridae: Capripoxvirus: Sheeppox virus*) к линии клеток почки африканской зелёной мартышки и оценка его иммунобиологических свойств

Аманова Ж.Т., Саметова Ж.Ж., Булатов Е.А.

РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, 080409, Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан

Введение. Вспышки инфекционных заболеваний серьёзно препятствуют сохранению и увеличению поголовья мелкого рогатого скота. К числу таких инфекций относится оспа овец. По данным Всемирной организации здравоохранения животных, в 2021 г. вспышки были зарегистрированы в таких странах, как Турция, Израиль, Китай, Мальдивы, Монголия, Таиланд, Россия, Алжир, Кения, а в 2019 г. в Мангистауской и Атырауской областях Казахстана. С целью предотвращения проникновения инфекции из соседних стран в республике ежегодно проводится плановая иммунизация овец группы риска живой аттенуированной вакциной производства Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись вакцинный штамм НИСХИ и вирулентный штамм А вируса оспы овец. Система культивирования вируса – культура клеток Vero. Для определения безвредности и иммуногенности использовали овец казахской тонкорунной породы в возрасте от 6 до 12 мес. При исследовании применяли вирусологические, серологические и иммунобиологические методы.

Результаты. Приведены результаты исследования по адаптации штамма НИСХИ вируса оспы овец к перевиваемой линии клеток Vero. Пятикратное пассирование на перевиваемой линии клеток Vero привело к адаптации штамма НИСХИ с проявлением цитопатогенного эффекта, специфичного для вируса оспы овец, с титром $6,50 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$. При тестировании на овцах адаптированный к перевиваемой линии клеток Vero испытуемый штамм оказался для них безвредным и на 7-е сутки после иммунизации стимулировал формирование иммунитета против оспы овец у животных со средним значением защитного титра $1,8 \log_2$, которое увеличилось на 21-е сутки до $4,33 \log_2$.

Заключение. Установлено, что штамм НИСХИ вируса оспы овец сохраняет свои вирусологические и иммунобиологические свойства при репродукции в перевиваемой линии клеток Vero.

Ключевые слова: оспа овец; линия клеток Vero; пассаж; культивирование; безопасность

Для цитирования: Аманова Ж.Т., Саметова Ж.Ж., Булатов Е.А. Адаптация вируса оспы овец (*Poxviridae: Capripoxvirus: Sheeppox virus*) к линии клеток почки африканской зелёной мартышки и оценка его иммунобиологических свойств. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(5): 450-458. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-137>

Для корреспонденции: Булатов Ербол Аkenovich, канд. биол. наук, заведующий лабораторией технологии культивирования микроорганизмов, РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, 080409, Жамбылская область, Кордайский район, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан. E-mail: erbol_km@mail.ru

Участие авторов: Аманова Ж.Т. – анализ литературных данных, оформление статьи, проведение экспериментов, концепция и дизайн исследования; Саметова Ж.Ж. – проведение экспериментов, постановка серологических реакций; Булатов Е.А. – руководство, планирование, обработка результатов исследований, одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания «Услуги по обеспечению биологической безопасности в сфере науки» на 2022 г.

Благодарности. Авторы выражают признательность руководству РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Министерства здравоохранения Республики Казахстан и сотрудникам лаборатории технологии культивирования микроорганизмов.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией.

Этические утверждения. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования был одобрен Комитетом по этике экспериментов на животных РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Министерства здравоохранения Республики Казахстан (протокол 1510/14).

Поступила 30.08.2022

Принята в печать 04.10.2022

Опубликована 31.10.2022

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-137>

Adaptation of the sheep pox virus (Poxviridae: *Capripoxvirus: Sheeppox virus*) to African green monkey kidney cell line and evaluation of its immunobiological properties

Zhanat T. Amanova, Zhanna Zh. Sametova, Yerbol A. Bulatov

Research Institute for Biological Safety Problems of Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, 080409, Gvardeyskiy vill., Zhambyl region, Korday district, Republic of Kazakhstan

Introduction. Outbreaks of infectious diseases seriously hinder the preservation and increase of the number of small ruminants. Such infections include sheep pox virus (SPPV). According to the OIE data of 2021, SPP outbreaks were registered in countries such as Turkey, Israel, China, Maldives, Mongolia, Thailand, Russia, Algeria, Kenya, and in 2019 in Mangistau and Atyrau regions. In Kazakhstan annually conducts routine immunization of sheep at risk with a live attenuated vaccine produced by RIBSP.

Materials and methods. The object of the study was the vaccine strain of NISHI and the virulent strain A of the sheep pox virus. The virus was propagated in Vero cells. To determine the harmlessness and immunogenicity, sheep of the Kazakh fine-wool breed aged from 6 to 12 months were used. Virological, serological and immunobiological methods were used in the study.

Results. The results of the adaptation of the NISHI strain of SPPV to the Vero cell line are presented. Five passages in Vero cells resulted to the adaptation of the NISHI strain with the manifestation of a cytopathogenic effect specific to SPPV with a titer of 6.50 lg TCD₅₀/ml. Following immunization, the formation of immunity was observed in animals on day 7 with an average protective titer 1.8 log₂, which increased by day 21 to 4.33 log₂.

Conclusion. It has been established that the NISHI strain of SPPV retains its virological and immunobiological properties during reproduction in a Vero cell line.

