



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

# ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

6

Том 67 • 2022

Volume 67 • Issue 6 • 2022

Издатель:  
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора  
[www.crie.ru](http://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.crie.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.virusjou.crie.ru>).

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

Подписано в печать 29.12.2022.  
Формат 60×90<sup>1/8</sup>.

Тираж 50 экз.

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

© ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии  
Роспотребнадзора, 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.

6

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)

**Мананова 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.crie.ru;>

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

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

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

<https://www.ebsco.com>

**PUBLISHER:**

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

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

**EDITORIAL OFFICE:**

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

Head of Editorial Office:

*Anna L. Neverova*

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

The materials that do not meet the requirements of the journal (<https://www.virusjour.crie.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.crie.ru>).

Signed to the press  
on December 29, 2022.  
Print format 60 × 90<sup>1/8</sup>.  
Circulation 50 copies.

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

6

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

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Глотов А.Г., Нефедченко А.В., Южаков А.Г., Котенева С.В., Глотова Т.И., Комина А.К., Красников Н.Ю.**  
Генетический полиморфизм сибирских изолятов коронавируса крупного рогатого скота (Coronaviridae: *Betacoronavirus: Betacoronavirus-1*) ..... 465
- Великжанина Е.И., Сашина Т.А., Морозова О.В., Епифанова Н.В., Новикова Н.А.**  
Вариабельность генов неструктурных белков ротавируса А (Reoviridae: *Rotavirus: Rotavirus A*) генотипа G9P[8] в период доминирования на территории Нижнего Новгорода (центральная часть России) (2011–2020)\* ..... 475
- Карташов М.Ю., Гладышева А.В., Найденова Е.В., Захаров К.С., Швалов А.Н., Кривошеина Е.И., Сеничкина А.М., Ба М.Б., Терновой В.А., Бумбали С., Локтев В.Б.**  
Молекулярно-генетическая характеристика многокомпонентного флавиподобного вируса Kindia tick virus (Flaviviridae), обнаруженного в иксодовых клещах на территории Гвинейской Республики\* ..... 487
- Ожмегова Е.Н., Савочкина Т.Е., Прилипов А.Г., Тихомиров Е.Е., Ларичев В.Ф., Сайфуллин М.А., Гребенникова Т.В.**  
Молекулярно-эпидемиологический анализ геновариантов SARS-CoV-2 на территории Москвы и Московской области ..... 496
- Носик Д.Н., Калнина Л.Б., Лобач О.А., Чатаева М.С., Бережная Е.В., Бочкова М.С., Киселева И.А., Селимова Л.М., Носик Н.Н.**  
Противовирусная и вирулицидная активность дезоксирибонуклеата натрия и его комплекса с железом в отношении вирусов разных царств и семейств ..... 506
- Масалова О.В., Леснова Е.И., Андреев С.М., Шершакова Н.Н., Козлов В.В., Пермьякова К.Ю., Демидова Н.А., Валуев-Эллистон В.Т., Турецкий Е.А., Иванов А.В., Николаева Т.Н., Хаитов М.Р., Пронин А.В., Куц А.А.**  
Адьювантное действие дисперсного фуллера C60 на иммунный ответ против конструкций, имитирующих аминокислотные и нуклеотидные последовательности неструктурного белка NS5B вируса гепатита С ..... 516
- Бляхер М.С., Фёдорова И.М., Тульская Е.А., Капустин И.В., Котелева С.И., Рамазанова З.К., Одинцов Е.Е., Сандалова С.В., Новикова Л.И.**  
Определение специфического Т-клеточного иммунитета к антигенам вируса SARS-CoV-2 у людей, переболевших COVID-19 ..... 527
- РЕЦЕНЗИИ**  
Материалы, поступившие в редакцию в связи с публикацией в разделе «Редакционная концепция» в № 5, 2022 журнала «Вопросы вирусологии» статьи «130 лет вирусологии» (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>)\* ..... 538
- Список статей, опубликованных в 2022 г. .... 541

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

## CONTENTS

## ORIGINAL RESEARCHES

- Glotov A.G., Nefedchenko A.V., Yuzhakov A.G., Koteneva S.V. Glotova T.I., Komina K.A., Krasnikov N.Yu.**  
Genetic polymorphism of Siberian bovine coronavirus isolates  
(Coronaviridae: *Betacoronavirus*: *Betacoronavirus-1*) . . . . . 465
- Velikzhanina E.I., Sanina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A.**  
Variability of genes encoding nonstructural proteins of rotavirus A (Reoviridae: *Rotavirus*: *Rotavirus A*)  
genotype G9P[8] during the period of dominance in the territory of Nizhny Novgorod  
(central part of Russia) (2011–2020)\* . . . . . 475
- Kartashov M.Yu., Gladysheva A.V., Naidenova E.V., Zakharov K.S., Krivosheina E.I., Shvalov A.N.,  
Senichkina A.M., Bah M.B., Ternovoi V.A., Boumbaly S., Loktev V.B.**  
Molecular and genetic characteristics of the multicomponent flavi-like Kindia tick virus (Flaviviridae) found  
in ixodid ticks on the territory of the Republic of Guinea\* . . . . . 487
- Ozhmegova E.N., Savochkina T.E., Prilipov A.G., Tikhomirov E.E., Larichev V.F., Sayfullin M.A.,  
Grebennikova T.V.**  
Molecular epidemiological analysis of SARS-CoV-2 genovariants in Moscow and Moscow region . . . . . 496
- Nosik D.N., Kalnina L.B., Lobach O.A., Chataeva M.S., Berezhnaya E.V., Bochkova M.S., Kiseleva I.A.,  
Selimova L.M., Nosik N.N.**  
Antiviral and virucidal activity of sodium deoxyribonucleate and its complex with iron  
against viruses of different kingdoms and families . . . . . 506
- Masalova O.V., Lesnova E.I., Andreev S.M., Shershakova N.N., Kozlov V.V., Permyakova K.Yu.,  
Demidova N.A., Valuev-Elliston V.T., Turetskiy E.A., Ivanov A.V., Nikolaeva T.N., Khaitov M.R.,  
Pronin A.V., Kushch A.A.**  
Adjuvant effect of dispersed fullerene C<sub>60</sub> on the immune response to constructs harboring amino acid  
and nucleotide sequences of hepatitis C virus nonstructural NS5B protein . . . . . 516
- Blyakher M.S., Fedorova I.M., Tulskeya E.A., Kapustin I.V., Koteleva S.I., Ramazanova Z.K.,  
Odintsov E.E., Sandalova S.V., Novikova L.I.**  
Assesment of specific T-cell immunity to SARS-CoV-2 virus antigens in COVID-19 reconvalescents . . . . . 527
- BOOK REVIEW**  
Materials received by the editorial office in response to the publication of the article  
«130<sup>th</sup> anniversary of virology» in the section «Editorial concept» in No. 5, 2022 of the journal  
«Problems of Virology» (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>)\* . . . . . 538
- Index of articles published in the journal «Problems of Virology» in B 2022 . . . . . 541

---

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

---

**НАУЧНАЯ СТАТЬЯ**<https://doi.org/10.36233/0507-4088-141>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



# Генетический полиморфизм сибирских изолятов коронавируса крупного рогатого скота (Coronaviridae: *Betacoronavirus*: *Betacoronavirus-1*)

Глотов А.Г.<sup>1</sup>, Нефедченко А.В.<sup>1</sup>, Южаков А.Г.<sup>2</sup>, Котенева С.В.<sup>1</sup>, Глотова Т.И.<sup>1</sup>, Комина А.К.<sup>2</sup>, Красников Н.Ю.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий Российской академии наук (СФНЦА РАН)», Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, 630501, Новосибирская обл., Новосибирский район, пос. Краснообск, Россия;

<sup>2</sup>ФГБНУ «Федеральный научный центр Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.П. Коваленко Российской академии наук», 109428, г. Москва, Россия

**Введение.** Коронавирусы крупного рогатого скота (BCoV) – причина диарей, респираторных болезней телят и зимней дизентерии коров. Актуально изучение генетического разнообразия этих вирусов.

**Цель работы** – изучение генетического полиморфизма изолятов BCoV, циркулирующих среди молочного скота в Сибири.

**Материалы и методы.** В работе использован биоматериал, взятый у падших или вынужденно забитых животных до начала исследования. Мишень для амплификации – нуклеотидные последовательности участков генов *S* и *N*. Филогенетические дендрограммы строили с использованием метода максимального правдоподобия в программе MEGA 7.0.

**Результаты.** По результатам ОТ-ПЦР геном вируса присутствовал в пробах биоматериала от телят с диарейным (16,3%) и респираторным (9,9%) синдромами. Первичные нуклеотидные последовательности участка гена *S* определили для 18, а гена *N* – для 12 изолятов. На основе гена *S* изоляты разделились на две клады с двумя подкладами в каждой. В первую подкладу первой клады (европейская линия) вошли 11 изолятов. Во вторую подкладу, включающую классические штаммы Квебек и Мёбус, исследуемые изоляты не входили. В первой подкладу второй клады (американо-азиатская линия) оказались 6 исследованных изолятов. Ко второй подкладу (смешанная линия) отнесли один изолят. На основе гена *N* получили две клады, одна из которых включала две подклады. В первую подкладу первой клады вошли 3 изолята (американо-азиатская линия), а во вторую – один (смешанная линия). Во второй кладе (смешанная) оказались 8 изолятов. Различий между диарейными и респираторными изолятами, а также зависимости от их географического местоположения не установили.

**Заключение.** Исследованная популяция изолятов BCoV носит неоднородный характер. Анализ нуклеотидных последовательностей является полезным инструментом для изучения молекулярной эпизоотологии коронавирусных инфекций и решения вопроса о применении вакцин в конкретном регионе.

**Ключевые слова:** крупный рогатый скот; коронавирусы; секвенирование; филогенетический анализ

**Для цитирования:** Глотов А.Г., Нефедченко А.В., Южаков А.Г., Котенева С.В., Глотова Т.И., Комина А.К., Красников Н.Ю. Генетический полиморфизм сибирских изолятов коронавируса крупного рогатого скота (Coronaviridae: *Betacoronavirus*: *Betacoronavirus-1*). *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(6): 465-474. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-141>

**Для корреспонденции:** Глотов Александр Гаврилович, д-р вет. наук, профессор, главный научный сотрудник – заведующий лабораторией биотехнологий диагностическим центром ФГБУН «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий (СФНЦА) РАН», Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, 630501, Новосибирская область, Новосибирский р-н, пос. Краснообск, Россия. E-mail: [glovov\\_vet@mail.ru](mailto:glovov_vet@mail.ru)

**Участие авторов:** Глотов А.Г. – идея и дизайн исследования, систематизация результатов, написание текста, утверждение окончательного варианта статьи; Нефедченко А.В. – молекулярно-генетические исследования; Южаков А.Г. – молекулярно-генетические исследования, анализ сиквенсов; Котенева С.В. – обработка биологического материала; Глотова Т.И. – анализ литературы, редактирование статьи; Комина А.К. – обработка биологического материала, секвенирование; Красников Н.Ю. – обработка биологического материала, секвенирование.

**Финансирование.** Исследование выполнено за счёт государственного бюджета в рамках выполнения задания № 0533-2021-0018 (СФНЦА РАН) и части работы по теме № FGUG-2022-18 (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН).

**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).

Поступила 25.09.2022  
Принята в печать 21.11.2022  
Опубликована 30.12.2022

## ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-141>

## Genetic diversity of Siberian bovine coronavirus isolates (Coronaviridae: *Betacoronavirus*: *Betacoronavirus-1*)

Alexander G. Glotov<sup>1</sup>, Alexey V. Nefedchenko<sup>1</sup>, Anton G. Yuzhakov<sup>2</sup>, Svetlana V. Koteneva<sup>1</sup>, Tatyana I. Glotova<sup>1</sup>, Alina K. Komina<sup>2</sup>, Nikita Yu. Krasnikov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Siberian Federal Scientific Centre of Agro-Biotechnologies of the Russian Academy of Science, Institute of Experimentally Veterinary Medicine of Siberia and Far East, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, 630501, Russia;

<sup>2</sup>Federal Scientific Center All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary named after K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, 109428, Moscow, Russia

**Introduction.** Bovine coronaviruses (BCoVs) are causative agents of diarrhea, respiratory diseases in calves and winter cow dysentery. The study of genetic diversity of these viruses is topical issue.

The **purpose** of the research is studying the genetic diversity of BCoV isolates circulating among dairy cattle in Siberia.

**Materials and methods.** Specimens used in this study were collected from animals that died or was forcedly slaughtered before the start of the study. The target for amplification were nucleotide sequences of S and N gene regions.

**Results.** Based on the results of RT-PCR testing, virus genome was present in 16.3% of samples from calves with diarrheal syndrome and in 9.9% with respiratory syndrome. The nucleotide sequences of S gene region were determined for 18 isolates, and N gene sequences - for 12 isolates. Based on S gene, isolates were divided into two clades each containing two subclades. First subclade of first clade (European line) included 11 isolates. Second one included classic strains Quebec and Mebus, strains from Europe, USA and Korea, but none of sequences from this study belonged to this subclade. 6 isolates belonged to first subclade of second clade (American-Asian line). Second subclade (mixed line) included one isolate. N gene sequences formed two clades, one of them included two subclades. First subclade included 3 isolates (American-Asian line), and second subclade (mixed) included one isolate. Second clade (mixed) included 8 sequences. No differences in phylogenetic grouping between intestinal and respiratory isolates, as well as according to their geographic origin were identified.

**Conclusion.** The studied population of BCoV isolates is heterogeneous. Nucleotide sequence analysis is a useful tool for studying molecular epidemiology of BCoV. It can be beneficial for choice of vaccines to be used in a particular geographic region.

**Keywords:** *cattle; coronaviruses; sequencing; phylogenetic analysis*

**For citation:** Glotov A.G., Nefedchenko A.V., Yuzhakov A.G., Koteneva S.V. Glotova T.I., Komina K.A., Krasnikov N.Y. Genetic polymorphism of Siberian bovine coronavirus isolates (Coronaviridae: *Betacoronavirus*: *Betacoronavirus-1*). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(6): 465-474 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-141>

**For correspondence:** Alexander G. Glotov, Dr. Sci. (Vet.), Professor, Chief Researcher – Head of Biotechnology Laboratory, Diagnostic Center, FSBI Siberian Federal Scientific Center for Agrobiotechnologies of the Russian Academy of Sciences, Institute of Experimental Veterinary Medicine of Siberia and the Far East, Krasnoobsk, Novosibirsk Region, 630501, Russia. E-mail: [glotov\\_vet@mail.ru](mailto:glotov_vet@mail.ru)

**Information about the authors:**

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

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

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

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

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

Komina K.A., <https://orcid.org/0000-0002-7173-5501>

Krasnikov N.Y., <https://orcid.org/0000-0001-8148-3080>

**Contribution:** Glotov A.G. – the idea and design of the study, systematization of the results, writing the text, approval of the final version of the article; Nefedchenko A.V. – molecular genetic studies; Yuzhakov A.G. – molecular genetic studies, sequence analysis; Koteneva S.V. – processing of biological material; Glotova T.I. – literature analysis, article editing; Komina A.K. – processing of biological material, sequencing; Krasnikov N.Yu. – processing of biological material, sequencing.

**Funding.** The research was carried out at the expense of the state budget within the framework of assignment No. 0533-2021-0018 (SFSC RAS) and the part of the work on the topic No. FGUG-2022-18 (VIEV RAS).

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

**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).

Received 25 September 2022

Accepted 21 November 2022

Published 30 December 2022

## Введение

Коронавирус крупного рогатого скота (Bovine coronavirus – BCoV) принадлежит к порядку Nidovirales, семейству Coronaviridae, роду *Betacoronavirus-1* [1]. Геном вируса представлен одноцепочечной положительно заряженной РНК (рибонуклеиновая кислота) размером около 32 Kb и включает 10 открытых рамок считывания (ORF), фланкированных 5'- и 3'-нетранслируемыми областями [2]. Это оболочечный вирус диаметром примерно 100–120 нм с пятью структурными белками:

- шиповидный гликопротеин (S);
- интегральный мембранный белок (M);
- гликопротеин – гемагглютинин-эстераза (HE);
- малый мембранный белок (E);
- нуклеокапсидный фосфопротеин (N) [3].

Белок N богат основными аминокислотами и напрямую связан с геномной РНК, образуя геликоидальный нуклеокапсид. Он выполняет функции, связанные с вирусным патогенезом, транскрипцией и репликацией. Его часто используют для молекулярной диагностики BCoV, поскольку это высококонсервативный белок, экспрессирующийся в больших количествах во время репликации вируса [4, 5]. Гликопротеин S выполняет две основные биологические функции – прикрепление вируса к клеткам-мишеням и слияние с клеточной мембраной. Ген этого белка менее консервативен, подвергается селективному прессингу со стороны иммунной системы, что используется вирусом для уклонения от иммунного ответа организма, но также пригоден в качестве мишени для молекулярного анализа [6].

BCoV распространены повсеместно [7–11] и, кроме основного хозяина, инфицируют широкий спектр домашних и диких жвачных животных и даже человека, вызывая у них сходный симптомокомплекс [5, 12–15].

Предполагается, что генетическое разнообразие BCoV является низким по сравнению с другими членами семейства, но они принадлежат к группе быстро развивающихся вирусов, для которых характерно постоянное создание новых вариантов [16]. Эта пластичность может обеспечить эволюционное преимущество в быстро меняющихся условиях, позволяя адаптироваться к различным тканям и хозяевам, избегать иммунного ответа хозяина и даже преодолевать межвидовые барьеры [16–18].

Инфекции BCoV связаны с диарейным синдромом у новорожденных телят [19, 20, 26], заболеваниями дыхательных путей у молочных телят и откормочного скота [21–24], а также зимней дизентерией у взрослых животных [5] и приводят к значитель-

ным экономическим потерям в промышленном животноводстве [9].

Несмотря на некоторые различия в гене S между кишечными и респираторными изолятами, до сих пор не выявлены маркеры (антигенные или генетические), позволяющие различать их между собой [14, 15, 18].

Недавнее появление и распространение SARS-CoV-2 вновь привлекло внимание к коронавирусам и их эволюционному потенциалу [25]. Было продемонстрировано, что высокая скорость мутаций и рекомбинаций способствует возникновению генотипической и фенотипической изменчивости коронавирусов других родов [18].

Изменения в различных частях генома этих вирусов являются результатом протяженных генных делеций, гомологичных рекомбинаций РНК и мутаций, напрямую влияющих на тканевый тропизм. Частота мутаций у BCoV является довольно высокой. Независимо от рассматриваемого гена, скорость эволюции оценивается примерно в  $10^{-3}$ – $10^{-4}$  замен/участок/год, что находится в пределах типичного диапазона этих вирусов [15, 16, 18].

Оценка картины географического распространения свидетельствует о двух генетических кластерах – европейском и американо-азиатском [16], отличающихся друг от друга [18]. Считается, что предок BCoV появился в 1940-е гг. в США и что две географически разные линии разошлись в 1960–1970-е гг., при этом до сих пор не обнаружено генетического смешения [18].

Несмотря на то что коронавирусная инфекция крупного рогатого скота регистрируется в нашей стране с прошлого века [26], исследования по филогенетическому анализу изолятов вируса не проводились.

В связи с этим **целью настоящей работы** являлось изучение генетического полиморфизма изолятов BCoV, циркулирующих среди высокопродуктивного молочного скота в Сибири.

## Материалы и методы

Исследования проводили в течение 5 лет на крупных молочных комплексах и молочно-товарных хозяйствах, расположенных в Тюменской, Омской, Томской, Новосибирской, Иркутской областях, Алтайском и Красноярском краях в период вспышек массовых желудочно-кишечных и респираторных болезней животных. На момент исследований вакцинация против данной инфекции не проводилась. Работу вели во время массовых эпизоотологических обследований на наличие возбудителей вирусно-бактериальных инфекций крупного рогатого скота. Всего исследовали 1508 проб биоматериала, полученных до начала исследования от 116 вынужденно убитых и павших телят в возрасте от 10 дней до 6 месяцев.

От каждого животного отбирали пробы органов желудочно-кишечного и респираторного трактов (не менее 15), доставляли в лабораторию в замороженном состоянии или транспортной среде в течение не более 12 ч с момента отбора, где хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Перед исследованием их гомогенизировали и готовили 10% суспензии на физиологическом растворе, которые центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин. Для выделения РНК использовали по 100 мкл осветлённого супернатанта.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с CONSENSUS AUTHOR GUIDELINES FOR ANIMAL USE (IAVES 23 JULY 2010).