Keywords: *sheep pox; Vero cell line; passage; cultivation; safety*

For citation: Amanova Zh.T., Sametova Zh.Zh., Bulatov Ye.A. Adaptation of the sheep pox virus (Poxviridae: *Capripoxvirus: Sheeppox virus*) to African green monkey kidney cell line and evaluation of its immunobiological properties. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(5): 450-458 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-137>

For correspondence: Yerbol A. Bulatov, PhD (Biol.), Head of the Laboratory of Technology of cultivation of Microorganisms, Research Institute for Biological Safety Problems of Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, 080409, Gvardeyskiy vill., Zhambyl region, Korday district, Republic of Kazakhstan. E-mail: erbol_km@mail.ru

Information about the authors:Amanova Zh.T., <https://orcid.org/0000-0002-3987-6814>Sametova Zh.Zh., <https://orcid.org/0000-0002-2332-2841>Bulatov Ye.A., <https://orcid.org/0000-0001-8543-4219>

Contribution: Amanova Zh.T. – analysis of literary data, design of the article, conducting experiments, concept, and design of the study; Sametova Zh.Zh. – conducting experiments, staging serological reactions; Bulatov Ye.A. – management, planning, processing of research results, approval of the final version of the article for publication.

Funding. The work was carried out within the framework of the state task «Biological safety services in the field of science» for 2022.

Acknowledgement. The authors express their gratitude to the management of the Research Institute of Biological Safety Problems and the staff of the Laboratory of Microbial Cultivation Technology.

Conflict of interest. The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication.

Ethical approval. The authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with the Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). The protocol of the study was approved by the Committee on Ethics of Animal Experiments of the Research Institute of Biological Safety Problems of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan (protocol 1510/14).

Received 30 August 2022

Accepted 04 October 2022

Published 31 October 2022

Введение

Животноводство является одной из важнейших отраслей агропромышленного комплекса Республики Казахстан (РК) и вносит значительный вклад в национальную экономику. С каждым годом поголовье овец в стране увеличивается, что делает оптимальное содержание этих животных чрезвычайно важным. Однако внезапные вспышки инфекционных заболеваний серьёзно препятствуют сохранению и увеличению поголовья мелкого рогатого скота (МРС), повышению продуктивности и улучшению качества продукции, оказывая значительное влияние на экономику страны. К числу таких инфекционных заболеваний МРС относится оспа овец (ОО).

ОО является одной из наиболее распространённых инфекционных болезней среди МРС, классифицированных Всемирной организацией здравоохранения животных (Международное эпизоотическое бюро – МЭБ) как заболевание, подлежащее уведомлению. Болезнь эндемична в Африке (к северу от экватора), на Ближнем Востоке, в Центральной Азии и на Индийском субконтиненте [1, 2]. ОО оказывает значительное влияние на продуктивность МРС из-за снижения удоя молока, повреждения шкур и смертности [3, 4]. Смертность у молодых животных может превышать 50%, а иногда достигать и 100% [5, 6].

По данным МЭБ, в 2021 г. вспышки ОО были зарегистрированы в таких странах, как Турция, Израиль, Китай, Мальдивы, Монголия, Таиланд, Россия, Алжир, Кения, Коморские острова, Тунис и Уганда [7].

Следует отметить, что в 2019 г. в сельском округе Кызылозен Тупкарагайского района Мангистауской области, а также в селе Сундук Курмангазинского района Атырауской области РК были зарегистрированы вспышки оспы МРС. Благодаря экстренным мерам, принятым ветеринарными службами РК, инфекцию удалось локализовать [8]. Борьба с этим заболеванием жизненно важна для повышения продуктивности МРС. Для профилактики ОО доступны различные типы вакцин, но живая аттенуированная вакцина является лучшим выбором, так как она обеспечивает длительный иммунитет [9]. Использование инактивированной вакцины имеет целый ряд недостатков, таких как высокие дозы и короткая продолжительность иммунитета [10].

Овец в основном иммунизируют живыми вакцинами из аттенуированных штаммов Romania, Bakirkoy, RM65, KSGP O-240 и KSGP O-180. В Северной Африке и на Ближнем Востоке для защиты овец от оспы в основном используется румынский штамм, в то время как в Восточной Африке обычно используются KSGP O-240 и KSGP O-180. В Турции вакцинация овец проводится с использованием штамма Bakirkoy, в то время как в Иране – RM65 [11]. В странах СНГ широко используются штаммы НИСХИ, Б/5-96 и ВНИИЗЖ вируса ОО [12].

Ветеринарная служба РК с целью предотвращения проникновения ОО из соседних или отдалённых стран ежегодно проводит плановую профилактическую иммунизацию овец группы риска живой аттенуированной вакциной против названной инфекции из штам-

ма НИСХИ производства Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (НИИПББ) РК. Согласно технологии производства данной вакцины, балк-продукт получают путём культивирования вакцинного штамма НИСХИ в первично-трипсинизированной культуре клеток почки ягнёнка. Однако системы первичных и диплоидных клеточных культур в настоящее время заменяются использованием перевиваемых клеточных линий. Эти субстраты получают всё большее признание в биотехнологии, поскольку улучшенные технологии скрининга устраняют опасения относительно их потенциальных онкогенных свойств [13]. В то же время современные требования, предъявляемые к эффективности и безопасности ветеринарных препаратов, а также их качественному производству с соблюдением правил GMP (Good Manufacturing Practice – Надлежащая производственная практика) приводят к совершенствованию технологий изготовления вакцинных препаратов, производство которых сводится к культивированию высокоиммуногенных вакцинных штаммов различных вирусов в перевиваемой клеточной линии [14–18].

В связи с этим с целью устранения негативных явлений, связанных с затратами на получение промышленных серий клеточной культуры почки ягнёнка, в качестве клеточного субстрата для культивирования производственного штамма НИСХИ была выбрана перевиваемая клеточная линия Vero. Она является наиболее известной перевиваемой клеточной линией, предназначенной для производства вирусных вакцин для медицинского и ветеринарного применения.

Целью данной исследовательской работы является адаптация штамма НИСХИ вируса ОО к перевиваемой линии клеток Vero.

Материалы и методы

Штаммы

Использован аттенуированный вакцинный штамм НИСХИ вируса ОО с инфекционной активностью $10^{5.5}$ lg ТЦД₅₀/мл. Штамм депонирован в коллекции микроорганизмов НИИПББ (РК).

Вирулентный штамм А вируса ОО в виде органо-тканевого лиофилизированного материала был получен из лаборатории коллекции микроорганизмов НИИПББ (РК).

Культура клеток

Адаптация вакцинного штамма НИСХИ вируса ОО и титрование вирусных материалов были проведены в культуре клеток Vero, полученной из лаборатории клеточной биотехнологии НИИПББ (РК).

Животные и их подготовка к опыту

В опытах использовались овцы тонкорунной казахской породы в возрасте от 6 до 12 мес. с живой массой 18–20 кг, доставленные из хозяйств, благополучных по острым инфекционным заболеваниям, и серонегативных к вирусу ОО.

Перед постановкой экспериментов на животных была проведена их идентификация. Идентифициро-

ванные животные были помещены на карантин в течение 1 мес. с термометрией, клиническим обследованием и анализом сыворотки крови на наличие специфических антител к вирусу ОО в соответствии с методом OIE (Office International des Epizooties – МЭБ) [19]. В опыте использовались животные, у которых не было обнаружено специфических антител к вирусу ОО и без истории вакцинации против этой инфекции.

Эксперименты проводились в специально оборудованных помещениях для животных ABSL-2 (Animal Biosafety Level 2). По прибытии в помещения для животных НИИПББ овец пронумеровали и оставили для акклиматизации в течение 2 нед. до начала эксперимента. Каждая группа была помещена в отдельную комнату без прямого контакта друг с другом. Подопытные животные имели свободный доступ к воде и пище на протяжении всего эксперимента.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования был одобрен Комитетом по этике экспериментов на животных РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Министерства здравоохранения Республики Казахстан (протокол 1510/14).

Адаптация штамма НИСХИ к перевиваемой линии клеток Vero

Для адаптации штамма НИСХИ вируса ОО к перевиваемой линии клеток Vero проведено 10 последовательных пассажей вируса на данной культуре. В процессе работы культуры клеток Vero, выращенные на матрасах площадью 300 см², были инфицированы вирусом ОО в дозе 0,1 ТЦД₅₀/кл. В качестве поддерживающей питательной среды использована среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), содержащая 2% фетальной бычьей сыворотки. Инфицированные культуры клеток ежедневно контролировались с помощью светового микроскопа для обнаружения характерных к вирусу ОО цитопатических изменений в монослое клеток. В качестве контроля были использованы неинфицированные матрасы с культурой клеток из этой же партии, в которых через двое суток была проведена смена питательной среды.

По достижении цитопатического действия в монослое культуры клеток Vero на 85–90% матрасы подвергались двум циклам замораживания/оттаивания в пределах от –40 °С до комнатной температуры. Сбор вирусосодержащих материалов (ВСМ) каждого пассажа проводился в стерильные флаконы в асептических условиях. Одновременно из каждого флакона с ВСМ отбирались пробы для определения биологической активности вируса в соответствии с методом Ж.Т. Амановой и соавт. [20]. Титр вируса был рассчитан с использованием метода I.J. Reed и H.A. Muench и был указан в lg ТЦД₅₀/см³ [21]. Стерильность ВСМ каждого пассажа была определена согласно ГОСТ 28085-2013 [22].

Определение специфичности штамма НИСХИ

Специфичность штамма НИСХИ, адаптированного к клеточной линии Vero, определялась проявлением цитопатических изменений, специфичных для вируса ОО, а также с использованием классической тест-системы ПЦР (полимеразная цепная реакция) [23].

Лиофилизация штамма НИСХИ

ВСМ был объединён с комбинацией стабилизирующей среды (пептон – сахароза в конечной концентрации 3–5%) в соотношении 1 : 1 с последующим добавлением антибиотиков (пенициллин 500 000 ЕД и стрептомицин 0,5 г на 1 дм³ смеси). Полученный балк-продукт был разлит в стерильные ампулы по 1,0 см³ с помощью вакуумного шприца и высушен методом лиофилизации согласно методике Ж.Т. Амановой и соавт. [24].

Оценка безвредности штамма НИСХИ

Штамм НИСХИ был протестирован на овцах (3 головы) путём подкожной инъекции штамма в дозе 10⁵ ТЦД₅₀/мл в объёме 1,0 см³. Контрольные животные (3 головы) были иммунизированы по 1,0 см³ подкожно фосфатно-солевым буфером (PBS). Испытуемые животные ежедневно наблюдались клинически, проводился осмотр места аппликации и общего состояния животных с измерением ректальных температур в течение 14 сут.

Вакцинный штамм считался безвредным, если он не вызывал гибели овец и каких-либо клинических признаков заболевания и патологических изменений в месте введения вакцины в течение 14 сут. В то же время у некоторых овец допускалось повышение температуры тела до 41,0 °С в течение 1–4 сут, а у некоторых животных (до 20%) – образование воспалительного отёка в месте инъекции в виде уплотнений (в течение 3–5 сут).

Оценка иммуногенности штамма НИСХИ

Для определения иммуногенности штамма НИСХИ были сформированы 3 экспериментальные группы по 3 головы и 3 контрольные группы по 2 головы овец в каждой. Экспериментальные группы животных были иммунизированы в подмышечную область испытываемым штаммом в дозе 1000 ТЦД₅₀ в объёме 1,0 см³. На 7, 14 и 21-е сутки после введения штамма у животных были отобраны образцы крови для определения титра сывороточных антител к вирусу ОО. В течение вышеупомянутых периодов экспериментальным и контрольным животным внутрикожно в область подхвостовой складки вводился вирулентный штамм А вируса ОО в дозе 1000 ИД₅₀. Экспериментальные овцы клинически наблюдались в течение 14 сут с ежедневной термометрией.

Иммуногенность штамма НИСХИ оценивали в реакции нейтрализации по наличию антител к вирусу ОО [20], а также по результатам контрольных заражений вирулентным штаммом ОО.