### Экстракция РНК и обратная транскрипция

РНК выделяли из 100 мкл гомогенизата органов с помощью набора «РИБО-преп» (производства ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Очищенную РНК ресуспендировали в 50 мкл РНК-буфера. Для проведения обратной транскрипции (ОТ) использовали 10 мкл выделенной РНК. Реакцию проводили с помощью набора «Реврта-L» (производства ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. После проведения реакции объём пробы составлял 40 мкл.

### Выявление ВСоV с помощью ПЦР

Для выявления РНК ВСоV использовали праймеры и зонд 5-CTAGTAACCAGGCTGATGTCAATACC-3, 5-GGCGGAAACCTAGTCGGAATA-3, 5-(FAM)CG-GCTGACATTCTCGATC-(BHQ1)-3 [27]. Для контроля эффективности полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовали праймеры и зонд на ген *GAPDH* крупного рогатого скота (5-GATGGTGAAGGTCGGAGT-GAAC-3, 5-GTCATTGATGGCGACGATGT-3, 5-(ROX)-CTGGTCAACAGGGCTGCTT-3 (BHQ2)) [28]. ПЦР проводили в 30 мкл смеси, содержащей 5 мкл кДНК (комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота), 10 пмоль каждого праймера и зонда, готовую смесь реактивов «Био-Мастер ОТ-ПЦР-РВ» («Биолабмикс», Россия). Программа амплификации: 5 мин  $95^{\circ}\text{C}$ , затем 45 циклов  $95^{\circ}\text{C}$  15 с и  $60^{\circ}\text{C}$  1 мин.

### ПЦР-амплификация генов S и N

Фрагменты генов *S* и *N* амплифицировали в образцах ВСоV-положительных проб. Для амплификации фрагмента гипервариабельного участка гена *S* размером 622 пары нуклеотидов (п.н.) использовали праймеры S1 (СТТАААГТГСССССАААСТААТ) и S2 (ССТАСТГТГАГАТСАТАТГТТТГ) [27]. Для амплификации фрагмента гена *N* размером 454 п.н. использовали праймеры ВСоV1 (CGATGAGGCTATTCGAC) и ВСоV2 (TGTGGGTGCGAGTTCTGC) [29]. ПЦР проводили по программе для выявления ВСоV. Продукты амплификации разделяли в агарозном ге-

ле и очищали с помощью набора Omega Biotek Gel Extraction Kit (Omega Bio-tek, Inc., США) в соответствии с инструкцией производителя.

Полученные нуклеотидные последовательности анализировали при помощи пакетов программ Lasergene 11.1.0 (DNASTAR, США). Выравнивание последовательностей проводили с использованием метода MUSCLE. Филогенетическая дендрограмма была построена с использованием метода максимального правдоподобия в программе MEGA 7.0. Топологию ветвей дендрограммы подтверждали методом бутстрэп-анализа (1000 шагов репликации) [30]. Для построения деревьев использовали модель General Time Reversible (GTR), гамма-распределение вариации частот между сайтами (G + I).

### Результаты

Всего за 5-летний период обследовали 69 молочных хозяйств из пяти областей и двух краёв Западной и Восточной Сибири. По результатам ОТ-ПЦР геном вируса был обнаружен в 246 (16,3%) пробах биоматериала от телят с диарееями и в 149 (9,9%) пробах с респираторным синдромом, из которых первичные нуклеотидные последовательности удалось определить для 18. Данные суммированы в **таблице**.

Для 12 исследуемых изолятов были получены последовательности нуклеотидов участков генов *S* и *N*, ещё для 6 изолятов – только последовательности участка гена *S*. Нуклеотидная идентичность полученных последовательностей составила 96,1–100% по гену *N* и 91,9–100% по гену *S*. Секвенированные последовательности были депонированы в базу данных GenBank под номерами OP651999–OP652028.

В результате анализа полученных последовательностей с использованием метода максимального правдоподобия (модель GTR) были построены филогенетические дендрограммы с низкой статистической поддержкой клад.

На основе филогенетического анализа участка последовательности гена гликопротеина *S* исследуемые изоляты и референтные штаммы разделились на две клады с двумя подкладами в каждой. В первую подкладу (1.1) первой клады входили 11 исследуемых изолятов (S16, S22, S24, S25, S26, S27, S29, S34, S35, S36 и S49), а также референтные штаммы из Европы и Израиля (европейская линия). Во вторую подкладу (1.2) входили классические штаммы вируса Квебек и Мёбус, а также штаммы из Европы, США и Южной Кореи. Исследованные изоляты к ней не относились. В первой подкладу второй клады (2.1) оказались 6 исследуемых изолятов (S3, S5, S7, S8, S13 и S20), а также штаммы из США, Китая и Южной Кореи (американо-азиатская линия). Ко второй подкладу (2.2) отнесли один исследуемый изолят (S46) и штаммы из Южной Кореи, Европы, США (смешанная линия). Данные представлены на **рис. 1**.

На основе филогенетического анализа участка последовательности гена нуклеокапсида *N* исследуемые изоляты и референтные штаммы разделились на две клады, одна из них включала две подклады. В первую

**Таблица. Результаты выявления коронавируса методом ПЦР в режиме реального времени в пробах биоматериала от телят в регионе Сибири и секвенирования****Table. The results of detection of coronavirus by real-time PCR in samples from calves in the Siberian region and sequencing**

Регион Region	Исследовано проб/хозяйств, <i>n</i> Researched samples/farms, <i>n</i>	Количество положительных проб, % Number of positive samples, %		Номера секвенированных последовательностей в GenBank Numbers of obtained sequences deposited in GenBank	
		диарейный синдром diarrheal syndrome	респираторный синдром respiratory syndrome	ген <i>S</i> gene <i>S</i>	ген <i>N</i> gene <i>N</i>
Тюменская область Tyumen	280/12	2,8	1,9	OP652009, OP652020, OP652022	OP652010, OP652021
Омская область Omsk	196/6	2,1	1,2	OP652007, OP652017	OP652008
Томская область Tomsk	97/6	1,1	1,4	OP652027	OP652028
Новосибирская область Novosibirsk	250/12	3,2	1,6	OP652004, OP652023	OP652024
Алтайский край Altay	470/23	4,1	2,5	OP651999, OP652001, OP652003, OP652005, OP652006, OP652013, OP652015, OP652018	OP652000, OP652002, OP652014, OP652016, OP652019
Красноярский край Krasnoyarsk	125/6	1,8	0,7	OP652025	OP652026
Иркутская область Irkutsk	90/4	1,2	0,6	OP652011	OP652012
<b>Всего Total</b>	1508/69	16,3	9,9	18	12

подкладу (1.1) входили 3 исследуемых штамма (N3, N5 и N20), а также штаммы из Китая, Южной Кореи, Таиланда, США и Бразилии (американо-азиатская линия). Во вторую подкладу (1.2) входил один исследуемый изолят (N34), классические штаммы Квебек и Мёбус, а также штаммы из Германии, Южной Кореи, Китая и Индии (смешанная линия). Во второй кладе (2) оказались 8 исследуемых штаммов (N22, N 24, N25, N26, N29, N36, N46 и N49), а также штаммы из Китая, Европы, Ирана и Индии (смешанная линия). Данные представлены на **рис. 2**.

Различий в географическом распространении изолятов вируса не обнаружили. Изоляты, относящиеся к одной кладе, были распространены в различных регионах, не связанных между собой.

### Обсуждение

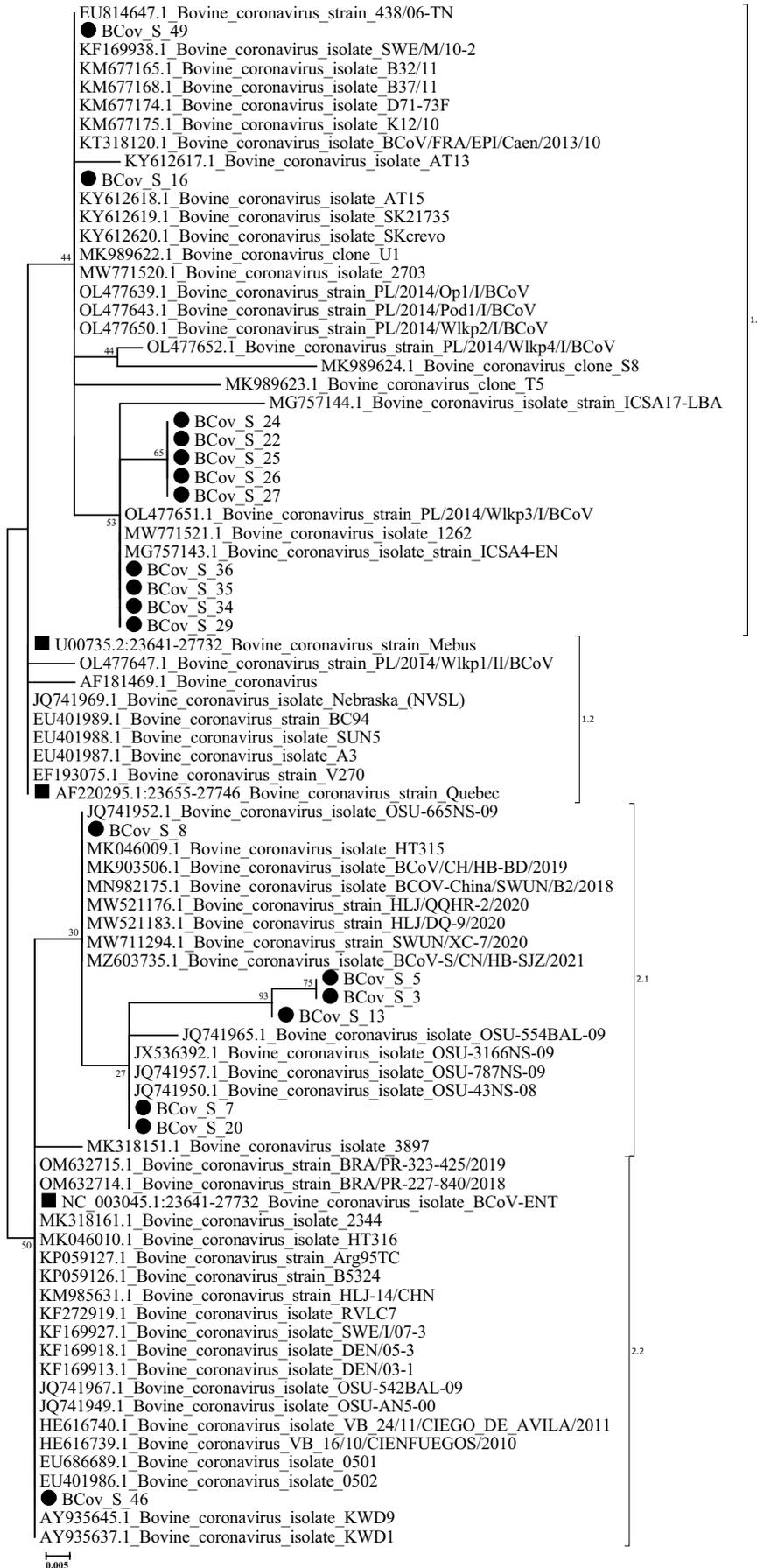
Для определения и сравнения биологических, антигенных и генетических характеристик штаммов BCoV, выделенных от крупного рогатого скота с респираторными и кишечными инфекциями, были проведены многочисленные исследования [31–38]. Филогенетические деревья, построенные на основе частичных последовательностей участков генов *S* и *N*, показали, что происхождение образцов из дыхательной или пищеварительной систем не оказало существенного влияния на размещение в них.

Нами исследованы образцы из семи регионов Сибири, взятые у животных из хозяйств с интенсивным типом ведения животноводства. В часть из них осу-

ществлялся завоз высокопродуктивных животных из стран Европы и Северной Америки, но большая часть проб была получена от аборигенного скота. Различий между кишечными и респираторными изолятами, полученными из хозяйств с разным типом ведения скотоводства, а также зависимости от географического местоположения региона и страны происхождения животных также не установлено.

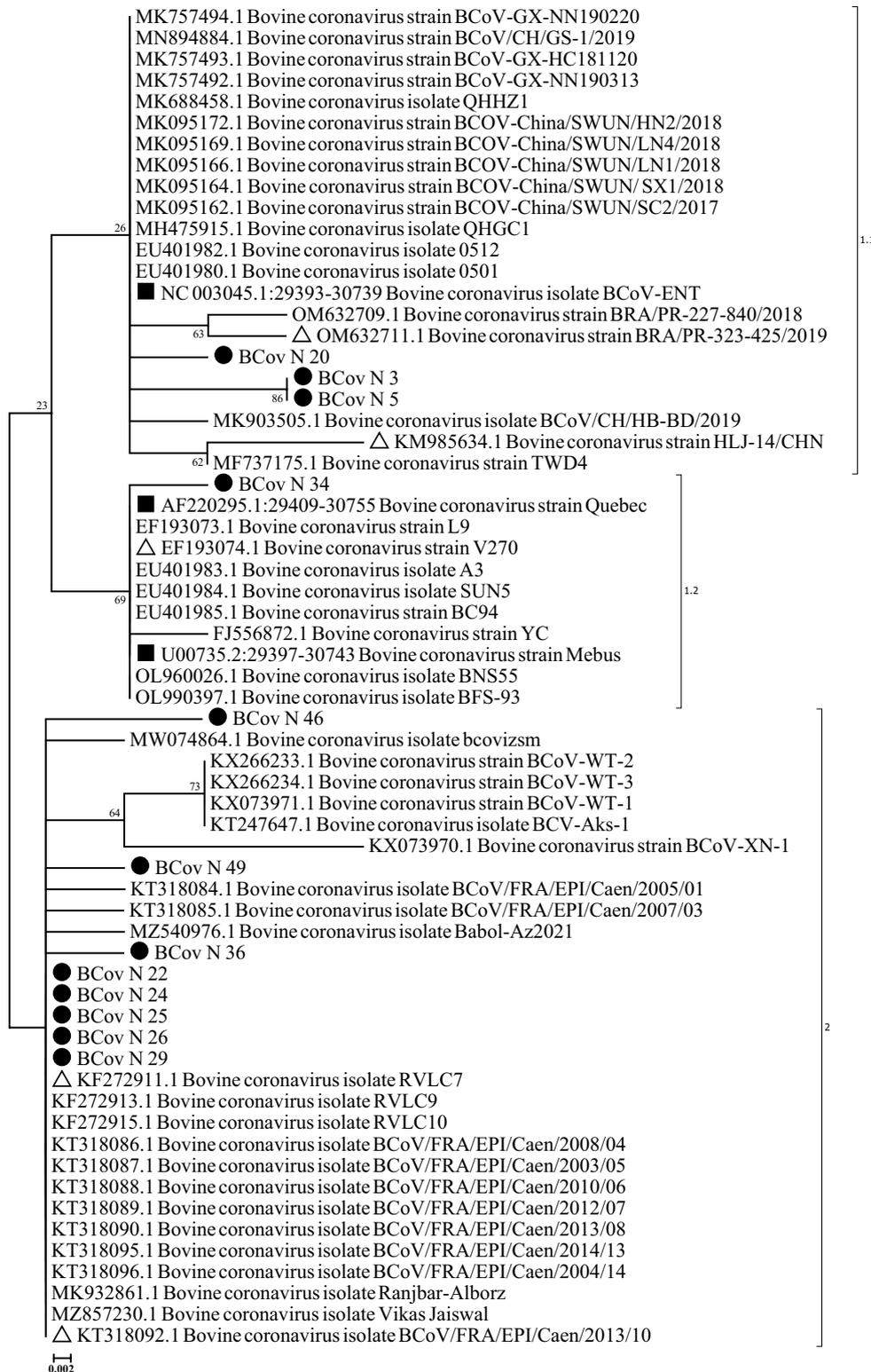
Результаты показали неодинаковое распределение нескольких изолятов вируса по кладам и подкладам. Так, изоляты S3, S5, S20 по гену *S* относились к подкладе 2.1, а по гену *N* – к подкладе 1.1. Изоляты S22, S24, S25, S26, S27, S29, S36 и S49 по гену *S* классифицировались как 1.1, а по гену *N* отнеслись к кладе 2. Изолят S34 по гену *S* относился к подкладе 1.1, а по гену *N* – к подкладе 1.2. Большая часть из них была выделена от аборигенного скота, а меньшая – от импортированного. Так, изолят S22, отнесённый нами к подкладе 1.1 по гену *S* и кладе 2 по гену *N* (европейские штаммы), был выделен от животных, завезённых из Германии и Канады и смешанных в одном хозяйстве. Изоляты S46 и S49, принадлежащие к подкладе 2.2 по гену *S* (европейские штаммы) и кладе 2 по гену *N* (смешанные штаммы), выделены от телят, завезённых из стран Европы.

Таким образом, исследованная популяция сибирских изолятов BCoV носит неоднородный характер, так как одни и те же изоляты были отнесены к различным кладам и подкладам. По гену *S* большая часть изолятов была отнесена к европейской линии, а меньшая – к аме-



**Рис. 1.** Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе участка последовательности гена гликопротеина S коронавируса крупного рогатого скота. Бутстрэп-поддержка указана около каждого узла дендрограммы. Штаммы, полученные в данной работе, отмечены чёрным кругом (●). Референтные штаммы отмечены чёрным квадратом (■). Штаммы из базы данных GenBank, присутствующие на рис. 1 и 2, отмечены белым треугольником (▲). Для штаммов из базы данных GenBank указаны название и идентификационный номер. Номер клады указан справа от квадратной скобки.

**Fig. 1.** Phylogenetic dendrogram based on the bovine coronavirus glycoprotein S gene sequence region. Bootstrap support is indicated near each node of the dendrogram. The strains obtained in this work are marked with a black circle (●). Reference strains are marked with a black square (■). Strains from the GenBank database present in fig. 1 and 2 are marked with a white triangle (▲). For strains from the GenBank database, the name and identification number are indicated. The clade numbers are indicated to the right of the square brackets.



**Рис. 2.** Филогенетическая дендрограмма, построенная на основе участка последовательности гена нуклеокапсида N коронавируса крупного рогатого скота. Бутстрэп-поддержка указана около каждого узла дендрограммы. Штаммы, полученные в данной работе, отмечены чёрным кругом (●). Референтные штаммы отмечены чёрным квадратом (■). Штаммы из базы данных GenBank, присутствующие на рис. 1 и 2, отмечены белым треугольником (△). Для штаммов из базы данных GenBank указаны название и идентификационный номер. Номер клады указан справа от квадратной скобки.

**Fig. 2.** Phylogenetic dendrogram based on the bovine coronavirus nucleocapsid N gene sequence region. Bootstrap support is indicated near each node of the dendrogram. The strains obtained in this work are marked with a black circle (●). Reference strains are marked with a black square (■). Strains from the GenBank database present in fig. 1 and 2 are marked with a white triangle (△). For strains from the GenBank database, the name and identification number are indicated. The clade numbers are indicated to the right of the square brackets.

рикано-азиатской. Один изолят (S46) был отнесён нами к смешанному кластеру. По гену *N* практически все изоляты показали смешанный генетический профиль.

Наши данные в общем виде согласуются с результатами иранских исследователей, которые показали, что филогенетический анализ одних и тех же штаммов вирусов по разным генам *S* и *N* даёт разные формы деревьев. Анализ по гену *S* даёт 4 кластера, в которых просматривается географическая связь между изолятами в кластере. Анализ тех же штаммов по гену *N* не даёт соответствующей картины [31].

Кроме того, используемые в нашей работе референтные штаммы вирусов, присутствующие на обоих рисунках (отмечены белым треугольником  $\Delta$ ), также относятся к разным кластерам на разных деревьях. Так, штамм RVL7C из Ирландии и штамм BRA/PR-323-425 из Бразилии относятся к одному подкластеру (2.2) по гену *S*, а по гену *N* – к кластеру 2 и подкластеру 1.1 соответственно. Возможно, это может объясняться как разной скоростью накопления мутаций в разных генах бетакоронавирусов, так и потенциальным влиянием рекомбинационных событий между штаммами, следы которых находят в геномах BCoV [15, 16, 38]. Показано, например, что ген *S* SARS-CoV-2 мутирует в 5 раз быстрее других кодирующих областей генома, находясь под давлением иммунной системы хозяина, тогда как ген *N* более стабилен [32].

Филогеографический анализ изолятов BCoV из разных стран мира показывает следующее. На территории Южной Кореи, Америки и Аргентины циркулируют изоляты, близкие к американской и европейской ветвям [35]. Бразильские изоляты вируса, циркулирующие среди мясных телят в пяти штатах, на основе анализа гена, кодирующего белок *N*, разделились на два отдельных кластера и были тесно связаны с азиатскими штаммами [37]. Уругвайские штаммы сгруппированы в две разные линии: одна с аргентинскими штаммами, а другая – с бразильскими. Предполагается, что обе линии BCoV проникли в Уругвай в 2013 г.: одна из них – из Бразилии (интервал максимальной плотности вероятности (HPD) 95%: 2011–2014 гг.), а другая – из Аргентины (интервал HPD 95%: 2010–2014 гг.). Линии отличались по четырём аминокислотным заменам, и обе – от эталонного штамма Мёбус.