Статистическая обработка результатов исследования

Статистический анализ проводился с использованием Prism 8.0.1 Release Notes от GraphPad. Результаты серологического теста после вакцинации обеими вакцинами, а также разница между группами после заражения контрольным вирусом были проанализированы с помощью двустороннего теста ANOVA. Значение $p \leq 0,05$ считалось статистически значимым. Разница в эффективности между группами вычислялась с помощью одностороннего точного критерия Фишера для двух пропорций при уровне значимости $\alpha < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В ходе работы по адаптации штамма НИСХИ вируса ОО к перевиваемой линии клеток Vero было проведено 10 последовательных пассажей (рис. 1). Начиная с первого пассажа, наблюдалось размножение вируса ОО, однако в первых двух пассажах признаки деструктивных изменений клеток проявлялись на 3-и сутки культивирования, тогда как в остальных пассажах первые признаки цитопатических клеточных из-

менений, характерные для вируса ОО, были отмечены на 2-е сутки культивирования. На 5–6-е сутки культивирования вируса ОО 80–90% клеточного пласта было им разрушено, при этом цитопатогенное действие вируса проявлялось в виде округлых клеток, которые впоследствии образовали очаги и на 5–6-е сутки культивирования отделились от стенок матраса, образуя окошки (рис. 2).

Биологическая активность штамма НИСХИ постепенно повысилась до 5-го пассажа. В последующих пассажах (от 6-го до 10-го) титр вируса ОО колебался от 6,17 до 6,33 lg ТЦД₅₀/мл. В то же время ВСМ ОО с наибольшей активностью был получен на 5-м пассаже с титром 6,50 lg ТЦД₅₀/мл, тогда как ВСМ ОО с наименьшей активностью был получен на начальном пассаже с титром 5,50 lg ТЦД₅₀/мл.

На основании полученных результатов исследований для последующих экспериментов использовали ВСМ, полученный на 5-м пассаже с титром 6,50 lg ТЦД₅₀/мл.

Для определения специфичности штамма НИСХИ, адаптированного к клеточной линии Vero, использо-

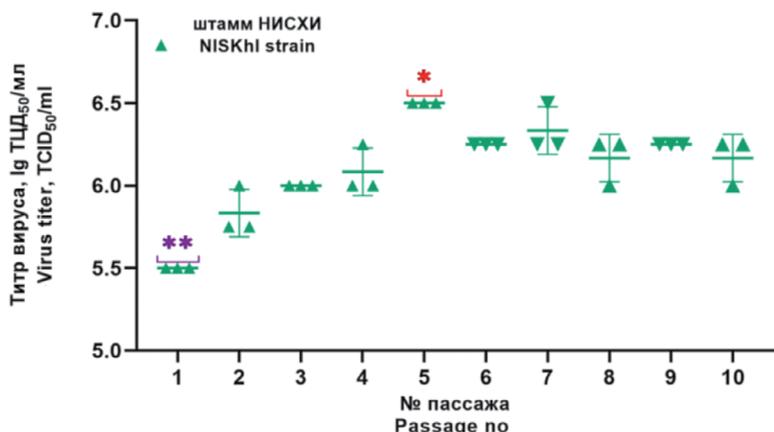


Рис. 1. Динамика накопления инфекционной активности штамма НИСХИ в культуре клеток Vero.

*Максимальный титр вируса. **Минимальный титр вируса.

Fig. 1. Dynamics of accumulation of the NISHI strain in Vero cell culture. *Maximum virus titer. **Minimum virus titer.

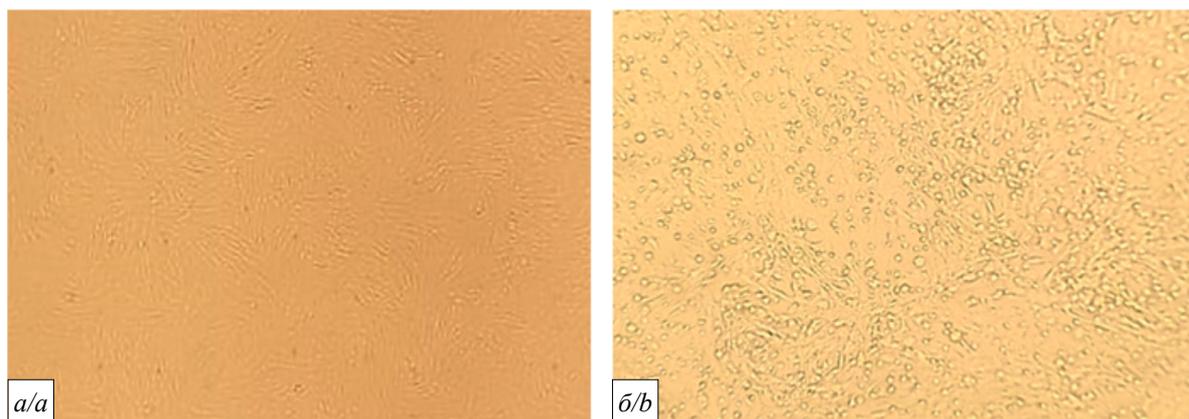


Рис. 2. Цитопатическое действие вируса оспы овец на культуре клеток Vero: *a* – контрольная культура клеток Vero; *b* – инфицированная вирусом оспы овец культура клеток Vero.

Fig. 2. Cytopathic action of the sheep pox virus on Vero cell culture: *a* – control culture of Vero cells; *b* – Vero cell culture infected with sheep pox virus.

Таблица 1. Результаты ПЦР-исследования на наличие вируса оспы овец в пробах вирусосодержащих материалов

Table 1. Results of a PCR testing for sheep pox virus in samples of virus-containing material

Исследуемый агент Research material	Пассажный уровень Passage	Наличие ДНК вируса оспы овец The presence of the DNA of the sheep pox virus
Штамм НИСХИ вируса оспы овец Strain NISHI of sheep pox virus	1-й	+
	2-й	+
	3-й	+
	4-й	+
	5-й	+
	K ⁺	+
	K ⁻	-

Примечание. K⁺ – положительный контроль; K⁻ – отрицательный контроль; «+» – положительный; «-» – отрицательный.