Ирландские штаммы на основе данных секвенирования по гену *S* относятся к европейской группе вирусов [34].

Иранские изоляты и штаммы полностью находились в независимых кластерах и не принадлежали ни к одному из кластеров со штаммами, выделенными в других странах. При этом они сильно отличались от штаммов из других частей мира, но с точки зрения родства эти вирусы показали некоторое сходство с европейскими штаммами, например, обнаруженными во Франции, Хорватии, Дании и Швеции [31].

Турецкие штаммы вируса, выделенные от животных из нескольких отдалённых друг от друга ферм, были близки другим штаммам из Европы [36].

Анализ японских изолятов BCoV по последовательности участка гена *S* также показал наличие четырёх

генетических кластеров. Как и исследованные нами изоляты, полевые японские изоляты относились к трём генетическим кластерам; в кластере, включающем классические штаммы Мёбус и Квебек, полевых изолятов из России и Японии не было [33]. Часть изолятов также относилась к американским штаммам. Интересно, что вирусы из Японии также кластеризовались по годам выделения и хозяйствам, где они были выделены, но независимо от клинического проявления болезни.

В Китае характер проявления инфекции был связан с типом ведения животноводства, возрастом животных и плотностью размещения скота. Из 203 BCoV-положительных образцов от больных телят 20 изолятов успешно секвенировали по гену *S*. Все они имели гомологию нуклеотидов на уровне 97,7–100,0%, а их N-концевой домен субъединицы *S1* генетически отличался от эталонных штаммов из Южной Кореи и Европы. Все штаммы отнесли к группе «Азия – Северная Америка». На основе китайских штаммов авторы сформировали три клады в филогенетическом дереве. Один штамм был отнесён к европейской группе. В то же время была зафиксирована рекомбинация между двумя разными штаммами, что привело к образованию рекомбинантного штамма BCoV-AKS-01. По мнению авторов, полученные данные обеспечивают лучшее понимание эпидемиологии и эволюции BCoV в Китае [38].

Практически все авторы отмечали наличие корреляции выделения вирусов с географической локацией, но не с формой болезни. Мы не выявили различий в географическом распределении изолятов. Изоляты, относящиеся к одной кладе, были распространены в различных областях и краях Сибири, не связанных между собой. Респираторные изоляты чаще выявляли на крупных молочных комплексах по производству молока как с наличием, так и отсутствием завезённых животных, а кишечные – в мелких и средних хозяйствах с наличием аборигенных животных.

В нашем исследовании происхождение изолятов установить было невозможно, однако два из них – S22 (подклада 1.1) и S46 (подклада 2.2) – имели явное европейское происхождение и были связаны с завозом животных из нескольких стран Европы (Германия, Словения), которые не имели контакта с местным скотом. Интерес представляет изолят S46, который вызвал тяжёлую вспышку респираторной болезни у телят 2–5-месячного возраста на молочном комплексе в сочетании с вирусной диареей (Pestivirus A) (данные не представлены). Наши результаты показывают, что сибирские изоляты ближе к иранским и китайским вариантам. Эпизоотическая ситуация наиболее близка к наблюдаемой в Китае.

### Заключение

Результаты исследований показали широкое распространение и молекулярно-генетическое разнообразие коронавируса крупного рогатого скота на молочных комплексах Сибири. Популяция сибирских изолятов вируса неоднородна, носит смешанный характер и представлена двумя кладами с двумя подкладами в каждой по гену *S* и двумя кладами по гену *N*.

Подтверждена идентичность изолятов вируса, вызывающих кишечную и респираторную форму инфекции в регионе. Полученные данные показывают, что сравнительный анализ нуклеотидной последовательности является полезным инструментом для изучения молекулярной эпизоотологии инфекций, вызванных коронавирусом крупного рогатого скота (BCoV). Исследования по молекулярной эпизоотологии BCoV в конкретном регионе можно использовать с целью оптимизации и выбора стратегии контрольных мероприятий на региональном уровне и решения вопроса о применении вакцин. Это особенно важно при реализации программ вакцинации животных, когда генетические типы вакцинных штаммов не совпадают с типами, циркулирующими среди животных на конкретной территории. Полученная в ходе таких исследований информация может быть полезной при изучении молекулярной эпизоотологии вирусов, разработке более точных диагностических тестов, эффективных вакцин и программ контроля инфекции.

#### ЛИТЕРАТУРА

- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). New MSL including all taxonomy; updates since the 2018b release. Berlin; 2019. Available at: <https://ictv.global>
- Suzuki T., Otake Y., Uchimoto S., Hasebe A., Goto Y. Genomic characterization and phylogenetic classification of bovine coronaviruses through whole genome sequence analysis. *Viruses*. 2020; 12(2): 183. <https://doi.org/10.3390/v12020183>
- Masters P.S. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 2006; 66: 193–292. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3)
- Saif L.J. Bovine respiratory coronavirus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26(2): 349–64. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.04.005>
- Vlasova A.N., Saif L.J. Bovine coronavirus and the associated diseases. *Front. Vet. Sci.* 2021; 8: 643220. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.643220>
- Liu L., Hagglund S., Hakhverdyan M., Alenius S., Larsen L.F., Belak S. Molecular epidemiology of bovine coronavirus on the basis of comparative analyses of the S gene. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(3): 957–60. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.957-960.2006>
- Zhu Q., Li B., Sun D. Advances in bovine coronavirus epidemiology. *Viruses*. 2022; 14(5): 1109. <https://doi.org/10.3390/v14051109>
- Мищенко В.А., Думова В.В., Черных О.Ю., Киселев М.Ю., Мищенко А.В., Бакунов И.Н. и др. Распространение коронавируса крупного рогатого скота у жвачных животных. *Ветеринария*. 2010; (9): 18–21.
- Алипер Т.И. *Актуальные инфекционные болезни крупного рогатого скота: Руководство*. М.; 2021. <https://doi.org/10.31016/viev-2021-6>
- Орлянкин Б.Г., Власова А.Н., Мухин А.Н., Алипер Т.И. Коронавирусные инфекции животных: эпизоотология и патогенез. *Ветеринария*. 2022; (3): 3–13. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2022.25.3.03-13>
- Saif L.J. Bovine respiratory coronavirus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26(2): 349–64. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2010.04.005>
- Беспалова Т.Ю., Блохин А.А. Коронавирусы животных (обзор). *Ветеринария*. 2020; (9): 3–10. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2020.23.9.03-10>
- Готов А.Г., Глотова Т.И. Коронавирусы жвачных животных. *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. 2020; (3): 49–61. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2020-3-5>
- Liu X., Wu Q., Zhang Z. Global diversification and distribution of coronaviruses with furin cleavage sites. *Front. Microbiol.* 2021; 12: 649314. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.649314>
- Islam A., Ferdous J., Islam S., Sayeed M.A., Dutta Choudhury S., Saha O., et al. Evolutionary dynamics and epidemiology of endemic and emerging coronaviruses in humans, domestic animals, and wildlife. *Viruses*. 2021; 13(10): 1908. <https://doi.org/10.3390/v13101908>
- Franzo G., Drigo M., Legnardi M., Grassi L., Pasotto D., Menandro M.L., et al. Bovine coronavirus: variability, evolution, and dispersal patterns of a no longer neglected betacoronavirus. *Viruses*. 2020; 12(11): 1285. <https://doi.org/10.3390/v12111285>
- Burimuah V., Sylverken A., Owusu M., El-Duah P., Yeboah R., Lamptey J., et al. Molecular-based cross-species evaluation of bovine coronavirus infection in cattle, sheep and goats in Ghana. *BMC Vet. Res.* 2020; 16(1): 405. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02606-x>
- Salem E., Dhanasekaran V., Cassard H., Hause B., Maman S., Meyer G., et al. Global transmission, spatial segregation, and recombination determine the long-term evolution and epidemiology of bovine coronaviruses. *Viruses*. 2020; 12(5): 534. <https://doi.org/10.3390/v12050534>
- Нефедченко А.В., Котенева С.В., Глотова Т.И., Готов А.Г. Роль коронавируса в этиологии желудочно-кишечной и респираторной патологии телят на молочных комплексах. *Ветеринария*. 2022; (1): 18–23. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2022.25.1.18-23>
- Dall Agnol A.M., Lorenzetti E., Leme R.A., Ladeia W.A., Mainardi R.M., Bernardi A., et al. Severe outbreak of bovine neonatal diarrhoea in a dairy calf rearing unit with multifactorial etiology. *Braz. J. Microbiol.* 2021; 52(4): 2547–53. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00565-5>
- Rahe M.C., Magstadt D.R., Groeltz-Thrush J., Gauger P.C., Zhang J., Schwartz K.J., et al. Bovine coronavirus in the lower respiratory tract of cattle with respiratory disease. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2022; 34(3): 482–8. <https://doi.org/10.1177/10406387221078583>
- Soules K.R., Rahe M.C., Purtle L., Moeckly C., Stark P., Samson C., et al. Bovine coronavirus infects the respiratory tract of cattle challenged intranasally. *Front. Vet. Sci.* 2022; (9): 878240. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.878240>
- Blakebrough-Hall C., Hick P., Mahony T.J., González L.A. Factors associated with bovine respiratory disease case fatality in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 2022; 100(1): skab361. <https://doi.org/10.1093/jas/skab361>
- Deepak Aly S.S., Love W.J., Blanchard P.C., Crossley B., Van Eenennaam A.L., Lehenbauer T.W. Etiology and risk factors for bovine respiratory disease in pre-weaned calves on California dairies and calf ranches. *Prev. Vet. Med.* 2021; 197: 105506. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105506>
- Львов Д.К., Альховский С.В., Колобухина Л.В., Бурцева Е.И. Этиология эпидемической вспышки COVID-19 в г. Ухань (провинция Хубэй, Китайская Народная Республика, ассоциированной с вирусом 2019-nCoV (Nidovirales, Coronaviridae, Coronavirinae, Betacoronavirus, подрод Sarbecovirus): уроки эпидемии SARS-CoV. *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(1): 6–15. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-6-15>
- Коромылов Г.Ф., Авиллов В.С., Гоголев М.М. Ротавирусная и коронавирусная инфекция телят. *Вестник сельскохозяйственной науки*. 1984; (7): 129–36.
- Decaro N., Elia G., Campolo M., Desario C., Mari V., Radogna A., et al. Detection of bovine coronavirus using a TaqMan-based real-time RT-PCR assay. *J. Virol. Methods*. 2008; 151(2): 167–71. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.05.01>
- Zhao H., Liu J., Li Y., Yang C., Zhao S., Liu J., et al. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR in Bovine PBMCs transformed and non-transformed by Theileria annulata. *Korean J. Parasitol.* 2016; 54(1): 39–46. <https://doi.org/10.3347/kjp.2016.54.1.39>
- Takiuchi E., Stipp D.T., Alfieri A.F., Alfieri A.A. Improved detection of bovine coronavirus N gene in faeces of calves infected naturally by a semi-nested PCR assay and an internal control. *J. Virol. Methods*. 2006; 131(2): 148–54. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.08.005>
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 7(33): 1870–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw0544>
- Lotfollahzadeh S., Madadgar O., Reza Mohebbi M., Reza Mokhter Dezfouli M., George W.D. Bovine coronavirus in neonatal calf diarrhoea in Iran. *Vet. Med. Sci.* 2020; 6(4): 686–94. <https://doi.org/10.1002/vms3.277>
- Kanno T., Hatama S., Ishihara R., Uchida I. Molecular analysis of the S glycoprotein gene of bovine coronaviruses isolated in Japan from 1999 to 2006. *J. Gen. Virol.* 2007; 88(Pt. 4): 1218–24. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82635-0>
- Amicone M., Borges V., Alves M.J., Isidro J., Zê-Zê L., Duarte S., et al. Mutation rate of SARS-CoV-2 and emergence of mutators during experimental evolution. *Evol. Med. Public Health*. 2022; 10(1): 142–55. <https://doi.org/10.1093/emph/eoac010>
- Gunn L., Collins P.J., O'Connell M.J., O'Shea H. Phylogenetic investigation of enteric bovine coronavirus in Ireland reveals partitioning between European and global strains. *Irish Vet. J.* 2015; 68: 31. <https://doi.org/10.1186/s13620-015-0060-33>
- Bok M., Miño S., Rodríguez D., Badaracco A., Nuñez I., Souza S.P., et al. Molecular and antigenic characterization of bovine Coronavirus circulating in Argentinean cattle during 1994–2010. *Vet. Microbiol.* 2015; 181(3–4): 221–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.10.017>
- De Mira Fernandes A., Brandão P.E., Dos Santos Lima M., de Souza Nunes Martins M., da Silva T.G., da Silva Cardoso Pinto V., et al. Ge-

- netic diversity of BCoV in Brazilian cattle herds. *Vet. Med. Sci.* 2018; 4(3): 183–9. <https://doi.org/10.1002/vms3.102>
37. Zhu Q., Su M., Li Z., Wang X., Qi S., Zhao F., et al. Epidemiological survey and genetic diversity of bovine coronavirus in Northeast China. *Virus Res.* 2022; 308: 198632. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198632>
  38. Castells M., Giannitti F., Caffarena R.D., Casaux M.L., Schild C., Castells D., et al. Bovine coronavirus in Uruguay: genetic diversity, risk factors and transboundary introductions from neighboring countries. *Arch. Virol.* 2019; 164(11): 2715–24. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04384-w>
- ### REFERENCES
1. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). New MSL including all taxonomy; updates since the 2018b release. Berlin; 2019. Available at: <https://ictv.global>
  2. Suzuki T., Otake Y., Uchimoto S., Hasebe A., Goto Y. Genomic characterization and phylogenetic classification of bovine coronaviruses through whole genome sequence analysis. *Viruses.* 2020; 12(2): 183. <https://doi.org/10.3390/v12020183>
  3. Masters P.S. The molecular biology of coronaviruses. *Adv. Virus Res.* 2006; 66: 193–292. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)66005-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)66005-3)
  4. Saif L.J. Bovine respiratory coronavirus. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 2010; 26(2): 349–64. <https://doi.org/10.1016/j.cv-fa.2010.04.005>
  5. Vlasova A.N., Saif L.J. Bovine coronavirus and the associated diseases. *Front. Vet. Sci.* 2021; 8: 643220. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.643220>
  6. Liu L., Hagglund S., Hakhverdyan M., Alenius S., Larsen L.F., Belak S. Molecular epidemiology of bovine coronavirus on the basis of comparative analyses of the S gene. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(3): 957–60. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.3.957-960.2006>
  7. Zhu Q., Li B., Sun D. Advances in bovine coronavirus epidemiology. *Viruses.* 2022; 14(5): 1109. <https://doi.org/10.3390/v14051109>
  8. Mishchenko V.A., Dumova V.V., Chernykh O.Yu., Kiselev M.Yu., Mishchenko A.V., Bakunov I.N., et al. Bovine coronavirus distribution in ruminants. *Veterinariya.* 2010; (9): 18–21. (in Russian)
  9. Aliper T.I. *Actual Infectious Diseases of Cattle: Guideline [Aktual'nye infektsionnye bolezni krupnogo rogatogo skota: Rukovodstvo]*. Moscow; 2021. <https://doi.org/10.31016/viev-2021-6> (in Russian)
  10. Orlyankin B.G., Vlasova A.N., Mukhin A.N., Aliper T.I. Coronavirus infections in animals: epizootology and pathogenesis. *Veterinariya.* 2022; (3): 3–13. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2022.25.3.03-13> (in Russian)
  11. Faustino R., Faria M., Teixeira M., Palavra F., Sargento P., do Céu Costa M. Systematic review and meta-analysis of the prevalence of coronavirus: One health approach for a global strategy. *One Health.* 2022; 14: 100383. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2022.100383>
  12. Bepalova T.Yu., Blokhin A.A. Coronaviruses of animals (review). *Veterinariya.* 2020; (9): 3–10. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2020.23.9.03-10> (in Russian)
  13. Glotov A.G., Glotova T.I. Coronaviruses in ruminants. *Sibirskiy vestnik sel'skokhozyaystvennoy nauki.* 2020; (3): 49–61. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2020-3-5> (in Russian)
  14. Liu X., Wu Q., Zhang Z. Global diversification and distribution of coronaviruses with furin cleavage sites. *Front. Microbiol.* 2021; 12: 649314. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.649314>
  15. Islam A., Ferdous J., Islam S., Sayeed M.A., Dutta Choudhury S., Saha O., et al. Evolutionary dynamics and epidemiology of endemic and emerging coronaviruses in humans, domestic animals, and wildlife. *Viruses.* 2021; 13(10): 1908. <https://doi.org/10.3390/v13101908>
  16. Franzo G., Drigo M., Legnardi M., Grassi L., Pasotto D., Menandro M.L., et al. Bovine coronavirus: variability, evolution, and dispersal patterns of a no longer neglected betacoronavirus. *Viruses.* 2020; 12(11): 1285. <https://doi.org/10.3390/v12111285>
  17. Burimuah V., Sylverken A., Owusu M., El-Duah P., Yeboah R., Lamptey J., et al. Molecular-based cross-species evaluation of bovine coronavirus infection in cattle, sheep and goats in Ghana. *BMC Vet. Res.* 2020; 16(1): 405. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02606-x>
  18. Salem E., Dhanasekaran V., Cassard H., Hause B., Maman S., Meyer G., et al. Global transmission, spatial segregation, and recombination determine the long-term evolution and epidemiology of bovine coronaviruses. *Viruses.* 2020; 12(5): 534. <https://doi.org/10.3390/v12050534>
  19. Nefedchenko A.V., Koteneva S.V., Glotova T.I., Glotov A.G. The role of bovine coronavirus in the etiology of gastrointestinal and respiratory diseases of calves in big dairy farms. *Veterinariya.* 2022; (1): 18–23. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2022.25.1.18-23> (in Russian)
  20. Dall Agnol A.M., Lorenzetti E., Leme R.A., Ladeia W.A., Mainardi R.M., Bernardi A., et al. Severe outbreak of bovine neonatal diarrhea in a dairy calf rearing unit with multifactorial etiology. *Braz. J. Microbiol.* 2021; 52(4): 2547–53. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00565-5>
  21. Rahe M.C., Magstadt D.R., Groeltz-Thrush J., Gauger P.C., Zhang J., Schwartz K.J., et al. Bovine coronavirus in the lower respiratory tract of cattle with respiratory disease. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2022; 34(3): 482–8. <https://doi.org/10.1177/10406387221078583>
  22. Soules K.R., Rahe M.C., Purtle L., Moeckly C., Stark P., Samson C., et al. Bovine coronavirus infects the respiratory tract of cattle challenged intranasally. *Front. Vet. Sci.* 2022; (9): 878240. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.878240>
  23. Blakebrough-Hall C., Hick P., Mahony T.J., González L.A. Factors associated with bovine respiratory disease case fatality in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 2022; 100(1): skab361. <https://doi.org/10.1093/jas/skab361>
  24. Deepak Aly S.S., Love W.J., Blanchard P.C., Crossley B., Van Eenennaam A.L., Lehenbauer T.W. Etiology and risk factors for bovine respiratory disease in pre-weaned calves on California dairies and calf ranches. *Prev. Vet. Med.* 2021; 197: 105506. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105506>
  25. L'vov D.K., Al'khovskiy S.V., Kolobukhina L.V., Burtseva E.I. Etiology of epidemic outbreaks covid-19 in Wuhan, Hubei province, Chinese people republic associated with 2019-nCoV (Nidovirales, Coronaviridae, Coronavirinae, Betacoronavirus, subgenus Sarbecovirus): lessons of SARS-COV outbreak. *Voprosy virusologii.* 2020; 65(1): 6–15. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-1-6-15> (in Russian)
  26. Koromyslov G.F., Avilov V.S., Gogolev M.M. Rotavirus and coronavirus infection of calves. *Vestnik sel'skokhozyaystvennoy nauki.* 1984; (7): 129–36. (in Russian)
  27. Decaro N., Elia G., Campolo M., Desario C., Mari V., Radogna A., et al. Detection of bovine coronavirus using a TaqMan-based real-time RT-PCR assay. *J. Virol. Methods.* 2008; 151(2): 167–71. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.05.01>
  28. Zhao H., Liu J., Li Y., Yang C., Zhao S., Liu J., et al. Validation of reference genes for quantitative real-time PCR in Bovine PBMCs transformed and non-transformed by Theileria annulata. *Korean J. Parasitol.* 2016; 54(1): 39–46. <https://doi.org/10.3347/kjp.2016.54.1.39>
  29. Takiuchi E., Stipp D.T., Alfieri A.F., Alfieri A.A. Improved detection of bovine coronavirus N gene in faeces of calves infected naturally by a semi-nested PCR assay and an internal control. *J. Virol. Methods.* 2006; 131(2): 148–54. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.08.005>
  30. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 2016; 7(33): 1870–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw0544>
  31. Lotfollahzadeh S., Madadgar O., Reza Mohebbi M., Reza Mokher Dezfouli M., George W.D. Bovine coronavirus in neonatal calf diarrhoea in Iran. *Vet. Med. Sci.* 2020; 6(4): 686–94. <https://doi.org/10.1002/vms3.277>
  32. Kanno T., Hatama S., Ishihara R., Uchida I. Molecular analysis of the S glycoprotein gene of bovine coronaviruses isolated in Japan from 1999 to 2006. *J. Gen. Virol.* 2007; 88(Pt. 4): 1218–24. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82635-0>
  33. Amicone M., Borges V., Alves M.J., Isidro J., Zê-Zê L., Duarte S., et al. Mutation rate of SARS-CoV-2 and emergence of mutators during experimental evolution. *Evol. Med. Public Health.* 2022; 10(1): 142–55. <https://doi.org/10.1093/emph/eoac010>
  34. Gunn L., Collins P.J., O'Connell M.J., O'Shea H. Phylogenetic investigation of enteric bovine coronavirus in Ireland reveals partitioning between European and global strains. *Irish Vet. J.* 2015; 68: 31. <https://doi.org/10.1186/s13620-015-0060-33>
  35. Bok M., Miño S., Rodríguez D., Badaracco A., Nuñez I., Souza S.P., et al. Molecular and antigenic characterization of bovine Coronavirus circulating in Argentinean cattle during 1994–2010. *Vet. Microbiol.* 2015; 181(3–4): 221–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.10.017>
  36. De Mira Fernandes A., Brandão P.E., Dos Santos Lima M., de Souza Nunes Martins M., da Silva T.G., da Silva Cardoso Pinto V., et al. Genetic diversity of BCoV in Brazilian cattle herds. *Vet. Med. Sci.* 2018; 4(3): 183–9. <https://doi.org/10.1002/vms3.102>
  37. Zhu Q., Su M., Li Z., Wang X., Qi S., Zhao F., et al. Epidemiological survey and genetic diversity of bovine coronavirus in Northeast China. *Virus Res.* 2022; 308: 198632. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198632>
  38. Castells M., Giannitti F., Caffarena R.D., Casaux M.L., Schild C., Castells D., et al. Bovine coronavirus in Uruguay: genetic diversity, risk factors and transboundary introductions from neighboring countries. *Arch. Virol.* 2019; 164(11): 2715–24. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04384-w>

## НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-143>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



# Вариабельность генов неструктурных белков ротавируса A (Reoviridae: *Rotavirus: Rotavirus A*) генотипа G9P[8] в период доминирования на территории Нижнего Новгорода (центральная часть России) (2011–2020)

Великжанина Е.И., Сашина Т.А., Морозова О.В., Епифанова Н.В., Новикова Н.А.

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

**Введение.** В России ротавирус A является основной причиной тяжёлого гастроэнтерита вирусной этиологии у детей раннего возраста. Молекулярные особенности, позволяющие ротавирусу того или иного генотипа получить эволюционное преимущество, остаются неясны, поэтому изучение генетического разнообразия ротавирусов на основе генов, кодирующих неструктурные белки, ответственных за репродукцию вируса в клетке, является актуальной задачей.

**Цель работы** – изучение генетического разнообразия ротавирусов генотипа G9P[8], доминировавшего в Нижнем Новгороде в 2011–2020 гг., на основе генов, кодирующих неструктурные белки.

**Материалы и методы.** Ротавирус-положительные образцы стула детей исследовали методами ПЦР-генотипирования и секвенирования нуклеотидных последовательностей генов *NSP1–NSP5*. Филогенетический анализ проводили в программе MEGA X.

**Результаты.** В период 2011–2020 гг. в Нижнем Новгороде происходила коциркуляция ротавирусов G9P[8], имеющих четыре варианта гена *NSP2*. Новые аллели были отмечены в 2012 (N1-a-III), 2016 (N1-a-IV) и 2019 гг. (N1-a-II). Появление новых вариантов других генов произошло в 2014 (E1-3, *NSP4*), 2018 (T1-a3-III, *NSP3*) и 2019 гг. (A1-b-II, *NSP1*). Наиболее вариабельным по аминокислотной последовательности был *NSP2* (16 замен), для *NSP1*, *NSP3* и *NSP4* было показано от 2 до 7 замен, *NSP5* был консервативен.

**Обсуждение.** Полученные результаты согласуются с данными литературы и свидетельствуют об участии генов *NSP* в поддержании гетерогенности популяции ротавирусов.

**Заключение.** До 2018 г. генетическое разнообразие ротавирусов в Нижнем Новгороде определялось коциркуляцией штаммов, несущих несколько аллелей гена *NSP2*, и консервативными генами *NSP1*, *NSP3–NSP5*. К концу изучаемого периода в популяции сформировались новые варианты генотипа G9P[8], несущие ранее не встречавшиеся комбинации аллелей неструктурных генов.

**Ключевые слова:** ротавирус; неструктурные гены; филогенетический анализ; генетические варианты; аминокислотные замены

**Для цитирования:** Великжанина Е.И., Сашина Т.А., Морозова О.В., Епифанова Н.В., Новикова Н.А. Вариабельность генов неструктурных белков ротавируса A (Reoviridae: *Rotavirus: Rotavirus A*) генотипа G9P[8] в период доминирования на территории Нижнего Новгорода (центральная часть России) (2011–2020). *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(6): 475–486. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-143>

**Для корреспонденции:** Великжанина Елена Игоревна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 603950, г. Нижний Новгород, Россия. E-mail: [www.e\\_velikzhanina@mail.ru](mailto:www.e_velikzhanina@mail.ru)

**Участие авторов:** Великжанина Е.И. – проведение экспериментальных исследований, обработка данных, написание и редактирование текста; Сашина Т.А. – проведение экспериментальных исследований, контроль проведения исследований, написание и редактирование текста; Морозова О.В. – редактирование текста; Епифанова Н.В. – проведение экспериментальных исследований, редактирование текста; Новикова Н.А. – организация и контроль проведения исследований, редактирование текста.

**Финансирование.** Исследование проведено в рамках выполнения Государственного задания Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор).

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

**Этическое утверждение.** Исследование проводилось при добровольном информированном согласии законных представителей несовершеннолетних пациентов. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (протокол № 6 от 24.03.2021).

Поступила 28.09.2022

Принята в печать 21.11.2022

Опубликована 30.12.2022

## ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-143>

# Variability of genes encoding nonstructural proteins of rotavirus A (Reoviridae: *Rotavirus: Rotavirus A*) genotype G9P[8] during the period of dominance in the territory of Nizhny Novgorod (central part of Russia) (2011–2020)

Elena I. Velikzhanina, Tatiana A. Sashina, Olga V. Morozova, Natalia V. Epifanova, Nadezhda A. Novikova

«Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology», 603950, Nizhny Novgorod, Russia

**Introduction.** In Russia, rotavirus A is the main cause of severe viral gastroenteritis in young children. The molecular features that allow a rotavirus of a particular genotype to gain an evolutionary advantage remain unclear, therefore, the study of the genetic diversity of rotaviruses based on genes encoding nonstructural proteins (NSPs) responsible for the reproduction of the virus in the cell is an urgent task.

**Objective.** To study the genetic diversity of rotaviruses of genotype G9P[8], which dominated Nizhny Novgorod in 2011–2020, based on genes encoding nonstructural proteins.

**Materials and methods.** Rotavirus-positive samples were subjected to PCR-genotyping and sequencing of *NSP1–NSP5* genes. Phylogenetic analysis was carried out in the MEGA X program.

**Results.** In the period 2011–2020, G9P[8] rotaviruses with four variants of the *NSP2* gene were co-circulating in Nizhny Novgorod. New alleles were noted in 2012 (N1-a-III), 2016 (N1-a-IV) and in 2019 (N1-a-II). The appearance of new variants of other genes occurred in 2014 (E1-3, *NSP4*), 2018 (T1-a3-III, *NSP3*) and in 2019 (A1-b-II, *NSP1*). *NSP2* gene had the most variable amino acid sequence (16 substitutions), 2 to 7 substitutions were observed in *NSP1*, *NSP3* and *NSP4*, *NSP5* was conservative.

**Discussion.** The results obtained are consistent with the literature data and indicate the participation of *NSP* genes in maintaining the heterogeneity of the rotavirus population.

**Conclusion.** Until 2018, the genetic diversity of rotaviruses in Nizhny Novgorod was determined by the circulation of strains carrying several alleles of the *NSP2* gene and conservative genes *NSP1*, *NSP3–NSP5*. By the end of the study period, new variants of the genotype G9P[8] were formed in the population, carrying previously unknown combinations of alleles of nonstructural genes.

**Keywords:** rotavirus; nonstructural genes; phylogenetic analysis; genetic variants; amino acid substitutions

**For citation:** Velikzhanina E.I., Sanina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Variability of genes encoding nonstructural proteins of rotavirus A (Reoviridae: *Rotavirus: Rotavirus A*) genotype G9P[8] during the period of dominance in the territory of Nizhny Novgorod (central part of Russia) (2011–2020). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(6): 475–486. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-143>

**For correspondence:** Elena I. Velikzhanina, Junior Researcher at the Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 603950, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: [www.e\\_velikzhanina@mail.ru](mailto:www.e_velikzhanina@mail.ru)

**Information about authors:**

Velikzhanina E.I., <https://orcid.org/0000-0003-4069-1427>

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

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

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

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

**Contribution:** Velikzhanina E.I. – conducting experimental research, data processing, writing and editing text; Sashina T.A. – conducting experimental research, monitoring research, writing and editing text; Morozova O.V. – editing text; Epifanova N.V. – experimental research, editing text; Novikova N.A. – organization and control of research, text editing.

**Funding.** The study was conducted as part of the State Task of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-Being (Rosпотrebnadzor).

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

**Ethics approval.** The study was conducted with the informed consent of the legal representatives of minor patients. The research protocol was approved by the Local Ethics Committee of the FSBI “Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology” of the Federal Service for Supervision of Consumer Right Protection and Human Welfare (Rosпотrebnadzor) (Protocol No. 6 dated March 24, 2021).

Received 28 September 2022

Accepted 21 November 2022

Published 30 December 2022

## Введение

Ротавирусы (РВ, род *Rotavirus*, семейство Reoviridae) являются важным этиологическим агентом тяжёлых дегидратирующих диарей преимущественно у детей младшего возраста, в разных странах обуславливая от 30 до 70% случаев острого гастроэнтерита, требующих госпитализации [1]. Повсеместное распространение, стабильность возбудителя во внешней среде, большое разнообразие факторов передачи и выраженная сезонность являются причинами высокого уровня заболеваемости населения ротавирусной инфекцией [2].

РВ имеют сегментированный двухцепочечный РНК-геном, состоящий в общей сложности из около 18 555 нуклеотидов [3, 4]. Наличие сегментированного генома обуславливает способность к обмену сегментами (реассортации) между штаммами разных генотипов при одновременном инфицировании клетки, что является важным механизмом эволюции и поддержания генетического разнообразия РВ [5].

Одиннадцать сегментов РНК ротавирусов вида А (РВА) кодируют 12 белков. Шесть белков являются структурными компонентами капсида (VP1–VP4, VP6, VP7), принимающими участие в построении вирусной частицы и проникновении в клетку-хозяина. Остальные шесть белков являются неструктурными и выполняют такие важные функции, как блокировка апоптоза и механизмов врождённой иммунной защиты клеток (NSP1), репликация генома вируса, упаковка капсида и формирование вироплазм (NSP2 и NSP5), ингибирование синтеза белков хозяина (NSP3), интоксикация организма, что ведёт к появлению дегидратирующих диарей (NSP4) [6].

РВ характеризуются широким антигенным и генетическим разнообразием. У РВА человека и животных в рамках бинарной классификации установлено существование не менее 41 G-генотипа (детерминирован геном гликопротеина VP7) и 57 P-генотипов (детерминирован геном протеазочувствительного белка VP4). Помимо бинарной, существует полногеномная классификация, позволяющая отнести каждый сегмент генома вируса к определённому генотипу [7]. Для описания полного генотипа используют обозначение Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, для генов, кодирующих белки, – VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5/NSP6 соответственно [5].

В настоящее время в мире наиболее распространёнными считаются шесть G[P]-типов РВА: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и G12P[8] [8–11]. РВ данных генотипов широко распространены и на территории России. Представители G9P[8] были впервые идентифицированы у новорождённых г. Омска в 2002 г., а в 2009 г. обнаружены в европейской части России (Московская область) [12–15]. В Нижнем Новгороде этот генотип был выявлен в сезон 2011–2012 гг., когда его доля составила 26,9%, а к 2016 г. он стал доминирующим (58,8%) [8, 16].

РВ генотипа G9P[8] ранее были охарактеризованы на основе генов, кодирующих белки VP7 и VP4,

участвующие в проникновении вируса в клетку [8, 13, 17]. Высокая активность циркуляции РВ может поддерживаться за счёт эволюционных изменений неструктурных белков, ответственных за репродукцию вируса в клетке. Основной функцией белка NSP1 является блокирование апоптоза и механизмов врождённой иммунной защиты клеток [18]. Белок NSP2 участвует в репликации генома вируса и упаковке капсида, совместно с NSP5 играет решающую роль в формировании вироплазм при созревании вирусных частиц [19]. NSP3 участвует в ингибировании синтеза белков хозяина, инактивируя два фактора инициации трансляции (eIF4F и eIF2), необходимые для трансляции мРНК (матричной) клетки-хозяина [20]. Гликопротеин NSP4 является ротавирусным энтеротоксином и обладает иммуногенными свойствами [21]. Как известно, 11-й геномный сегмент кодирует два белка РВ – NSP5 и NSP6. Открытая рамка считывания гена *NSP6* располагается между нуклеотидными позициями 80–358 и кодирует белок NSP6 длиной 92 аминокислотных остатка (а.о.) [22]. Белок NSP5 играет роль в репликации вирусного генома, совместно с NSP2 в инфицированных вирусом клетках участвует в образовании вироплазм. Функции белка NSP6 окончательно не определены, есть сведения, что он взаимодействует с нуклеиновыми кислотами [23].

В связи с этим **целью работы** было изучение генетического разнообразия РВ генотипа G9P[8], доминировавшего в Нижнем Новгороде в 2011–2020 гг., на основе генов, кодирующих неструктурные белки.

## Материалы и методы

В работе использовали образцы фекалий детей, госпитализированных с симптомами острой кишечной инфекции в детский инфекционный стационар Нижнего Новгорода в период 2011–2020 гг.

Для экстракции нуклеиновых кислот и постановки реакции обратной транскрипции применяли наборы реагентов «РИБО-преп» и «РЕВЕРТА-L» (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора (ЦНИИЭ), Россия). Обнаружение ротавирусной РНК проводили с использованием тест-системы полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией результата в реальном времени «АмплиСенс Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL» (ЦНИИЭ, Россия).

Определение G/P-генотипа РВ осуществляли в ходе мультиплексной ПЦР для идентификации 12 генотипов генов VP4 и VP7 с использованием набора типоспецифических праймеров для генотипов G1–G4, G6, G8, G9, G12, P[4], P[6], P[8] и P[9] [24–29]. Детекцию результатов проводили с помощью электрофореза в агарозном геле, содержащем бромид этидия.

Наработку фрагментов кДНК (комплементарной) для секвенирования осуществляли в ходе ПЦР с использованием реактивов производства ООО «Силекс» (Россия) и праймеров, синтезированных в ООО НПФ «Синтол» (Россия). Последовательности праймеров опубликованы в работе Т.А. Sashina и соавт. [13].

Секвенирование кДНК фрагментов неструктурных генов *NSP1–NSP5* проводили по двум цепям с помощью прямого и обратного праймера [13], набора для постановки реакции секвенирования Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) QuickStartKit (Beckman Coulter, США) и системы генетического анализа Beckman Coulter CEQ 8000 (Beckman Coulter, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Поиск родственных последовательностей выполняли с использованием онлайн-сервиса BLAST. Для филогенетического анализа из базы данных GenBank были взяты нуклеотидные последовательности генома нижегородских штаммов РВ, опубликованные ранее [14, 17], и из других стран, доступные в GenBank. Полученные в данной работе нуклеотидные последовательности размещены в GenBank под номерами MW842500–MW842550.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей, филогенетический анализ и анализ выведенных аминокислотных последовательностей осуществляли с помощью программного обеспечения MEGA X [30]. Для статистической оценки топологии дерева проводили бутстрэп-анализ с использованием 1000 случайных выборок. Оптимальную модель замен нуклеотидов для каждого выравнивания подбирали с использованием байесовского информационного критерия. Наиболее подходящей моделью для генов *NSP1–NSP4* была трёхпараметрическая модель Тамуры (Tamura 3-parameter), а для гена *NSP5* – двухпараметрическая модель Кимуры (Kimura 2-parameter). Филогенетические деревья строили методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) в программе MEGA X [31].

Принадлежность изучаемых штаммов к филогенетическим линиям и сублиниям определяли на основе

кластеризации изолятов на филогенетических деревьях с индексом поддержки узлов более 75 и высокого уровня сходства нуклеотидных последовательностей (97,0–100,0%). Филогенетические линии и сублинии обозначили согласно принятой в литературе классификации [13, 17, 32–35].

Исследование проводилось при добровольном информированном согласии законных представителей несовершеннолетних пациентов. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (протокол № 6 от 24.03.2021).

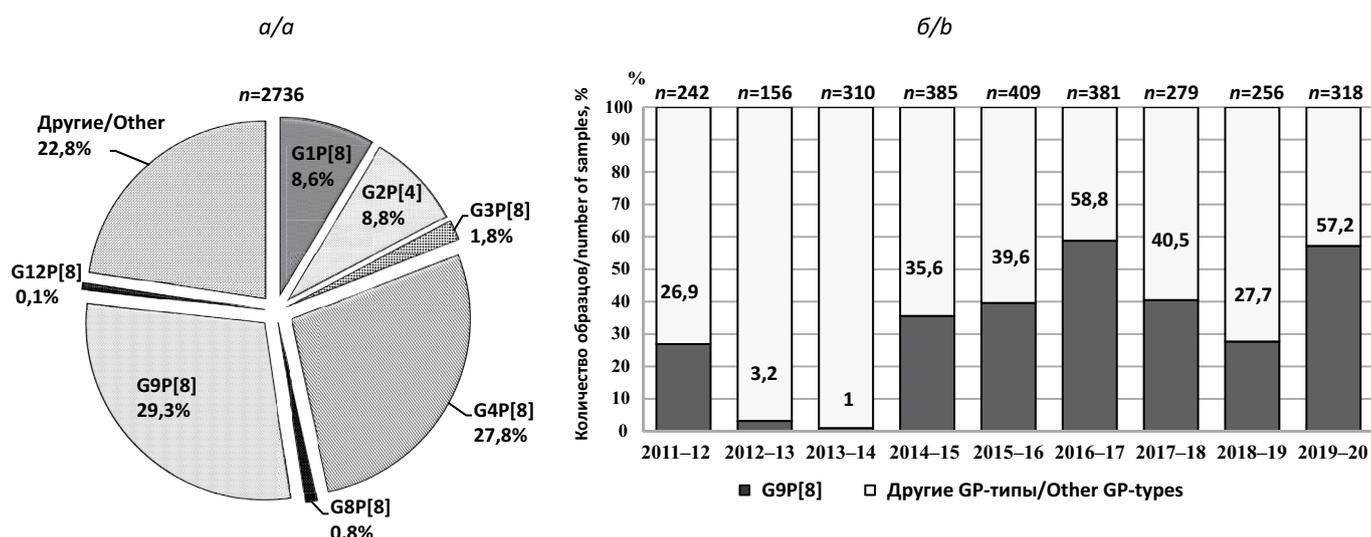
### Результаты

В период 2011–2020 гг. исследовано 13 777 образцов фекалий детей, госпитализированных с диагнозом «острая кишечная инфекция». В 3994 случаях (28,9%) была обнаружена ротавирусная РНК, которую в дальнейшем использовали для G[P]-генотипирования. Методом ПЦР в 2736 образцах (68,5%) определён G[P]-тип РВ. Для 1258 образцов (31,5%) генотип установить не удалось.

*Долевой вклад ротавирусов генотипа G9P[8] в период 2011–2020 гг. в Нижнем Новгороде*

Долевое распределение РВ разных генотипов в изучаемый период показано на рис. 1 а.