Note/ K⁺ – positive control; K⁻ – negative control; «+» – positive; «-» – negative.

вали пробы ВСМ ОО, полученные до 5-го пассажа. Результаты представлены в табл. 1.

ДНК вируса была обнаружена во всех пробах ВСМ ОО. Следовательно, во время пассирования вируса ОО на культуре клеток Vero были получены ВСМ, специфичные для данного вируса.

Лиофилизация штамма НИСХИ, адаптированного к линии клеток Vero

ВСМ ОО (100 мл) с биологической активностью 6,50 lg ТЦД₅₀/мл, полученный на 5-м пассажном уровне, объединяли с комбинацией стабилизирующей среды «пептон – сахароза» (в конечной концентрации 3–5% соответственно) в соотношении 1 : 1, добавляли антибиотики (пенициллин 50 000 ЕД и стрептомицин 0,05 г на 100 см³ смеси) и разливали в стерильные ампулы по 1,0 см³ с помощью вакуумного шприца. После готовый балк-продукт высушивали методом лиофилизации. Биологические и физические характеристики лиофилизированного штамма НИСХИ представлены в табл. 2.

Таким образом, был получен стерильный лиофилизированный штамм НИСХИ, адаптированный

Таблица 2. Биологические и физические характеристики лиофилизированного штамма НИСХИ

Table 2. Biological and physical characteristics of the lyophilized NISKHI strain

Наименование вируса Name of the virus	Титр вируса после лиофилизации, lg ТЦД ₅₀ /мл Virus titer after lyophilization, lg TCD ₅₀ /ml	Стерильность лиофилизированного штамма Sterility of the lyophilized strain	Физические показатели вакцины после лиофилизации Physical parameters of the vaccine after lyophilization
Штамм НИСХИ вируса оспы овец NISHI strain of sheep pox virus	6,25 ± 0,00	–	Однородная таблетка светло-коричневого цвета Homogeneous tablet of light brown color

Примечание. «-» – стерильно.

Note. «-» – sterile.

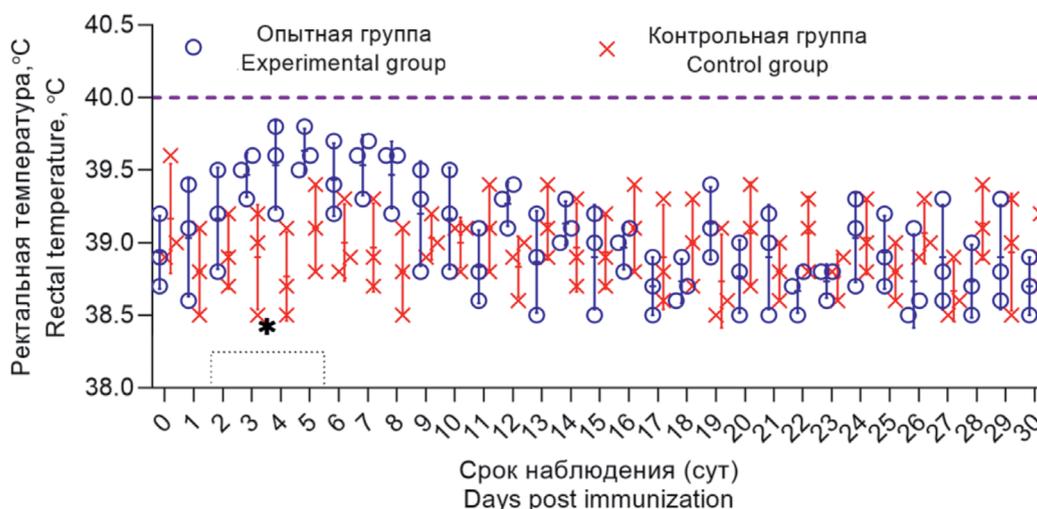


Рис. 3. Динамика ректальной температуры овец, иммунизированных штаммом НИСХИ вируса оспы овец.

*Местные реакции, возникшие после введения штамма у 3 овец, наблюдались в течение 5 сут.

Fig. 3. Dynamics of rectal temperature of sheep immunized with the NISHI strain of the sheep pox virus.

*Local reactions that appeared post immunization in 3 sheep were observed for 5 days.

к культуре клеток Vero, с биологической активностью 6,25 lg ТЦД₅₀/мл.

Оценка безвредности штамма НИСХИ, адаптированного к линии клеток Vero

Подкожное введение вируса ОО в бесшёрстный участок подмышечной области в исходном разведении по 1,0 см³ в дозе 10⁵ ТЦД₅₀/мл не вызывало заболевания и гибели овец в течение 30 сут. Ректальная температура иммунизированных овец была в преде-

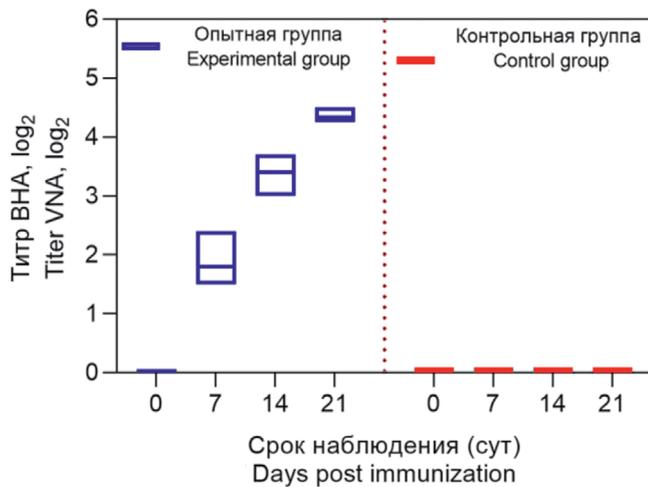


Рис. 4. Титры вируснейтрализующих антител у овец, привитых штаммом НИСХИ, по сравнению с контрольными животными.