Спектр идентифицированных методом ПЦР G/P-генотипов РВ включал 6 широко распространённых в мире (G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] и G12P[8]). За весь изучаемый период долевой вклад генотипа G9P[8] составил 29,3%, и было отмечено его



**Рис. 1.** Распределение генотипов ротавируса А в Нижнем Новгороде в период 2011–2020 гг.: а – долевое распределение ротавирусов основных генотипов за весь изучаемый период; б – долевой вклад ротавирусов генотипа G9P[8] в разные сезоны изучаемого периода.

**Fig. 1.** Distribution of rotavirus A genotypes in Nizhny Novgorod in the period 2011–2020: а – the percent distribution of basic genotypes of rotaviruses in whole study period; б – the percent of genotype G9P[8] rotaviruses in different seasons of the period of study.

доминирование на территории Нижнего Новгорода. Второе место занимали штаммы генотипа G4P[8] – 27,8%, далее G2P[4] (8,8%), G1P[8] (8,6%), G3P[8] (1,8%), G8P[8] (0,8%) и G12P[8] (0,1%).

В разные сезоны наблюдалось колебание долевого вклада РВ генотипа G9P[8]. Впервые данные штаммы были обнаружены на территории Нижнего Новгорода в сезон 2011–2012 гг., когда их доля составила 26,9% (рис. 1 б). Следующие два сезона характеризовались низкой активностью циркуляции РВ генотипа G9P[8] (1,0–3,2%), которая к сезону 2014–2015 гг. существенно возросла, достигнув 35,6%. В сезон 2015–2016 гг. вклад РВ данного генотипа достиг 39,6%, и они вытеснили доминировавшие ранее штаммы генотипа G4P[8]. Сезон 2016–2017 гг. отличался наибольшей долей представителей генотипа G9P[8], которая составила 58,8%. К 2017–2018 гг. их доля снизилась до 40,5%, а в сезон 2018–2019 гг. – до 27,7%. В 2019–2020 гг. генотип G9P[8] вновь стал превалировать с показателем 57,2%.

Колебания долевого вклада РВ генотипа G9P[8] могли быть связаны с генетическими перестройками в популяции, затрагивающими неструктурные гены.

*Филогенетический анализ ротавирусов генотипа G9P[8] на основе генов NSP1–NSP5*

Для молекулярно-генетической характеристики РВ генотипа G9P[8] на основе генов, кодирующих неструктурные белки, были взяты 16 штаммов, выявленных в разные сезоны периода 2011–2020 гг.

На рис. 2 а представлено сокращенное филогенетическое дерево, содержащее 86 нуклеотидных последовательностей гена NSP1 РВ, в том числе 21 последовательность из Нижнего Новгорода.

В изучаемый период на территории Нижнего Новгорода были идентифицированы РВ генотипа А1, принадлежащие к двум сублиниям (А1-b-I и А1-b-II) филогенетической линии А1-b. Основная часть нижегородских штаммов генотипа G9P[8], выделенных на протяжении всего изучаемого периода (86,7%), а также родственные им РВ из Венгрии, Германии, Италии и Египта, которые имели генотипы G1P[8], G4P[8], G9P[8] и G12P[8], вошли в сублинию А1-b-I. Сходство нуклеотидных последовательностей нижегородских штаммов внутри сублинии составило 97,8–99,9%. Также представителями сублинии

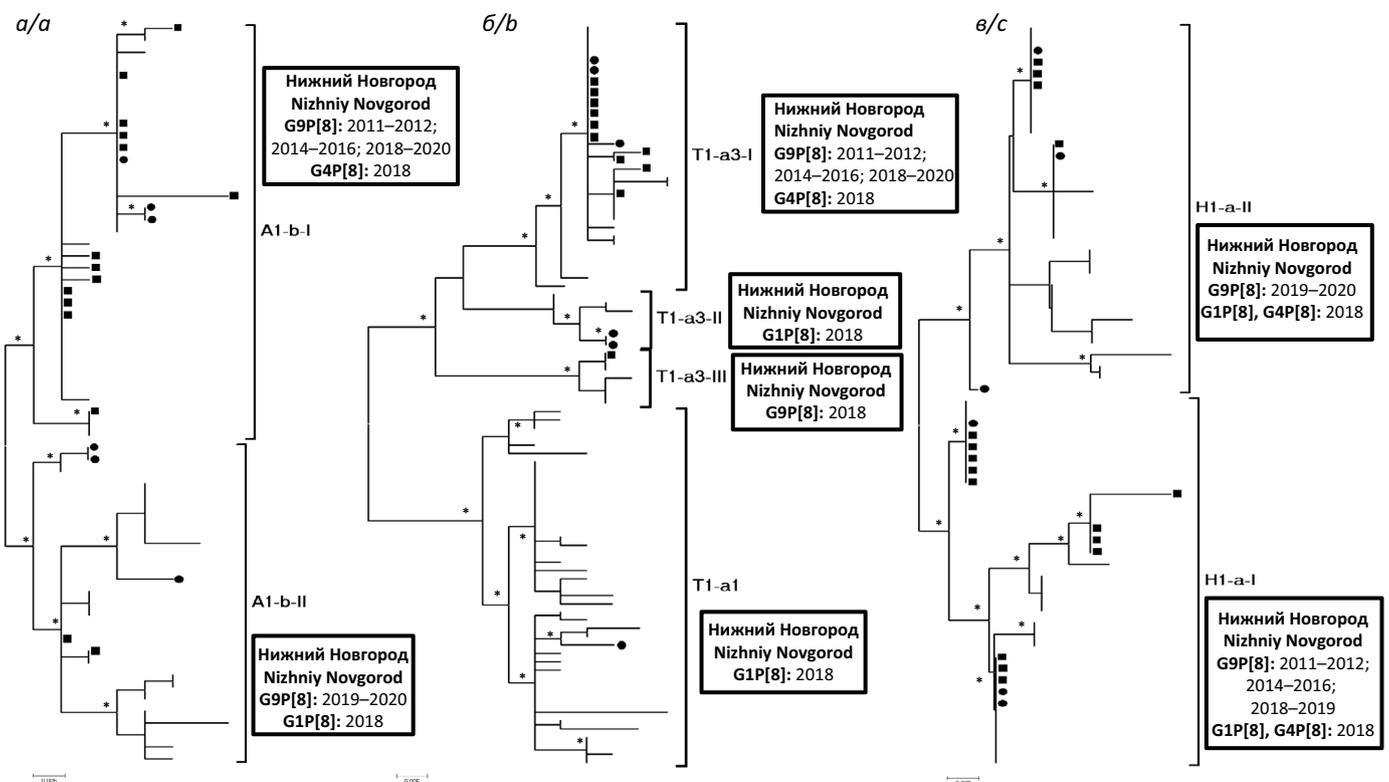


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей гена: а – NSP1; б – NSP3; в – NSP5 штаммов ротавируса А.

Знаком ■ отмечены штаммы ротавируса А генотипа G9P[8]; знаком ● отмечены штаммы ротавируса А других генотипов (G1P[8], G4P[8]).

\*Индекс поддержки узла более 75.

Fig. 2. Phylogenetic tree based on the nucleotide sequences: а – NSP1; б – NSP3; в – NSP5 gene of rotavirus A strains.

A sign ■ the strains of the G9P rotavirus A genotype are marked G9P[8]; with a sign ● rotavirus A strains of other genotypes (G1P[8], G4P[8]) were noted.

\*Node support index over 75.

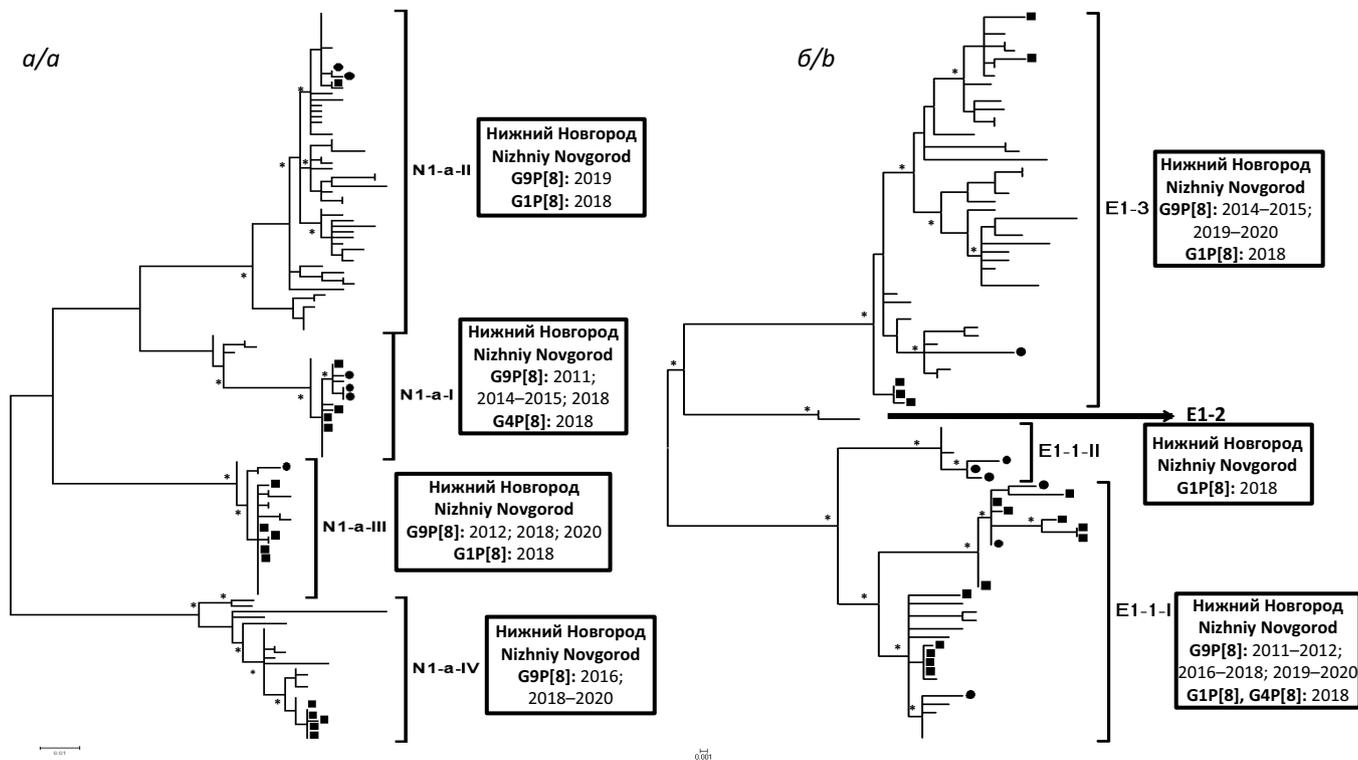
A1-b-I были 3 штамма из Нижнего Новгорода с генотипом G4P[8]. В сублинию A1-b-II вошли 2 штамма генотипа G9P[8] из Нижнего Новгорода, выделенные в 2019–2020 гг., сходство нуклеотидных последовательностей которых составило 99,6%. Их ближайшими родственниками были изоляты РВА с генотипами G9P[8] и G12P[8] из Пакистана и Парагвая. Отличие данных штаммов от представителей сублинии A1-b-I составило 6,3–8,1%. В состав данной сублинии также вошли 3 нижегородских штамма генотипа G1P[8].

Для изучения внутригенотипового разнообразия РВ на основе гена *NSP2* были взяты 107 нуклеотидных последовательностей, в том числе 21 – из Нижнего Новгорода. Адаптированное филогенетическое дерево показано на **рис. 3 а**. Анализируемые нуклеотидные последовательности РВ имели генотип N1, принадлежали к одной филогенетической линии N1-a и четырём сублиниям (I–IV). Сходство нуклеотидных последовательностей гена *NSP2* штаммов внутри сублиний составило 99,7–99,9%. Различие между представителями разных сублиний составило от 4,8 до 10%.

В сублинию N1-a-I вошли 4 штамма из Нижнего Новгорода, выявленные в 2018–2019 гг. Их ближайшими родственниками были изоляты с генотипами

G1P[8] и G4P[8] из Нижнего Новгорода, Новосибирска и Омска. В сублинию N1-a-II вошёл один нижегородский штамм генотипа G9P[8], выявленный в 2019 г., а также родственные ему РВ из Нижнего Новгорода, США, Италии, Японии и Новосибирска, которые имели генотипы G1P[8] и G3P[8]. Пять штаммов генотипа G9P[8] из Нижнего Новгорода, выявленные в 2012 и 2020 гг., были представителями сублинии N1-a-III. Им были родственны изоляты из Венгрии, Японии и Новосибирска с генотипом G1P[8]. В состав данной сублинии также вошёл один нижегородский штамм G1P[8] (2018). Сублиния N1-a-IV включала 5 нижегородских штаммов, выявленных в 2016 и 2019 гг., и родственные им РВ генотипа G4P[8] из Новосибирска и Эфиопии, выявленные в 2012 и 2016 гг.

Филогенетическое дерево, содержащее 89 нуклеотидных последовательностей гена *NSP3*, включая 17 из Нижнего Новгорода, приведено на **рис. 2 б**. Нижегородские РВ генотипа G9P[8] относились только к одной линии (T1-a3), при этом 10 из 11 (90,9%) штаммов вошли в состав сублинии T1-a3-I. Сходство нуклеотидных последовательностей этих штаммов между собой составило 99,1–99,6%. Их ближайшими



**Рис. 3.** Филогенетическое дерево, построенное на основе нуклеотидных последовательностей гена: а – *NSP2*; б – *NSP4* штаммов ротавируса А.

Знаком ■ отмечены штаммы ротавируса А генотипа G9P[8]; знаком ● отмечены штаммы ротавируса А других генотипов (G1P[8], G4P[8]).

\*Индекс поддержки узла более 75.

**Fig. 3.** Phylogenetic tree based on the nucleotide sequences: а – *NSP2*; б – *NSP4* gene of rotavirus A strains.

A sign ■ the strains of the G9P rotavirus A genotype are marked G9P[8]; with a sign ● rotavirus A strains of other genotypes (G1P[8], G4P[8]) were noted.

\*Node support index over 75.

ми родственниками были РВ с генотипами G9P[8] и G4P[8] из Венгрии и Таиланда. В состав данной сублинии также вошли 3 нижегородских штамма генотипа G4P[8], выявленные в 2018 г., однако сходство их нуклеотидных последовательностей с изучаемыми штаммами составило лишь 95,5–96,0%. Один штамм генотипа G9P[8], выявленный в Нижнем Новгороде в 2018 г., вошёл в сублинию T1-a3-III, которой также принадлежали 2 нижегородских РВ генотипа G1P[8]. Отличие данного штамма от T1-a3-I составило 8,1%.

Для анализа на основе гена *NSP4* взяты нуклеотидные последовательности 23 нижегородских штаммов, выявленных в Нижнем Новгороде, и 63 последовательности из других стран. Филогенетическое дерево представлено на **рис. 3 б**. Изучаемые нижегородские РВ имели генотип E1 и относились к двум филогенетическим линиям (E1-1 и E1-3).

Двенадцать штаммов генотипа G9P[8] (70,6%) были представителями сублинии E1-1-I. Сходство нуклеотидных последовательностей составило 98,9–99,9%. Им были родственны штаммы с генотипами G1P[8] и G12P[8] из Австралии, Германии, США и Италии, выделенные в период 2008–2016 гг.

Линия E1-3 включала 4 штамма генотипа G9P[8] (29,4%) из Нижнего Новгорода, сходство нуклеотидных последовательностей между которыми составило 97,9–99,9%. Им были родственны один нижегородский штамм генотипа G1P[8] и РВ из Японии, Бельгии, Китая и Зимбабве с генотипами G1P[8], G3P[8] и G9P[8], выявленные в период 2010–2014 гг. Уровень различия нуклеотидных последовательностей пред-

ставителей кластеров E1-1-I и E1-3 составил 14,9%.

В анализ на основе гена *NSP5* были взяты 22 нижегородских РВ. Филогенетическое дерево, содержащее в сумме 93 нуклеотидные последовательности, показано на **рис. 2 в**. Штаммы генотипа G9P[8] из Нижнего Новгорода имели генотип N1, принадлежали к одной филогенетической линии N1-a и относились к двум сублиниям – N1-a-I и N1-a-II. Сходство их нуклеотидных последовательностей внутри сублиний составило 98,9–99,4%, в то время как различие между представителями разных сублиний варьировало от 3,1 до 3,7%.

Сублиния N1-a-I включала 12 нижегородских штаммов генотипа G9P[8] (2011–2019 гг.) и 3 штамма генотипов G1P[8] и G4P[8]. Ближайшими родственниками были РВА с генотипами G4P[8], G12P[8] и G1P[8] из Венгрии, Японии и Эфиопии, выделенные в 2008–2016 гг. В сублинию N1-a-II вошли 4 РВ генотипа G9P[8], циркулировавшие на территории Нижнего Новгорода в 2019–2020 гг., и 3 штамма других генотипов, выявленные в 2018 г. Родственные им штаммы имели генотипы G1P[8] и G12P[8] и были выявлены на территории Таиланда, Италии и Никарагуа в период 2010–2014 гг. Сочетание сублиний генов, кодирующих неструктурные белки, изучаемых штаммов РВ обобщены в **таблице**.

На протяжении всего изучаемого периода в нижегородской популяции происходила коциркуляция четырёх вариантов гена *NSP2*, при этом новые аллели отмечены в 2012 (N1-a-III), 2016 (N1-a-IV) и 2019 гг. (N1-a-II). Появление новых вариантов других генов

**Таблица. Сочетания сублиний неструктурных генов *NSP1–NSP5/NSP6* у ротавирусов генотипа G9P[8] в Нижнем Новгороде**  
**Table. Genes *NSP1–NSP5/NSP6* sublineages combinations among G9P[8] rotaviruses in Nizhny Novgorod**

Штамм Strain	Год выявления Isolation year	Сегмент генома Genome segment					
		VP7, VP4 [8, 13, 17]	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5/6
NN2626	2011	G9-III-d, P[8]-3.6 [8]	A1-b-I	N1-a-I	T1-a3-I	E1-1-I	H1-a-I
NN445	2012	G9-III-d, P[8]-3.6	–	N1-a-III	T1-a3-I	E1-1-I	H1-a-I
NN459	2012	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	–	–	E1-1-I	H1-a-I
NN561	2012	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	N1-a-III	–	E1-1-I	H1-a-I
NN2721	2014	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	N1-a-I	T1-a3-I	E1-3	H1-a-I
NN414	2015	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	N1-a-I	T1-a3-I	E1-3	H1-a-I
NN176	2016	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	N1-a-IV	T1-a3-I	E1-1-I	H1-a-I
NN291	2016	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	N1-a-IV	T1-a3-I	E1-1-I	H1-a-I
NN385	2018	G9-III-d, P[8]-3.6 [13]	A1-b-I	N1-a-III	T1-a3-I	E1-1-I	H1-a-I
NN386	2018	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	N1-a-IV	T1-a3-I	E1-1-I	H1-a-I
NN568	2018	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	N1-a-I	T1-a3-III	E1-1-I	H1-a-I
NN856	2019	G9-VI-e, P[8]-3.6 [17]	A1-b-II	N1-a-II	–	E1-3	H1-a-I
NN1217	2019	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	N1-a-IV	T1-a3-I	E1-1-I	H1-a-II
NN1428	2019	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	N1-a-IV	–	E1-1-I	H1-a-II
NN839	2020	G9-III-d, P[8]-3.3	A1-b-II	N1-a-III	T1-a3-I	E1-3	H1-a-II
NN877	2020	G9-III-d, P[8]-3.6	A1-b-I	N1-a-III	–	E1-1-I	H1-a-II

происходило в 2014 (E1-3, ген *NSP4*), 2018 (T1-a3-III, ген *NSP3*), 2019 гг. (A1-b-II, ген *NSP1*; H1-a-II, ген *NSP5*).

*Анализ выведенных аминокислотных последовательностей неструктурных белков ротавируса А генотипа G9P[8]*

Анализ аминокислотной последовательности белка *NSP1* показал, что представители сублинии A1-b-II, появившиеся в нижегородской популяции в 2019 г., отличались от циркулировавших ранее РВ сублинии A1-b-I в 6 позициях (76, 115, 119, 131, 165 и 199). Анализ аминокислотной последовательности белка *NSP2*, штаммов генотипа N1, относящихся к 4 сублиниям (N1-a-I, N1-a-II, N1-a-III и N1-a-IV), показал вариабельность в 16 позициях (64, 75, 82, 97, 98, 100, 108, 118, 135, 143, 200, 218, 249, 253, 254 и 255). Среди представителей разных сублиний генотипа N1 наибольшее количество различий в аминокислотной последовательности (8 замен) имели штаммы сублинии N1-a-III, присутствовавшие в нижегородской популяции в 2012, 2018 и 2020 гг. РВ сублинии N1-a-I, циркулировавшие в период 2011–2018 гг., имели 3 аминокислотных отличия от других сублиний. Штаммы сублинии N1-a-IV, выявленные в Нижнем Новгороде в 2016 г., имели 4 аминокислотные замены, в то время как изолят, относившийся к сублинии N1-a-II (2019), характеризовался наличием двух замен. Анализ аминокислотной последовательности белка *NSP3* показал вариабельность представителя сублинии T1-a3-III в двух позициях (222 и 255) в сравнении со штаммами T1-a3-I, консервативными на протяжении всего периода изучения. В целом РВ, относящиеся к двум филогенетическим линиям (E1-1-I и E1-3), были вариабельны в 12 позициях белка *NSP4*. РВ линии E1-3, встречавшиеся в популяции в 2014–2015 и 2019–2020 гг., имели 7 замен аминокислот (D124E, K150R, V154I, I155V, V158I, S174N, S182V/I) в сравнении со штаммами линии E1-1 (сублинии I), циркулировавшими на протяжении всего изучаемого периода.