Fig. 4. Virus neutralizing antibody titers in sheep immunized with the NISHI strain compared to control animals.

лах нормы (рис. 3). Лишь у 3 из 5 овец после вакцинации наблюдались местные реакции в виде уплотнения, которые самостоятельно рассосались в течение 4 сут.

Таким образом, штамм НИСХИ вируса ОО, адаптированный к перевиваемой культуре клеток Vero, является безвредным для овец.

Оценка иммуногенности штамма НИСХИ, адаптированного к линии клеток Vero

Через 7, 14 и 21 день после введения штамма НИСХИ в экспериментальных группах животных титр нейтрализующих антител к гомологичным агентам находился в диапазоне 1,8–4,33 log₂. В крови контрольных овец антитела к вирусу ОО отсутствовали (рис. 4).

В результате контрольного заражения обеих групп овец вирулентным штаммом А вируса ОО установлено, что овцы опытной группы проявляют устойчивость к вирусу ОО в течение 2 нед. При этом животные оставались здоровыми, за исключением припухлостей у 3 овец в месте инъекции вирулентного вируса размером 1,0 × 1,2 см, которые рассосались через 3–4 дня после заражения. Температура тела овец была в пределах физиологической нормы (рис. 5).

У контрольных животных первичные клинические поражения с развитием местной реакции в виде отёка плотной консистенции размером до 4 × 5 см начались на 2–3-й день после контрольного заражения. На 5-е сутки ректальная температура инфицированных овец достигла 40,8 °С. Пик пирексии (> 41,2 °С) был отмечен на 7-е сутки после заражения. Ректальная температура у больных животных начала нормализовыв-

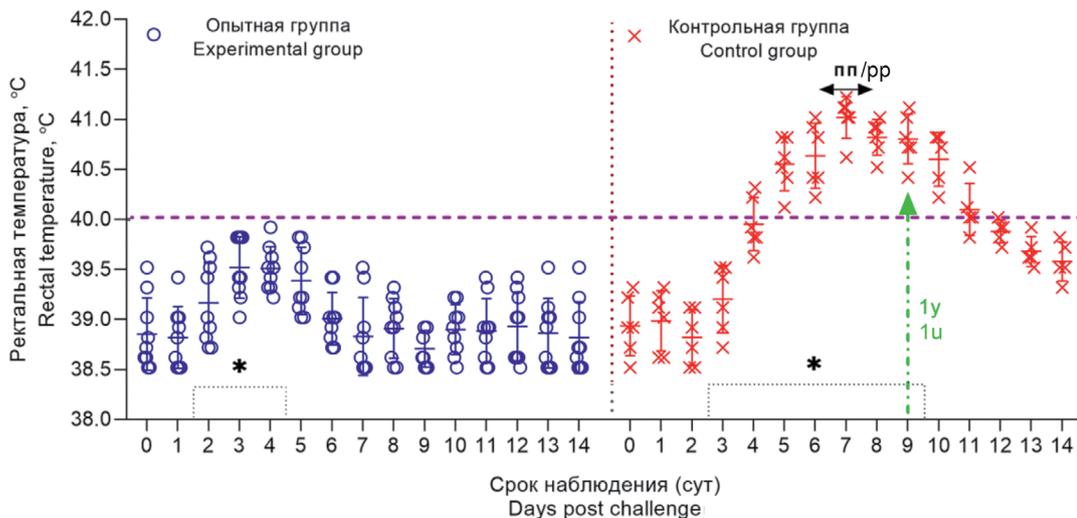


Рис. 5. Динамика изменения ректальной температуры овец опытной и контрольной групп после контрольного заражения вирулентным штаммом А вируса оспы овец.

Пунктирная линия на графике показывает верхний предел нормальной температуры тела; **пп** – пик пирексии у контрольных овец; **1у** – на 9-е сутки одна овца усыплена в связи с ухудшением общего состояния.

*Срок местных реакций, возникшие после инфицирование овец опытной и контрольной групп.

Fig. 5. Dynamics of changes in body temperature of sheep in experimental and control groups after control infection with virulent strain A of the SPP virus.

The dotted line in the graph shows the upper limit of the normal body temperature; **pp** – peak pyrexia in control sheep; **1u** – on day 9 post challenge one sheep in the control group was humanely euthanized due to the deterioration of the general condition.

*The duration of local reactions that occurred after infection in sheep from the experimental and control groups.

ваться на 11–12-е сутки после контрольных испытаний (рис. 5).

На 5-е сутки одновременно с лихорадкой у всех подопытных животных наблюдались водянистые и слизисто-гнойные выделения из глаз и носа, а также поражения кожи (красные высыпания) диаметром 0,5–0,7 см на внутренней поверхности кожи передних и задних конечностей, коже вымени. У большинства больных животных (70%) наблюдалась потеря аппетита. На 9-е сутки одна овца контрольной группы (отобранная на 21-е сутки) была гуманно усыплена после контрольного заражения в связи с ухудшением общего состояния. В дополнение к вышеуказанным клиническим признакам у вынужденно усыпленной овцы наблюдались затрудненное дыхание, периодический кашель, а также умеренная депрессия. Выздоровевшие животные (5 голов) по истечении срока контрольных испытаний (14 сут) были обработаны антибиотиками и содержались в карантине до полного выздоровления.

Таким образом, было установлено, что штамм НИСХИ, адаптированный к перевиваемой культуре клеток Vero, при однократной иммунизации формирует у овец напряжённый иммунитет, обеспечивающий надёжную защиту от ОО.

Заключение

Анализируя полученные данные, можно заключить, что штамм НИСХИ сохраняет свои вирусологические и иммунобиологические свойства при репродукции в перевиваемой линии клеток Vero, что позволяет использовать данную клеточную линию для культивирования штамма НИСХИ при изготовлении профилактического препарата против ОО.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boumart Z., Daouam S., Belkourati I., Rafi L., Tuppurainen E., Tadlaoui K.O., et al. Comparative innocuity and efficacy of live and inactivated sheeppox vaccines. *BMC Vet. Res.* 2016; 12(1): 133. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0754-0>
2. Yogisharadhya R., Bhanuprakash V., Hosamani M., Venkatesan G., Balamurugan V., Bora D.P., et al. Comparative efficacy of live replicating sheeppox vaccine strains in Ovines. *Biologicals.* 2011; 39(6): 417–23. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.09.010>
3. Yeraham I., Yadin H., Van Ham M., Bumbarov V., Soham A., Perl S. Economic and epidemiological aspects of an outbreak of sheeppox in a dairy sheep flock. *Vet. Rec.* 2007; 160(7): 236–7. <https://doi.org/10.1136/vr.160.7.236>
4. Yune N., Abdela N. Epidemiology and economic importance of sheep and goat pox: a review on past and current aspects. *J Vet. Sci. Technol.* 2017; 8(2): 430. <https://doi.org/10.4262/2157-7579.1000430>
5. Bhanuprakash V., Indrani B.K., Hosamani M., Singh R.K. The current status of sheep pox disease. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2006; 29(1): 27–60. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2005.12.001>
6. Парилов С.В., Книзе А.В., Балышев В.М. Анализ и прогноз мировой эпизоотической ситуации по оспе овец и коз и чуме мелких жвачных животных в 2011–2015 гг.: научное издание. *Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета.* 2011; (69): 423–32.
7. Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор). Эпизоотическая ситуация в мире по данным МЭБ. Available at: <https://www.fsvps.ru/fsvps/iac/foreign.html>

8. OIE. World Organization for Animal Health. Information received on 04/05/2019 from Committee for Veterinary Control and Supervision. Nur-Sultan, Kazakhstan: Ministry of Agriculture; 2019.
9. Tuppurainen E., Babiuk S., Klement E. *Lumpy Skin Disease.* Berlin/Heidelberg: Springer International Publishing AG; 2018.
10. Awad M., Michael A., Soliman S.M., Samir S.S., Daoud A.M. Trials for preparation of inactivated sheep pox vaccine using binary ethyleneimine. *Egypt. J. Immunol.* 2003; 10(2): 67–72.
11. Hamdi J., Munyanduki H., Omari Tadlaoui K., El Harrak M., Fassi Fihri O. Capripoxvirus infections in ruminants: a review. *Microorganisms.* 2021; 9(5): 902. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050902>
12. Балышев В.М., Калантаенко Ю.Ф., Горшкова Т.Ф., Парилов С.В. Ассоциированная вакцина против оспы овец и чумы мелких жвачных животных. Патент РФ 2406535 C1; 2010.
13. Barrett P.N., Mundt W., Kistner O., Howard M.K. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Rev. Vaccines.* 2009; 8(5): 607–18. <https://doi.org/10.1586/erv.09.19>
14. Trabelsi K., Majoul S., Rourou S., Kallel H. Process intensification for an enhanced replication of a newly adapted RM-65 sheep pox virus strain in Vero cells grown in stirred bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 2014; 90: 131–9. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.06.001>
15. Montagnon B., Vincent-Falquet J.C., Fanget B. Thousand litre scale microcarrier culture of Vero cells for killed polio virus vaccine. *Dev. Biol. Stand.* 1984; 55: 37–42.
16. Trabelsi K., Rourou S., Loukil H., Majoul S., Kallel H. Optimization of virus yield as a strategy to improve rabies vaccine production by Vero cells in a bioreactor. *J. Biotechnol.* 2006; 121(2): 261–71. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.07.018>
17. Rourou S., van der Ark A., Majoul S., Trabelsi K., van der Velden T.T., Kallel H. A novel animal-component-free medium for rabies virus production in Vero cells grown on Cytodex 1 microcarriers in a stirred bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 85(1): 53–63. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2064-y>
18. Srivastava A.K., Putnak J.R., Lee S.H., Hong S.P., Moon S.B., Barvir D.A., et al. A purified inactivated Japanese encephalitis virus vaccine made in Vero cells. *Vaccine.* 2001; 19(31): 4557–65. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00208-0](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00208-0)
19. *Testerial Manual. Chapter 3.7.12. Sheep Pox and Goat Pox.* OIE; 2018: 1513–24.
20. Аманова Ж.Т., Таранов Д.С., Ершебулов З.Д., Жугунисов К.Д., Баракбаев К.Б., Булатов Е.А. и др. Оценка эффективности ассоциированной вакцины против чумы мелких жвачных животных и оспы овец. *Ветеринария.* 2016; (9): 21–4.
21. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27(3): 493–7.
22. ГОСТ 28085-2013. Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Методы контроля стерильности; 2014.
23. Зайцев В.Л., Сандыбаев Н.Т., Султанкулова К.Т., Белоусов В.Ю., Червякова О.В., Строчков В.М. *Вирус оспы овец: молекулярно-биологические свойства и структура генома.* Алматы; 2011.
24. Аманова Ж.Т., Жугунисов К.Д., Булатов Е.А., Жунушов А.Т., Саметова Ж.Ж., Шаяхметов Е.А. и др. Оценка эффективности стабилизирующих сред при лиофилизации и хранении ассоциированной вакцины против чумы мелких жвачных животных и оспы овец. *Известия Национальной академии наук Кыргызской Республики.* 2020; (2): 25–34.