Анализ аминокислотной последовательности белка *NSP5/NSP6* представителей сублиний H1-a-I и H1-a-II показал вариабельность в 6 позициях (124, 153, 170, 182, 185, 195). Однако замен аминокислот, отличавших одну сублинию от другой, не обнаружено. Все замены были единичными (S124G, R153K, S170R, K182N, F185Y, A195S) и характерными для штаммов обеих сублиний, выявленных в 2012 (3 штамма), 2018 (3 штамма) и 2019 гг. (1 штамм).

Таким образом, у РВ генотипа G9P[8] наибольшее число замен наблюдалось в аминокислотной последовательности белка *NSP2* (16 позиций), которая была вариабельна на протяжении всего изучаемого периода. Для белков *NSP1*, *NSP3*, *NSP4* показано от 2 до 7 замен, специфичных для всех представителей определённых сублиний. Белок *NSP5* был наиболее консервативен: у единичных штаммов выявлены замены в 6 позициях.

## Обсуждение

По данным литературы, штаммы РВ генотипа G9P[8] широко распространены в мире, причём на некоторых территориях они занимают доминирующее положение. Так, например, X. Zhou и соавт. (2020) в своей работе отмечали, что доля генотипа G9P[8] в Китае за период 2011–2019 гг. составила 74,5% [36]. Также отмечено преобладание G9P[8] в разных областях Италии, которое началось в 2008–2009 гг. [37]. Период 2012–2013 гг. характеризовался высокой долей РВ с генотипом G9P[8] в Москве (30%), которые были родственны нижегородским и турецким штаммам. Далее в 2015–2020 гг. штаммы данного генотипа доминировали в общей структуре с долей 37% [38]. В Нижнем Новгороде РВ генотипа G9P[8] доминировали в 2011–2020 гг. Долевой вклад G9P[8] в разные сезоны менялся и составлял от 1 до 58,8%.

Для генотипа G9 выделено шесть филогенетических линий (I–VI) гена *VP7*. Представители линии G9-III широко распространены по всему миру [39]. Нижегородские РВ, выделенные в 2011–2016 гг., группировались на филогенетическом дереве внутри сублинии G9-III-d и формировали два кластера со штаммами из Новосибирска (2011–2012) и Турции (2014–2016) [8, 13]. На протяжении нескольких лет сублиния G9-III-d была единственной на территории Нижнего Новгорода. После 2018 г. в нижегородской популяции были выявлены штаммы генотипа G9P[8], относящиеся к сублинии G9-IV-e, в которую также вошли РВ человека, обнаруженные в Китае, и свиней, выделенные в Японии. Представители сублинии G9-III-d были консервативны по аминокислотному составу белка *VP7* на протяжении длительного периода и отличались от штаммов сублинии G9-VI-e одной аминокислотой в позиции 100 (D100N). Для генотипа P[8] наиболее распространённой на территории России филогенетической линией гена *VP4* является P[8]-3. В 2016–2020 гг. штаммы сублиний P[8]-3.1, P[8]-3.3 и P[8]-3.6 были широко распространены в Нижнем Новгороде, а также на территории Москвы и Новосибирска. В то же время единичные представители P[8]-3.4 были обнаружены в Нижнем Новгороде в 2017 г. и Омске в 2008 г. [17]. Используемые в данном исследовании штаммы были ранее охарактеризованы и имели аллели G9-III-d и P[8]-3.6 генов *VP7* и *VP4*.

Для генов неструктурных белков РВ генотипа G9P[8] показаны следующие особенности: консервативность на протяжении основной части изучаемого периода и появление новых аллелей к его концу (*NSP1*, *NSP3*, *NSP5*) либо вариабельность нуклеотидной последовательности (*NSP2*, *NSP4*) во время доминирования.

Так, аллель гена *NSP1* A1-b-I был единственным среди РВ G9P[8], циркулирующих на территории Нижнего Новгорода в период 2011–2018 гг. Начиная с 2019 г. в популяции отмечено появление штаммов сублинии A1-b-II и их совместная циркуляция со штаммами, несущими аллель A1-b-I. Анализ аминокислотных последовательностей белка *NSP1* показал,

что штаммы сублинии A1-b-I имели консервативный белок NSP1, в то время как штаммы сублинии A1-b-II в сравнении с ними имели 6 замен. Замены аминокислот в структуре NSP1 располагались в двух функциональных областях белковой молекулы: в РНК-связывающем домене (S76N), целостность которого важна для блокировки апоптоза и реализации механизмов врождённой иммунной защиты клеток путём деградации интерферон-регулирующих факторов (IRF3) хозяина, и в области взаимодействия с цитоскелетом (R115K, N119T, P131R, S165R), изменения в котором могут привести к перемещению белка NSP1 в ядро клетки (ядерная транслокация NSP1) [40]. Одна замена (L199V) располагалась в некодирующей области.

В случае гена *NSP3* аналогично с *NSP1* сублиния T1-a3-I являлась основной в Нижнем Новгороде и стабильной во времени на протяжении как минимум 9 лет. Появление нового аллеля (T1-a3-III) и генетическая гетерогенность РВ генотипа G9P[8] по гену *NSP3* отмечены только в 2018 г. Представители сублинии T1-a3-I имели консервативный белок NSP3 на всём протяжении изучаемого периода. У единственного представителя сублинии T1-a3-III показаны две замены аминокислот (I222V и A255V) в сравнении со штаммами сублинии T1-a3-I. Замены располагались в С-терминальной области белковой молекулы (205–313 а.о.), важной для подавления трансляции всех эукариотических мРНК. Этот домен конкурирует с поли(А)-связывающим белком (PABP) за сегмент фактора инициации трансляции эукариот 4G [18, 41, 42].

Для гена *NSP5* сублиния N1-a-I на протяжении 8 лет также была единственной среди нижегородских РВ генотипа G9P[8]. В 2019 г. в Нижнем Новгороде отмечено появление представителей сублинии N1-a-II. Различий в аминокислотной последовательности NSP5 между представителями разных сублиний не обнаружено. Показаны единичные замены аминокислот у отдельных штаммов (2012, 2018–2019 гг.), которые располагались в варибельной области (S124G, K143N), в домене взаимодействия с NSP6 (S170R, K182N, F185Y, A195S), а также в домене гомомультимеризации (A195S) [43, 44].

В отличие от рассмотренных выше генов, *NSP2* РВ генотипа G9P[8] характеризовался варибельностью нуклеотидных последовательностей. Всего было показано 4 аллеля гена, которые сменяли друг друга. В 2011 г. единственной среди РВ генотипа G9P[8] была сублиния N1-a-I. В 2012 г. отмечено появление представителей сублинии N1-a-III. Далее в 2014–2015 гг. вновь циркулировали РВ, принадлежащие сублинии N1-a-I, которых в 2016 г. сменили штаммы вновь появившейся сублинии N1-a-IV. В 2018 г. отмечена совместная циркуляция РВ генотипа G9P[8], имеющих триразных аллеля гена *NSP2* (N1-a-I, N1-a-III, N1-a-IV). В 2019 г. показаны представители новой сублинии (N1-a-II) в коциркуляции с N1-a-IV, в то время как в 2020 г. отмечено присутствие только штаммов сублинии N1-a-IV.

Варибельность аминокислотных последовательностей белка NSP2 была наибольшей из всех неструк-

турных белков и затрагивала 20 позиций. Замены аминокислот в структуре NSP2 располагались в двух функциональных областях белковой молекулы. Восемь замен затрагивали N-концевой домен мономера NSP2 (S64N, I75N, A82N, N82I, E97D, I98V, N100S и V108I). Данный домен содержит участки связывания односпиральной РНК (1–97 а.о.). Предполагается, что взаимодействие с РНК происходит в петле, состоящей из 24 а.о. (52–76 а.о.). Конформационное изменение в данной области может иметь влияние на эффективность взаимодействия белка и РНК. Двенадцать замен аминокислот были локализованы в С-концевом домене (K118R, S135A, S143L, V200I, V218I, A249T, T249V, V249A, N253I, I254V, V254T и T255I), где расположен сайт присоединения и гидролиза нуклеозидтрифосфата (109–317 а.о.). Замены в данной области также могут повлиять на результативность взаимодействия белка и РНК [45].

Подобно гену *NSP2*, кластеризация нижегородских штаммов по гену *NSP4* носила временной характер. Штаммы, выявленные в 2011–2012 гг., принадлежали сублинии E1-1-I. В 2014–2015 гг. показаны представители линии E1-3. Далее, в 2016 и 2018 гг., вновь были представлены РВ сублинии E1-1-I. В период 2019–2020 гг. были отмечены возвращение представителей линии E1-3 и их совместная циркуляция со штаммами сублинии E1-1-I.

В первичной структуре *NSP4* РВ показано 12 аминокислотных замен, которые располагались в трёх областях белковой молекулы. Замена T85I находилась в регионе домена H3 (63–90 а.о.), вовлечённого в механизм удержания белка в ЭПР (эндоплазматический ретикулум). Замена (D124E) была локализована в суперскрученном домене (95–137 а.о.), важном для олигомеризации белковой молекулы энтеротоксина, его взаимодействия с кавеолином-1 и внутриклеточного транспорта NSP4 от ЭПР до поверхности клеток. Замены V158I, I166V, R167K, S174N затрагивали участок взаимодействия с белком внутреннего капсида VP6 (156–175 а.о.), который играет роль внутриклеточного рецептора для двуслойных вирусных частиц и является необходимым медиатором в вирусном морфогенезе. Другие замены находились в междоменных участках [46].

Суммируя изложенное, гены *NSP1*, *NSP3*, *NSP5* характеризовались консервативностью до 2018 г., после чего для каждого из них было обнаружено по одному новому аллелю. Наиболее варибельным из генов, кодирующих неструктурные белки, был *NSP2*. На протяжении всего изучаемого периода в нижегородской популяции происходила коциркуляция его четырёх вариантов, при этом новые аллели отмечены в 2012 (N1-a-III), 2016 (N1-a-IV) и 2019 гг. (N1-a-II). Полученные результаты согласуются с данными, представленными G. Ianigo и соавт. (2013) [37]. В ходе анализа нуклеотидных последовательностей РВ генотипа G9P[8] были выявлены различия от 2 до 7% для разных генов. Итальянские штаммы имели схожую кластеризацию на филогенетических деревьях на основе генов *NSP1*, *NSP3* и *NSP5*. Изоляты группи-

ровались в составе двух кластеров внутри генотипов A1, T1 и N1. Ген *NSP2* показал наибольшую вариативность и самые низкие показатели идентичности (92%). Штаммы составили три кластера внутри генотипа N1. Ген *NSP4* был наиболее консервативным: все исследуемые последовательности вошли в один кластер [29]. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о роли неструктурных белков, участвующих в регуляции внутриклеточных процессов, в эволюции РВ наравне со структурными.

### Заключение

Проведён ретроспективный анализ РВ генотипа G9P[8] на основе генов, кодирующих неструктурные белки. В период с 2011 по 2018 г., включивший доминирование данного генотипа в 2015–2017 гг., генетическое разнообразие РВ достигалось за счёт коциркуляции штаммов, несущих различные аллели гена *NSP2* (сублинии N1-a-I, N1-a-III, N1-a-IV). В аминокислотной последовательности *NSP2* обнаружено 16 замен, расположенных в функциональных областях, которые участвуют во взаимодействии с РНК и гидролизе нуклеозидтрифосфата.

В период с 2018 по 2020 г., характеризовавшийся спадом активности циркуляции РВ генотипа G9P[8], были отмечены появление новых аллелей генов *NSP1*, *NSP2*, *NSP3*, *NSP5* (сублинии A1-b-II, N1-a-II, T1-a3-III, N1-a-II) и возвращение аллеля гена *NSP4*, принадлежащего линии E1-3. В популяции сформировались новые варианты генотипа G9P[8], несущие ранее не встречавшиеся комбинации аллелей всех неструктурных генов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Приоритетные направления научных исследований, предпринимаемых в целях создания вакцин против диарейных болезней. *Бюллетень ВОЗ*. 2019; (6): 21–40.
2. Брико Н.И., Битиева Е.А., Горелов А.В., Горелова Е.А., Кудрявцев В.В., Миндлина А.Я. *Эпидемиология, клиника, лечение и иммунопрофилактика ротавирусной инфекции*. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2015.
3. Estes M.K., Kapikian A.Z. Rotaviruses. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 1917–73.
4. Rixon F., Taylor P., Desselberger U. Rotavirus RVA segments sized by electron microscopy. *J. Gen. Virol.* 1984; 56(1): 233–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-65-1-233>
5. Matthijnssens J., Ciarlet M., Rahman M., Attoui H., Banyai K., Estes M.K., et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *J. Arch. Virol.* 2008; 153(8): 1621–9. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>
6. Estes M.K., Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 1989; 53(4): 410–49. <https://doi.org/10.1128/mr.53.4.410-449.1989>
7. RCWG. Rotavirus classification working group; 2018. Available at: <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>
8. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Predominance of new G9P[8] rotaviruses closely related to Turkish strains in Nizhny Novgorod (Russia). *Arch. Virol.* 2017; 162(8): 2387–92. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3364-7>
9. Matthijnssens J., Heylen E., Zeller M., Rahman M., Lemey P., Van Ranst M. Phylogenetic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *J. Mol. Biol. Evol.* 2010; 27(10): 2431–6. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq137>
10. Santos N., Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *J. Rev. Med. Virol.* 2005; 15(1): 29–56. <https://doi.org/10.1002/rmv.448>
11. Kiseleva V., Faizuloev E., Meskina E., Marova A., Oksanich A., Samartseva T., et al. Molecular-genetic characterization of human rotavirus strains circulating in Moscow, Russia (2009–2014). *Virol. Sin.* 2018; 33(4): 304–13. <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0043-0>
12. Морозова О.В., Сашина Т.А., Епифанова Н.В., Новикова Н.А. Различия в аминокислотном составе антигенных эпитопов белка VP7 российских ротавирусов с генотипом G9 и вакцинных штаммов RotaTeq, Rotavac и Rotarix. *Инфекция и иммунитет*. 2019; 9(1): 57–66. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-1-57-66>
13. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Genotype constellations of the rotavirus A strains circulating in Nizhny Novgorod, Russia, 2017–2018. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 85:104578. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104578>
14. Veselova O.A., Podkolzin A.T., Petukhov D.N., Kuleshov K.V., Shipulin G.A. Rotavirus group A surveillance and genotype distribution in Russian Federation in seasons 2012–2013. *Int. J. Clin. Med.* 2014; 5(7): 407–13. <https://doi.org/10.4236/ijcm.2014.57055>
15. Жираковская Е.В., Аксанова Р.Х., Горбунова М.Г., Тикун А.Ю., Курильщикова А.М., Соколов С.Н. и др. Генетическое разнообразие изолятов ротавирусов группы А, выявленных в Западной Сибири в 2007–2011 гг. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2012; 27(4): 33–41.
16. Епифанова Н.В., Морозова О.В., Сашина Т.А., Новикова Н.В. Характеристика ротавируса генотипа G9, выявленного в Нижнем Новгороде в 2011–12 годах. *Медицинский алфавит*. 2013; 4(24): 20–6.
17. Сашина Т.А., Морозова О.В., Епифанова Н.В., Кашников А.Ю., Леонов А.В., Новикова Н.А. Молекулярный мониторинг ротавирусов (Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A), циркулирующих в Нижнем Новгороде (2012–2020 гг.): обнаружение штаммов с новыми генетическими характеристиками. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(2): 140–51. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-46>
18. Both G.W., Bellamy A.R., Mitchell D.B. Rotavirus protein structure and function. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1994; 185: 67–105. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-78256-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-78256-5_4)
19. Taraporewala Z.F., Patton J.T. Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus nonstructural protein NSP2. *J. Virol.* 2001; 75(10): 4519–27. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.10.4519-4527.2001>
20. Vende P., Piron M., Castagne N., Poncet D. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J. Virol.* 2000; 74(15): 7064–71. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.15.7064-7071.2000>
21. Mirazimi A., Nilsson M., Svensson L. The molecular chaperone calnexin interacts with the NSP4 enterotoxin of rotavirus in vivo and in vitro. *J. Virol.* 1998; 72(11): 8705–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.11.8705-8709.1998>
22. Krishna Mohan K.V., Arteya C.D. Nucleotide sequence analysis of rotavirus gene 11 from two tissue culture-adapted ATCC strains, RRV and Wa. *J. Virus Genes*. 2001; 23(3): 321–9. <https://doi.org/10.1023/a:1012577407824>
23. Torres-Vega M.A., Gonzalez R.A., Duarte M., Poncet D., Lopez S., Arias C.F. The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(Pt. 3): 821–30. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-3-821>
24. Novikova N.A., Sashina T.A., Epifanova N.V., Kashnikov A.U., Morozova O.V. Long-term monitoring of G1P[8] Rotaviruses circulating without vaccine pressure in Nizhny Novgorod, Russia, 1984–2019. *Arch. Virol.* 2020; 165(4): 865–75. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04553-2>
25. Gentsch J.R., Glass R.I., Woods P., Gouvea V., Gorziglia M., Flores J., et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30(6): 1365–73. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.6.1365-1373.1992>
26. Gouvea V., Glass R.I., Woods P., Taniguchi K., Clark H.F., Forrester B., et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of ro-

- tavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(2): 276–82. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.2.276-282.1990>
27. Iturriza-Gymara M., Isherwood B., Desselberger U., Gray J. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J. Virol.* 2001; 75(8): 3696–705. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.8.3696-3705.2001>
28. Iturriza-Gymara M., Kang G., Gray J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J. Clin. Virol.* 2004; 31(4): 259–65. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.04.009>
29. Maunula L., von Bonsdorff C.H. Short sequences define genetic lineages: phylogenetic analysis of group A rotaviruses based on partial sequences of genome segments 4 and 9. *J. Gen. Virol.* 1998; 79(Pt. 2): 321–32. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-2-321>
30. 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>
31. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA 10.0.5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *J. Mol. Biol. Evol.* 2011; 28(10): 2731–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
32. Mukherjee A., Dutta D., Ghosh S., Bagchi P., Chattopadhyay S., Nagashima S., et al. Full genomic analysis of a human group A rotavirus G9P[6] strain from Eastern India provides evidence for porcine-to-human interspecies transmission. *Arch. Virol.* 2009; 154(5): 733–46. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0363-3>
33. Ndze V.N., Esona M.D., Achidi E.A., Gonsu K.H., Dóro R., Marton S., et al. Full genome characterization of human Rotavirus A strains isolated in Cameroon, 2010–2011: diverse combinations of the G and P genes and lack of reassortment of the backbone genes. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 28: 537–60. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.009>
34. Wang Y.H., Pang B.B., Ghosh S., Zhou X., Shintani T., Urushibara N., et al. Molecular epidemiology and genetic evolution of the whole genome of G3P[8] human rotavirus in Wuhan, China, from 2000 through 2013. *PLoS One.* 2014; 9(3): e88850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088850>
35. Agbemabiese C.A., Nakagomi T., Doan Y.H., Nakagomi O. Whole genomic constellation of the first human G8 rotavirus strain detected in Japan. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 35: 184–93. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.033>
36. Zhou X., Wang Y.H., Pang B., Chen N., Kobayashi N. Surveillance of human rotavirus in Wuhan, China (2011 – 2019): predominance of G9P[8] and emergence of G12. *J. Arch. Virol.* 2020; 9(10): 810–27. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100810>
37. Ianiro G., Heylen E., Delogu R., Zeller M., Matthijnsens J., Ruggeri F.M., et al. Genetic diversity of G9P[8] rotavirus strains circulating in Italy in 2007 and 2010 as determined by whole genome sequencing. *Infect. Genet. Evol.* 2013; 16: 426–32. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.031>
38. Петруша О.А., Корчевая Е.Р., Минтаев Р.Р., Исаков И.Ю., Никонова А.А., Мескина Е.Р. и др. Молекулярно-генетические особенности ротавирусов группы А, выявленных в Москве в 2015–2020 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2022; 99(1): 7–19. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-208>
39. Phan T.G., Okitsu S., Maneekarn N., Ushijima H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses. *Infect. Genet. Evol.* 2007; 7(5): 656–63. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.05.001>
40. Hua J., Patton J.T. The carboxyl-half of the rotavirus nonstructural protein NS53 (NSP1) is not required for virus replication. *J. Virol.* 1994; 198(2): 567–76. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1068>
41. Deo R.C., Bonanno J.B., Sonenberg N., Burley S.K. Recognition of polyadenylate RNA by the polyA binding protein cell. *J. Virology.* 2002; 98(6): 835–45. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81517-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81517-2)
42. Imataka H., Gradi A., Sonenberg N. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds polyA-binding protein and functions in polyA-dependent translation. *J. Virol.* 1998; 17(24): 7480–9. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7480>
43. Mattion N. M., Cohen J., Estes M. K. The rotavirus proteins. In: Kapikian A. Z., ed. *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract.* New York: Marcel Dekker Inc.; 1994: 169–249.
44. Vende P., Taraporewala Z.F., Patton J.T. RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA. *J. Virol.* 2002; 76(10): 5291–9. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.10.5291-5299.2002>
45. Taraporewala Z.F., Patton J.T. Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *J. Virol.* 2004; 101(1): 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.12.006>
46. Bowman G.D., Nodelman I.M., Levy O., Lin S.L., Tian P., Zamb T.J., et al. Crystal structure of the oligomerization domain of NSP4 from rotavirus reveals a core metal-binding site. *J. Mol. Biol.* 2000; 304(5): 861–71. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4250>