REFERENCES

1. Boumart Z., Daouam S., Belkourati I., Rafi L., Tuppurainen E., Tadlaoui K.O., et al. Comparative innocuity and efficacy of live and inactivated sheeppox vaccines. *BMC Vet. Res.* 2016; 12(1): 133. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0754-0>
2. Yogisharadhya R., Bhanuprakash V., Hosamani M., Venkatesan G., Balamurugan V., Bora D.P., et al. Comparative efficacy of live replicating sheeppox vaccine strains in Ovines. *Biologicals.* 2011; 39(6): 417–23. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2011.09.010>
3. Yeraham I., Yadin H., Van Ham M., Bumbarov V., Soham A., Perl S. Economic and epidemiological aspects of an outbreak of sheeppox in a dairy sheep flock. *Vet. Rec.* 2007; 160(7): 236–7. <https://doi.org/10.1136/vr.160.7.236>

4. Yune N., Abdela N. Epidemiology and economic importance of sheep and goat pox: a review on past and current aspects. *J Vet. Sci. Technol.* 2017; 8(2): 430. <https://doi.org/10.4262/2157-7579.1000430>
5. Bhanuprakash V., Indrani B.K., Hosamani M., Singh R.K. The current status of sheep pox disease. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2006; 29(1): 27–60. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2005.12.001>
6. Parilov S.V., Knize A.V., Balyshv V.M. Worldwide distribution analysis & prognosis for sheep & goat pox and peste des petits ruminants in 2011–2015. *Politematicheskii setevoy elektronnyy nauchnyy zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta.* 2011; (69): 423–32. (in Russian)
7. Federal Service for Veterinary and Phytosanitary Surveillance (Rosselkhozadzor). The epizootic situation in the world according to the OIE. Available at: <https://www.fsvps.ru/fsvps/iac/foreign.htm>
8. OIE. World Organization for Animal Health. Information received on 04/05/2019 from Committee for Veterinary Control and Supervision. Nur-Sultan, Kazakhstan: Ministry of Agriculture; 2019.
9. Tuppurainen E., Babiuk S., Klement E. *Lumpy Skin Disease.* Berlin/Heidelberg: Springer International Publishing AG; 2018.
10. Awad M., Michael A., Soliman S.M., Samir S.S., Daoud A.M. Trials for preparation of inactivated sheep pox vaccine using binary ethyleneimine. *Egypt. J. Immunol.* 2003; 10(2): 67–72.
11. Hamdi J., Munyanduki H., Omari Tadlaoui K., El Harrak M., Fassi Fihri O. Capripoxvirus infections in ruminants: a review. *Microorganisms.* 2021; 9(5): 902. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050902>
12. Balyshv V.M., Kalantaenko Yu.F., Gorshkova T.F., Parilov S.V. Combined vaccine against sheep pox and peste des petits ruminants. Patent RF 2406535 S1; 2010. (in Russian)
13. Barrett P.N., Mundt W., Kistner O., Howard M.K. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Rev. Vaccines.* 2009; 8(5): 607–18. <https://doi.org/10.1586/erv.09.19>
14. Trabelsi K., Majoul S., Rourou S., Kallel H. Process intensification for an enhanced replication of a newly adapted RM-65 sheep pox virus strain in Vero cells grown in stirred bioreactor. *Biochem. Eng. J.* 2014; 90: 131–9. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.06.001>
15. Montagnon B., Vincent-Falquet J.C., Fanget B. Thousand litre scale microcarrier culture of Vero cells for killed polio virus vaccine. *Dev. Biol. Stand.* 1984; 55: 37–42.
16. Trabelsi K., Rourou S., Loukil H., Majoul S., Kallel H. Optimization of virus yield as a strategy to improve rabies vaccine production by Vero cells in a bioreactor. *J. Biotechnol.* 2006; 121(2): 261–71. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.07.018>
17. Rourou S., van der Ark A., Majoul S., Trabelsi K., van der Velden T.T., Kallel H. A novel animal-component-free medium for rabies virus production in Vero cells grown on Cytodex 1 microcarriers in a stirred bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009; 85(1): 53–63. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2064-y>
18. Srivastava A.K., Putnak J.R., Lee S.H., Hong S.P., Moon S.B., Barvir D.A., et al. A purified inactivated Japanese encephalitis virus vaccine made in Vero cells. *Vaccine.* 2001; 19(31): 4557–65. [https://doi.org/10.1016/s0264-410x\(01\)00208-0](https://doi.org/10.1016/s0264-410x(01)00208-0)
19. *Testerial Manual. Chapter 3.7.12. Sheep Pox and Goat Pox.* OIE; 2018: 1513–24.
20. Amanova Zh.T., Taranov D.S., Ershebulov Z.D., Zhugunisov K.D., Barakbaev K.B., Bulatov E.A., et al. Evaluation of associated vaccine against peste des petits ruminants and sheep pox. *Veterinariya.* 2016; (9): 21–4. (in Russian)
21. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27(3): 493–7.
22. GOST 28085-2013. Biological medicinal products for veterinary use. Methods of sterility control; 2014. (in Russian)
23. Zaytsev V.L., Sandybaev N.T., Sultankulova K.T., Belousov V.Yu., Chervyakova O.V., Stochkov V.M. *Sheep Pox Virus: Molecular Biological Properties and Genome Structure [Virus ospy ovets: molekulyarno-biologicheskie svoystva i struktura genoma].* Almaty; 2011. (in Russian)
24. Amanova Zh.T., Zhugunisov K.D., Bulatov E.A., Zhunushov A.T., Sametova Zh.Zh., Shayakhmetov E.A., et al. Evaluation of the effectiveness of stabilizing media during lyophilization and storage of the associated vaccine against peste des petits ruminants and sheep pox. *Izvestiya Natsional'noy akademii nauk Kyrgyzskoy Respubliki.* 2020; (2): 25–34. (in Russian)

Problems
of Virology

Voprosy
Virusologii