## REFERENCES

1. Priority areas of scientific research undertaken in order to create vaccines against diarrheal diseases. *WHO Bulletin.* 2019; (6): 21–40. (in Russian)
2. Briko N.I., Bitieva E.A., Gorelov A.V., Gorelova E.A., Kudryavtsev V.V., Mindlina A.Ya. *Epidemiology, Clinic, Treatment and Immunoprophylaxis of Rotavirus Infection [Epidemiologiya, klinika, lechenie i immunoprofilaktika rotavirusnoy infektsii].* Moscow: GEOTAR-Media; 2015. (in Russian)
3. Estes M.K., Kapikian A.Z. Rotaviruses. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., eds. *Fields Virology.* Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 1917–73.
4. Rixon F., Taylor P., Desselberger U. Rotavirus RVA segments sized by electron microscopy. *J. Gen. Virol.* 1984; 56(1): 233–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-65-1-233>
5. Matthijnsens J., Ciarlet M., Rahman M., Attoui H., Bányai K., Estes M.K., et al. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *J. Arch. Virol.* 2008; 153(8): 1621–9. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0155-1>
6. Estes M.K., Cohen J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.* 1989; 53(4): 410–49. <https://doi.org/10.1128/mr.53.4.410-449.1989>
7. RCWG. Rotavirus classification working group; 2018. Available at: <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>
8. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Predominance of new G9P[8] rotaviruses closely related to Turkish strains in Nizhny Novgorod (Russia). *Arch. Virol.* 2017; 162(8): 2387–92. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3364-7>
9. Matthijnsens J., Heylen E., Zeller M., Rahman M., Lemey P., Van Ranst M. Phylogenetic analyses of rotavirus genotypes G9 and G12 underscore their potential for swift global spread. *J. Mol. Biol. Evol.* 2010; 27(10): 2431–6. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq137>
10. Santos N., Hoshino Y. Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *J. Rev. Med. Virol.* 2005; 15(1): 29–56. <https://doi.org/10.1002/rmv.448>
11. Kiseleva V., Faizuloev E., Meskina E., Marova A., Oksanich A., Samartseva T., et al. Molecular-genetic characterization of human rotavirus strains circulating in Moscow, Russia (2009–2014). *Virol. Sin.* 2018; 33(4): 304–13. <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0043-0>
12. Morozova O.V., Sashina T.A., Epifanova N.V., Novikova N.A. Differences in the amino acid composition of the antigen epitopes of the VP7 protein of Russian rotaviruses with the G9 genotype and the vaccine strains Rotateq, Rotavac, and Rotarix. *Infektsiya i immunitet.* 2019; 9(1): 57–66. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2019-1-57-66> (in Russian)
13. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A. Genotype constellations of the rotavirus A strains circulating in Nizhny Novgorod, Russia, 2017–2018. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 85: 104578. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104578>
14. Veselova O.A., Podkolzin A.T., Petukhov D.N., Kuleshov K.V., Shipulin G.A. Rotavirus group A surveillance and genotype distribution in Russian Federation in seasons 2012–2013. *Int. J. Clin. Med.* 2014; 5(7): 407–13. <https://doi.org/10.4236/ijcm.2014.57055>
15. Zhirakovskaya E.V., Aksanova R.Kh., Gorbunova M.G., Tikonov A.Yu., Kuril'shchikov A.M., Sokolov S.N., et al. Genetic diversity of group A rotavirus isolates found in western Siberia in 2007–2011. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2012; 27(4): 174–83. (in Russian)

16. Epifanova N.V., Morozova O.V., Sashina T.A., Novikova N.V. Characteristics of rotavirus with G9-genotype identified in Nizhny Novgorod during years 2011–12. *Meditsinskiy alfavit*. 2013; 4(24): 20–6. (in Russian)
17. Sashina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Kashnikov A.Yu., Leonov A.V., Novikova N.A. Molecular monitoring of the rotavirus (Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A) strains circulating in Nizhny Novgorod (2012–2020): detection of the strains with the new genetic features. *Voprosy virusologii*. 2021; 66(2): 140–51. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-46> (in Russian)
18. Both G.W., Bellamy A.R., Mitchell D.B. Rotavirus protein structure and function. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1994; 185: 67–105. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-78256-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-78256-5_4)
19. Taraporewala Z.F., Patton J.T. Identification and characterization of the helix-destabilizing activity of rotavirus nonstructural protein NSP2. *J. Virol.* 2001; 75(10): 4519–27. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.10.4519-4527.2001>
20. Vende P., Piron M., Castagne N., Poncet D. Efficient translation of rotavirus mRNA requires simultaneous interaction of NSP3 with the eukaryotic translation initiation factor eIF4G and the mRNA 3' end. *J. Virol.* 2000; 74(15): 7064–71. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.15.7064-7071.2000>
21. Mirazimi A., Nilsson M., Svensson L. The molecular chaperone calnexin interacts with the NSP4 enterotoxin of rotavirus in vivo and in vitro. *J. Virol.* 1998; 72(11): 8705–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.11.8705-8709.1998>
22. Krishna Mohan K.V., Arteya C.D. Nucleotide sequence analysis of rotavirus gene 11 from two tissue culture-adapted ATCC strains, RRV and Wa. *J. Virus Genes*. 2001; 23(3): 321–9. <https://doi.org/10.1023/a:1012577407824>
23. Torres-Vega M.A., Gonzalez R.A., Duarte M., Poncet D., López S., Arias C.F. The C-terminal domain of rotavirus NSP5 is essential for its multimerization, hyperphosphorylation and interaction with NSP6. *J. Gen. Virol.* 2000; 81(Pt. 3): 821–30. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-3-821>
24. Novikova N.A., Sashina T.A., Epifanova N.V., Kashnikov A.U., Morozova O.V. Long-term monitoring of G1P[8] Rotaviruses circulating without vaccine pressure in Nizhny Novgorod, Russia, 1984–2019. *Arch. Virol.* 2020; 165(4): 865–75. <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04553-2>
25. Gentsch J.R., Glass R.I., Woods P., Gouvea V., Gorziglia M., Flores J., et al. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 1992; 30(6): 1365–73. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.6.1365-1373.1992>
26. Gouvea V., Glass R.I., Woods P., Taniguchi K., Clark H.F., Forrester B., et al. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(2): 276–82. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.2.276-282.1990>
27. Iturriza-Gymara M., Isherwood B., Desselberger U., Gray J. Reassortment in vivo: driving force for diversity of human rotavirus strains isolated in the United Kingdom between 1995 and 1999. *J. Virol.* 2001; 75(8): 3696–705. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.8.3696-3705.2001>
28. Iturriza-Gymara M., Kang G., Gray J. Rotavirus genotyping: keeping up with an evolving population of human rotaviruses. *J. Clin. Virol.* 2004; 31(4): 259–65. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.04.009>
29. Maunula L., von Bonsdorff C.H. Short sequences define genetic lineages: phylogenetic analysis of group A rotaviruses based on partial sequences of genome segments 4 and 9. *J. Gen. Virol.* 1998; 79(Pt. 2): 321–32. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-2-321>
30. 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>
31. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA 10.0.5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *J. Mol. Biol. Evol.* 2011; 28(10): 2731–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
32. Mukherjee A., Dutta D., Ghosh S., Bagchi P., Chattopadhyay S., Nagashima S., et al. Full genomic analysis of a human group A rotavirus G9P[6] strain from Eastern India provides evidence for porcine-to-human interspecies transmission. *Arch. Virol.* 2009; 154(5): 733–46. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0363-3>
33. Ndze V.N., Esona M.D., Achidi E.A., Gonsu K.H., Dóro R., Marton S., et al. Full genome characterization of human Rotavirus A strains isolated in Cameroon, 2010–2011: diverse combinations of the G and P genes and lack of reassortment of the backbone genes. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 28: 537–60. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.009>
34. Wang Y.H., Pang B.B., Ghosh S., Zhou X., Shintani T., Urushibara N., et al. Molecular epidemiology and genetic evolution of the whole genome of G3P[8] human rotavirus in Wuhan, China, from 2000 through 2013. *PLoS One*. 2014; 9(3): e88850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088850>
35. Agbemabiese C.A., Nakagomi T., Doan Y.H., Nakagomi O. Whole genomic constellation of the first human G8 rotavirus strain detected in Japan. *Infect. Genet. Evol.* 2015; 35: 184–93. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2015.07.033>
36. Zhou X., Wang Y.H., Pang B., Chen N., Kobayashi N. Surveillance of human rotavirus in Wuhan, China (2011–2019): predominance of G9P[8] and emergence of G12. *J. Arch. Virol.* 2020; 9(10): 810–27. <https://doi.org/10.3390/pathogens9100810>
37. Ianiro G., Heylen E., Delogu R., Zeller M., Matthijssens J., Ruggeri F.M., et al. Genetic diversity of G9P[8] rotavirus strains circulating in Italy in 2007 and 2010 as determined by whole genome sequencing. *Infect. Genet. Evol.* 2013; 16: 426–32. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.03.031>
38. Petrusha O.A., Korchevaya E.R., Mintaev R.R., Isakov I.Yu., Nikonova A.A., Meskina E.R., et al. Molecular and genetic characteristics of group A rotaviruses detected in Moscow in 2015–2020. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii*. 2022; 99(1): 7–19. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-208> (in Russian)
39. Phan T.G., Okitsu S., Maneekarn N., Ushijima H. Genetic heterogeneity, evolution and recombination in emerging G9 rotaviruses. *Infect. Genet. Evol.* 2007; 7(5): 656–63. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2007.05.001>
40. Hua J., Patton J.T. The carboxyl-half of the rotavirus nonstructural protein NS53 (NSP1) is not required for virus replication. *J. Virol.* 1994; 198(2): 567–76. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1068>
41. Deo R.C., Bonanno J.B., Sonenberg N., Burley S.K. Recognition of polyadenylate RNA by the polyA binding protein cell. *J. Virology*. 2002; 98(6): 835–45. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81517-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81517-2)
42. Imataka H., Gradi A., Sonenberg N. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds polyA-binding protein and functions in polyA-dependent translation. *J. Virol.* 1998; 17(24): 7480–9. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7480>
43. Mattion N. M., Cohen J., Estes M. K. The rotavirus proteins. In: Kapikian A. Z., ed. *Viral Infections of the Gastrointestinal Tract*. New York: Marcel Dekker Inc.; 1994: 169–249.
44. Vende P., Taraporewala Z.F., Patton J.T. RNA-binding activity of the rotavirus phosphoprotein NSP5 includes affinity for double-stranded RNA. *J. Virol.* 2002; 76(10): 5291–9. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.10.5291-5299.2002>
45. Taraporewala Z.F., Patton J.T. Nonstructural proteins involved in genome packaging and replication of rotaviruses and other members of the Reoviridae. *J. Virol.* 2004; 101(1): 57–66. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2003.12.006>
46. Bowman G.D., Nodelman I.M., Levy O., Lin S.L., Tian P., Zamb T.J., et al. Crystal structure of the oligomerization domain of NSP4 from rotavirus reveals a core metal-binding site. *J. Mol. Biol.* 2000; 304(5): 861–71. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4250>

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

https://doi.org/10.36233/0507-4088-145

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



## Молекулярно-генетическая характеристика многокомпонентного флавиподобного вируса Kindia tick virus (Flaviviridae), обнаруженного в иксодовых клещах на территории Гвинейской Республики

Карташов М.Ю.<sup>1</sup>, Гладышева А.В.<sup>1</sup>, Найденова Е.В.<sup>2</sup>, Захаров К.С.<sup>2</sup>, Швалов А.Н.<sup>1</sup>, Кривошеина Е.И.<sup>1</sup>, Сеничкина А.М.<sup>2</sup>, Ба М.Б.<sup>3</sup>, Терновой В.А.<sup>1</sup>, Бумбали С.<sup>3</sup>, Локтев В.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 630559, Новосибирская область, п.г.т. Кольцово, Россия;

<sup>2</sup>ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 410005, г. Саратов, Россия;

<sup>3</sup>Исследовательский институт прикладной биологии Гвинеи, г. Киндиа, Гвинейская Республика

**Введение.** Иксодовые клещи – переносчики возбудителей многих инфекционных болезней. Недавно при исследовании клещей *Rhipicephalus geigy*, собранных с домашнего скота в Гвинейской Республике, обнаружен новый многокомпонентный флавиподобный РНК-содержащий вирус, получивший название Kindia tick virus (KITV), с необычным механизмом реализации генетической информации.

**Цель работы** – обнаружение и исследование генетического разнообразия KITV в иксодовых клещах, собранных на территории провинции Киндиа Гвинейской Республики.

**Материалы и методы.** В 2021 г. с крупного рогатого скота собрано 324 экземпляра клещей видов *Amblyomma variegatum*, *Rh. geigy*, *Rh. annulatus*, *Rh. decoloratus*, *Rh. senegalensis*. Детекция вирусной РНК проводилась в индивидуальных образцах клещей методом ОТ-ПЦР с последующим определением нуклеотидной последовательности и проведением филогенетического анализа.

**Результаты и обсуждение.** Инфицированность KITV клещей вида *Rh. geigy* составила 12,2%, *Rh. annulatus* – 4,4%, *Rh. decoloratus* – 3,3%. Однако генетический материал KITV в клещах *Am. variegatum*, являющихся одним из доминирующих видов в Западной Африке, выявлен не был. Для всех изолятов вируса определена частичная нуклеотидная последовательность каждого из четырёх вирусных сегментов (GenBank, OK345271–OK345306), филогенетический анализ которых показал высокий уровень их тождественности (98,5–99,8%) по каждому из четырёх сегментов вирусного генома с ранее обнаруженными в Гвинейской Республике. Полученные изоляты KITV наиболее генетически близки к Mogiana tick virus, который ранее был обнаружен в Южной Америке в клещах *Rh. microplus*, и существенно отличаются от других многокомпонентных вирусов, циркулирующих в странах Европы и Азии, в том числе и в Российской Федерации.

**Заключение.** Генетический материал KITV обнаружен в трёх видах иксодовых клещей, собранных с домашнего скота ряда префектур Гвинейской Республики. Уровень инфицированности клещей составил 3,3–12,2%. Актуальным остаётся продолжение исследований в данном направлении.

**Ключевые слова:** многокомпонентные флавиподобные вирусы; Kindia tick virus; KITV; иксодовые клещи; Гвинейская Республика

**Для цитирования:** Карташов М.Ю., Гладышева А.В., Найденова Е.В., Захаров К.С., Швалов А.Н., Кривошеина Е.И., Сеничкина А.М., Ба М.Б., Терновой В.А., Бумбали С., Локтев В.Б. Молекулярно-генетическая характеристика многокомпонентного флавиподобного вируса Kindia tick virus (Flaviviridae), обнаруженного в иксодовых клещах на территории Гвинейской Республики. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(6): 487-495. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-145>

**Для корреспонденции:** Карташов Михаил Юрьевич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии и вирусных гепатитов, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Роспотребнадзора, 630559, п.г.т. Кольцово, Россия. E-mail: [mikkartash@yandex.ru](mailto:mikkartash@yandex.ru)

**Участие авторов:** Карташов М.Ю. – концепция и дизайн исследования, проведение лабораторных исследований, статистическая обработка данных, написание текста статьи; Гладышева А.В. – сбор и обработка материала, написание текста статьи; Найденова Е.В. – сбор и обработка материала, написание и редактирование текста статьи; Захаров К.С. – проведение лабораторных исследований, подготовка иллюстраций; Швалов А.Н. – сбор и обработка материала, статистическая обработка данных; Кривошеина Е.И. – проведение лабораторных исследований; Сеничкина А.М. – проведение лабораторных исследований; Ба М.Б. – сбор и доставка проб биологического материала; Терновой В.А. – руководство исследованиями; Бумбали С. – руководство сбором и доставкой материала; Локтев В.Б. – общее руководство.

**Финансирование.** Исследования проводились в рамках Распоряжения Правительства Российской Федерации от 14.11.2020 № 2985-р о российско-гвинейском научно-техническом сотрудничестве в области эпидемиологии, профилактики и мониторинга бактериальных и вирусных инфекций в Гвинейской Республике.

**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).

Поступила 29.09.2022

Принята в печать 21.11.2022

Опубликована 30.12.2022

## ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-145>

## Molecular and genetic characteristics of the multicomponent flavi-like Kindia tick virus (Flaviviridae) found in ixodes ticks on the territory of the Republic of Guinea

Mikhail Yu. Kartashov<sup>1</sup>, Anastasia V. Gladysheva<sup>1</sup>, Ekaterina V. Naidenova<sup>2</sup>, Kirill S. Zakharov<sup>2</sup>, Alexander N. Shvalov<sup>1</sup>, Ekaterina I. Krivosheina<sup>1</sup>, Aislu M. Senichkina<sup>2</sup>, Mamadou B. Bah<sup>3</sup>, Vladimir A. Ternovoi<sup>1</sup>, Sanaba Boumbaly<sup>3</sup>, Valery B. Loktev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», 630559, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia;

<sup>2</sup>Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 410005, Saratov, Russia;

<sup>3</sup>Research Institute of Applied Biology of Guinea, Kindia, Republic of Guinea

**Introduction.** Ixodes ticks are vectors for pathogens of many infectious diseases. Recently, during the study of *Rhipicephalus geigy* ticks collected from livestock in the Republic of Guinea, a new multicomponent flavi-like RNA virus, called Kindia tick virus (KITV), was discovered with an unusual mechanism for the implementation of genetic information.

The aim of the work is to detect and study the genetic diversity of KITV in ixodes ticks collected in the territory of the Kindia province of the Republic of Guinea.

**Material and methods.** In 2021, 324 specimens of ticks of the species *Amblyomma variegatum*, *Rh. geigy*, *Rh. annulatus*, *Rh. decoloratus*, *Rh. senegalensis* were collected from cattle. The detection of viral RNA was carried out in individual samples of ticks by RT-PCR, followed by the determination of the nucleotide sequence and phylogenetic analysis.

**Results and discussion.** KITV detection rates in ticks of the species *Rh. geigy* was 12.2%, *Rh. annulatus* – 4.4%, *Rh. decoloratus* – 3.3%. However, the KITV genetic material has not been identified in *Am. variegatum* ticks, which are one of the dominant species in West Africa. For all virus isolates, a partial nucleotide sequences of each of the four viral segments (GenBank, OK345271–OK345306) were determined. The phylogenetic analysis showed a high level of identity (98.5–99.8%) for each of the four segments of the viral genome with those previously found in the Republic of Guinea. The obtained KITV isolates are most genetically close to Mogiana tick virus, which was previously detected in South America in *Rh. microplus* ticks and significantly differed from other multicomponent viruses circulating in Europe and Asia, including the Russian Federation.

**Conclusion.** KITV genetic material was found in three species of ixodid ticks collected from livestock in a number of prefectures of the Republic of Guinea. The infection rate in ticks was 3.3–12.2%. The continuation of research in this direction remains relevant.

**Keywords:** multicomponent flavi-like viruses; Kindia tick virus; KITV; ixodid ticks; Republic of Guinea

**For citation:** Kartashov M.Yu., Gladysheva A.V., Naidenova E.V., Zakharov K.S., Krivosheina E.I., Shvalov A.N., Senichkina A.M., Bah M.B., Ternovoi V.A., Boumbaly S., Loktev V.B. Molecular and genetic characteristics of the multicomponent flavi-like Kindia tick virus (Flaviviridae) found in ixodid ticks on the territory of the Republic of Guinea. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(6): 487–495. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-145>

**For correspondence:** Mikhail Yu. Kartashov, Ph.D. (Biol.), Senior Researcher, FSBI State Research 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](mailto:mikkartash@yandex.ru)

**Information about the authors:**

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

Gladysheva A.V., <https://orcid.org/0000-0002-7396-3954>

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

Zakharov K.S., <https://orcid.org/0000-0002-4726-309X>

Shvalov A.N., <https://orcid.org/0000-0001-6890-1575>

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

Senichkina A.M., <https://orcid.org/0000-0003-1026-2680>

Bah M.B., <https://orcid.org/0000-0002-4565-269X>

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

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

Loktev V.B., <https://orcid.org/0000-0002-0229-321X>

**Contribution:** Kartashov M.Yu. – organization and planning of research, performing the experiments, data analysis and interpretation, text preparation; Gladysheva A.V. – performing the experiments, text preparation; Naidenova E.V. – material collection and processing, text preparation; Zakharov K.S. – performing the experiments; illustrations preparation; Shvalov A.N. – presentation of results and illustrations, statistical processing of data; Krivosheina E.I. – performing the experiments; Senichkina A.M. – performing the experiments; Bah M.B. – collection and delivery of samples of biological material; Ternovoi V.A. – research management; Boumbaly S. – organization and control of research; Loktev V.B. – general guidance.

**Funding.** The studies were conducted within the framework of the Orders of the Government of the Russian Federation of November 14, 2020 No. 2985-p on Russian-Guinean scientific and technical cooperation in the field of epidemiology, prevention and monitoring of bacterial and viral infections in the Republic of Guinea.

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

**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).

Received 29 September 2022

Accepted 21 November 2022

Published 30 December 2022

## Введение

События последних десятилетий позволяют по-другому оценить проблему новых и вновь возникающих инфекционных болезней вирусной этиологии. Яркими примерами чрезвычайных ситуаций, характеризующими всю опасность таких инфекций, могут служить эпидемии птичьего гриппа типа  $H_5N_1$  и лихорадки Зика, а также продолжающаяся пандемия новой коронавирусной инфекции COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2. Возникновение этих инфекционных заболеваний является результатом вторичной или межвидовой передачи вирусных агентов от их естественных хозяев к человеку [1].

В то же время рядом авторов показано, что различные вирусы, представляющие разные семейства, выстраивают взаимоотношения в схеме «вирус – хозяин» по определённым правилам. Так, представители семейства *Flaviviridae* демонстрируют разнообразные примеры таких взаимодействий [2–4]. Например, вирусы денге, Зика или желтой лихорадки передаются комарами, вирус клещевого энцефалита – клещами, а вирус гепатита С вообще не имеет членистоногих переносчиков.

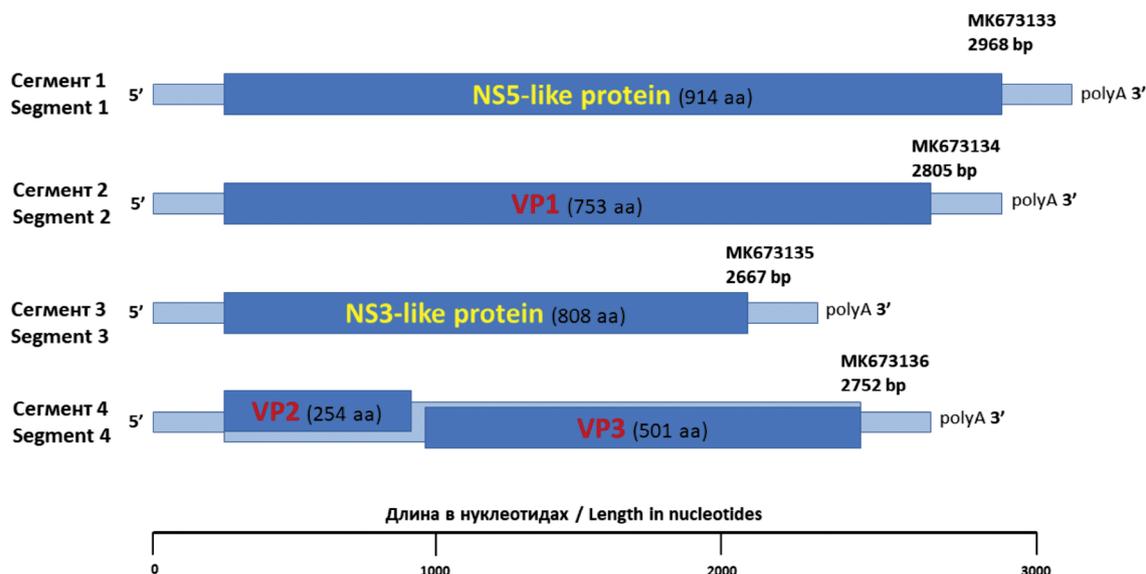
В связи с этим определённый интерес представляет обнаружение новых флавиподобных вирусов, таких как Jingmen tick virus (JMTV), который впервые был изолирован из клещей вида *Rhipicephalus microplus*, собранных в китайской провинции Хубэй, и назван в соответствии с географическим местом открытия – регионом Jingmen [5]. Фактически одновременно похожий многокомпонентный флавивирус Guaico *Culex* virus (GCXV) был обнаружен в комарах рода *Culex* в Перу, Панаме и на острове Тринидад в Карибском море [5, 6].

В дополнение к эктопаразитам генетический материал вируса JMTV (RC27) также удалось определить в плазме крови приматов – красных колобусов (род *Ptilocolobus* (Rochebrune, 1877)), обитающих

в Уганде, а также в сыворотках крови крупного рогатого скота (КРС) и грызунов [5–8]. Предполагается, что JMTV вызвал вспышки лихорадочных заболеваний в Китае и Косово [7, 9, 10]. Это позволило говорить о способности данного вируса преодолевать межвидовые барьеры и эффективно реплицироваться как в эктопаразитах, так и в теплокровных животных.

Впоследствии в различных видах членистоногих и позвоночных были обнаружены другие многокомпонентные флавиподобные вирусы, имеющие устройство генома и механизм реализации генетической информации, схожий с JMTV. Так, Mogiana tick virus (MGTV) был выделен из слонных жёлёз клеща *Rh. microplus* в Бразилии [11]. Чуть позднее на северо-востоке Китая была выявлена циркуляция ранее неизвестного вируса Alongshan (ALSV). Вскоре данный патоген был выделен из клещей *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) на юго-востоке Финляндии и в ряде регионов Российской Федерации [12, 13]. Многокомпонентные флавиподобные вирусы также были обнаружены на территории Турции в клещах *Rh. sanguineus sensu lato* (Latreille, 1806), *Rh. turanicus* (Pomerantsev, 1936), *Rh. bursa* (Canestrini & Fanzago, 1878), *Hyalomma marginatum* (Koch, 1844), *Haemaphysalis inermis* (Birula, 1895), *Ha. parva* (Neumann, 1897) [14]. Схожий многокомпонентный вирус был детектирован в крови больных Крымской-Конго геморрагической лихорадкой (ККГЛ) в Косово и на юге России [15].

Для организации генома всех флавиподобных вирусов характерно наличие сегментов и генов, кодирующих два ключевых неструктурных вирусных белка, схожих с белками представителей семейства *Flaviviridae* (NS3 и NS5). Многокомпонентные флавиподобные вирусы имеют в своей структуре от 4 (характерно для большинства вирусов, изолированных из клещей, летучих мышей, обезьян и человека) до 5 (встречается у вирусов, выделенных из комаров)



**Рис. 1.** Схема строения генома многокомпонентных флавиподобных вирусов на примере KITV.

**Fig. 1.** Scheme of the structure of the genome of multicomponent flavi-like viruses on the example of KITV.

сегментов, которые ограничены с 5'- и 3'-концов не-транслируемыми регионами, а также полиаденилированы (**рис. 1**). Сегмент 1 кодирует неструктурный NS5-like белок, имеющий гомологию с белком NS5 (РНК-зависимая РНК-полимераза) классических представителей семейства Flaviviridae. Сегмент 3 кодирует неструктурный белок, имеющий высокую степень гомологии с флавивирусным белком NS3. Белок NS3 наряду с NS5 играет центральную роль в репликации вируса и является одним из наиболее изученных неструктурных белков. N-концевой домен NS3 обладает протеазной активностью, которая необходима для процессинга полипротеина, а С-концевой домен выполняет функцию геликазы и участвует в эпировании и синтезе вирусной РНК. На сегодняшний день хорошо изучена структура белка NS3 у большинства несегментированных флавивирусов, и их анализ показывает высокую гомологию не только в строении, но также в механизмах гидролиза аденозинтрифосфата, распознавания и раскручивания РНК [16]. Структурные белки VP1, VP2, VP3 закодированы во втором и четвертом фрагменте и не имеют известных гомологов среди как флавивирусов, так и других известных на сегодняшний день вирусов. Сегмент 2 кодирует предполагаемый гликопротеин VP1. Белки VP2 (предполагаемый капсидный белок) и VP3 (предполагаемый вирусный мембранный белок) закодированы в сегменте 4 и имеют частично перекрывающиеся рамки трансляции [14]. Также рядом авторов проведены немногочисленные серологические исследования на основе структурных белков VP1 и VP2 с целью изучения циркуляции специфических антител в сыворотках овец и КРС, являющихся прокормителями членистоногих переносчиков [17], или у пациентов с укусом клеща в анамнезе [12].

В настоящее время доказана патогенность многокомпонентных флавиподобных вирусов для сельскохозяй-

ственных животных и человека. Однако эти сведения носят фрагментарный и ограниченный характер. Не исключена вероятность того, что их роль в инфекционной патологии может быть более значимой, чем принято считать. Установление факта того, что многокомпонентные флавиподобные вирусы достаточно широко распространены и обнаружены на территории Азии, Европы, Африки и Америки, также диктует необходимость в продолжении изучения этой группы патогенов.

Имеется предположение, что флавивирусы, переносимые клещами, произошли на Африканском континенте из Кадам-подобного вируса (KADV) около 28,5 тыс. лет назад. В дальнейшем они распространились по территории Европы, Азии и Америки. Вполне вероятно, что африканские многокомпонентные флавивирусы, такие как Kindia tick virus (KITV), – наиболее вероятные кандидаты в предшественники современных представителей данной группы патогенов [18].

Ранее на территории Гвинейской Республики при проведении метагеномных исследований из суспензий клещей вида *Rh. geigy*, собранных с КРС на территории провинции Киндиа, впервые был изолирован многокомпонентный флавиподобный вирус, получивший предварительное название Kindia tick virus [15, 19]. Было показано, что наибольшую степень гомологии KITV имел с MGTV, выделенным из клещей *Rh. microplus* в Южной Америке.

Уровень различия нуклеотидных/аминокислотных последовательностей KITV с другими представителями сегментированных флавиподобных вирусов составил 7–28/3,1–21,8% (для сегмента 1); 7,7–20,6/3,4–20,3% (для сегмента 2); 2,3–29,3/1,3–20,8% (для сегмента 3) и 0,4–22/0,2–15% (для сегмента 4).

**Целью** данной работы был дальнейший поиск и молекулярно-генетическая характеристика многокомпонентных флавиподобных вирусов в искодовых клещах, собранных на территории Гвинейской Республики.

## Материалы и методы

Исследования были проведены на базе лаборатории Российско-гвинейского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней, который расположен на территории Исследовательского института прикладной биологии в г. Киндиа, Гвинейская Республика [20].

Сбор клещей проводился в период с апреля по май 2021 г. при осмотре взрослых особей сельскохозяйственных животных, находящихся на свободном выпасе на территории префектур Койя, Дюбрека, Форекария, Киндиа, Телимеле провинции Киндиа (рис. 2). Предварительно полученный и обработанный материал был протестирован методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с использованием наборов реагентов российского производства для выявления маркеров возбудителей: РНК вируса ККГЛ «АмплиСенс ССНФV-FL»; РНК вируса клещевого энцефалита, ДНК *Borrelia burgdorferi* sl, *Ehrlichia chaffeensis*/*E. muris* и ДНК *Anaplasma phagocytophilum* «АмплиСенс TBEV, *B. burgdorferi* sl, *A. phagocytophilum*, *E. chaffeensis*/*E. muris*-FL»; ДНК *Coxiella burnetii* «АмплиСенс *Coxiella burnetii*-FL», ДНК риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки *Rickettsia* spp. «Набор реагентов АмплиСенс *Rickettsia* spp. SFG-FL»

(ФБУН «ЦНИИЭ», Россия), а также ДНК *Francisella tularensis* «Ген *Francisella tularensis*-РГФ» (ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб», Россия). Для последующих исследований были выбраны пробы, в которых присутствие вышеупомянутых патогенов не было обнаружено.

Всего для исследования было собрано, сформировано и проанализировано 324 индивидуальные пробы клещей, относящихся к видам *Am. variegatum*, *Rh. geigy*, *Rh. annulatus*, *Rh. decoloratus* и *Rh. senegalensis*. Эктопаразитов дважды отмывали 70% этанолом для удаления внешних загрязнений и наружной микрофлоры, после чего хранили при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  до проведения дальнейших исследований. Видовую принадлежность клещей устанавливали по морфологическим характеристикам согласно определителю [21] с использованием бинокля с увеличением  $\times 56$  с последующей таксономической верификацией нуклеотидной последовательности фрагмента гена рибосомальной РНК.

Обработку исследуемых проб проводили с помощью лабораторного гомогенизатора TissueLyser II (QIAGEN, Германия) в 500 мкл стерильного фосфатно-солевого буфера. Вирусную РНК выделяли из 100 мкл клещевой суспензии методом фенол-хлороформной экстракции с использованием реагента ExtractRNA™ Reagent («Евроген», Россия). кДНК по-

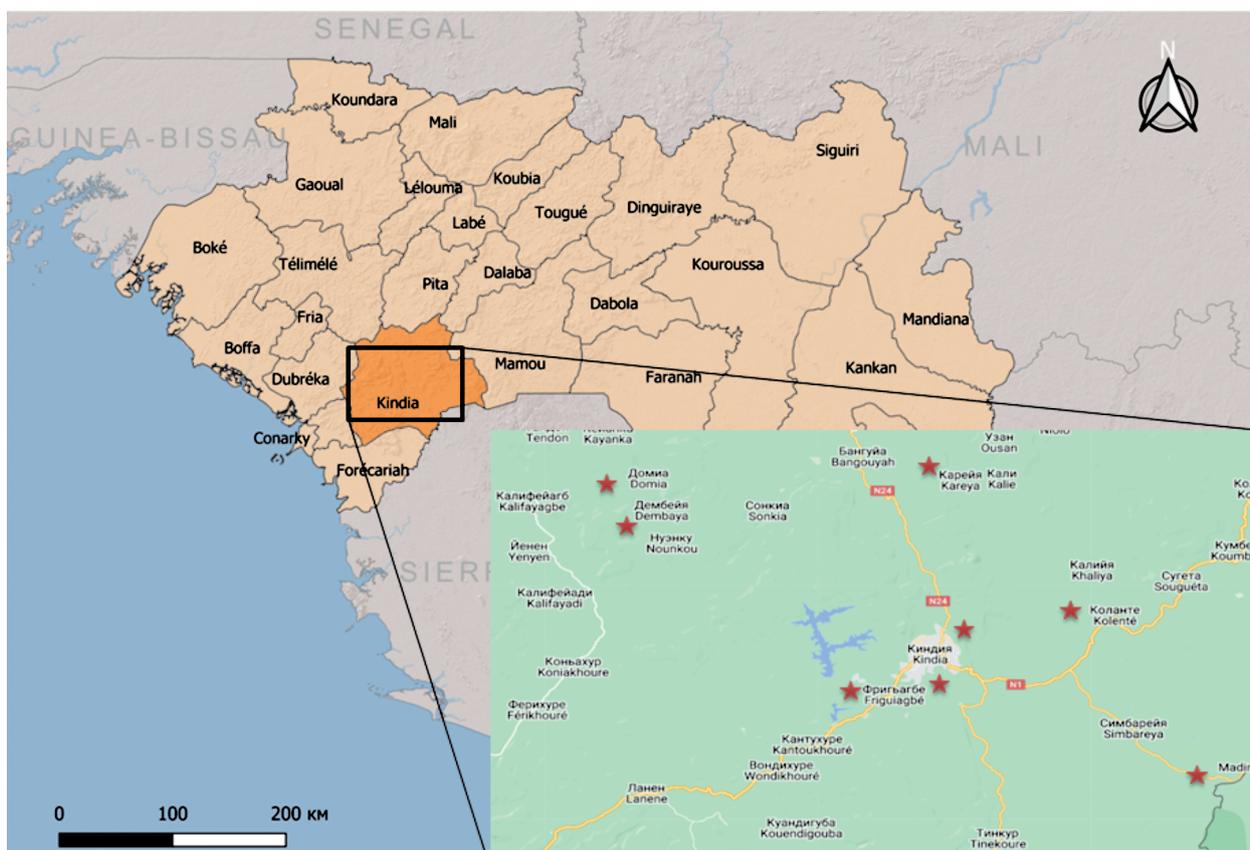


Рис. 2. Территории префектуры Киндиа (Гвинейская Республика), где были собраны пробы для исследований. Места сбора клещей обозначены звездочками.

Fig. 2. Territories of Kindia Prefecture (Republic of Guinea) where samples were collected for research. Tick collection sites are marked with asterisks.

лучали в реакции обратной транскрипции с помощью коммерческого набора «РЕВЕРТА-L» («АмплиСенс», Россия) согласно инструкциям производителей.

Скрининг исследуемых образцов на наличие генетического материала KITV осуществляли методом ПЦР с парой праймеров KITV1\_bF/KITV1\_bR, комплементарных сегменту 1 (NS5-подобный ген, сегмент 1) (табл. 1). Для положительных образцов были получены ампликоны, частично перекрывающие все 4 сегмента генома KITV. Реакцию амплификации ставили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 12,5 мкл двукратной ПЦР-смеси («БиоЛабМикс», Россия), 0,2 мкМ каждого из праймеров и 1,5 мкл кДНК. Праймеры, используемые в данной работе, и ожидаемая длина ампликонов представлены в табл. 1. ОТ-ПЦР проводили в амплификаторе T100 (Bio-Rad, США) согласно следующей программе амплификации: активация полимеразы при температуре 95 °С – 5 мин; далее 38 последовательных циклов: денатурация при 95 °С – 15 с, отжиг праймеров при 57 °С – 20 с, элонгация при 72 °С – 45 с, финальная элонгация при 72 °С – 5 мин. Продукты реакции учитывали методом электрофореза в 2% агарозном геле, содержащем бромистый этидий в концентрации 2 мкг/мл.

Нуклеотидные последовательности полученных ПЦР-фрагментов определяли с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v3.1 (ThermoFisher Scientific, США) с последующим анализом на секвенаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, США). Полученные хроматограммы изучали с помощью программы SeqMan (DNASTar, США).

Филогенетический анализ проводили с помощью пакета программ MEGA X методом максимального правдоподобия с использованием трёхпараметриче-

ской модели эволюции Тамуры T92 [22]. Показатель статистической надёжности узлов филогенетического дерева рассчитывался с помощью бутстреп-анализа для 1000 случайных реплик.

Частичные нуклеотидные последовательности сегментов изолятов KITV, выявленных в данной работе, были депонированы в международную базу данных GenBank под номерами ОК345271–ОК345279 – для сегмента 1, ОК345280–ОК345288 – для сегмента 2, ОК345289–ОК345297 – для сегмента 3, ОК345298–ОК345306 – для сегмента 4.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с CONSENSUS AUTHOR GUIDELINES FOR ANIMAL USE (IAVES 23 JULY 2010).

### Результаты и обсуждение

В настоящем исследовании РНК KITV была обнаружена в 9 пробах. В последующем для всех изолятов определены частичные нуклеотидные последовательности каждого из сегментов: 1-й – 1609 пар нуклеотидов (п.н.), 2-й – 980 п.н., 3-й – 1114 п.н. и 4-й – 1116 п.н. Также в работе показано, что различия нуклеотидных и аминокислотных последовательностей KITV, по сравнению с другими представителями сегментированных флавиподобных вирусов, составили: для сегмента 1 – от 7 до 28% и от 3,1 до 21,8%; для сегмента 2 – от 7,7 до 20,6% и от 3,4 до 20,3%; для сегмента 3 – от 2,3 до 29,3% и от 1,3 до 20,8% и для сегмента 4 – от 0,4 до 22% и от 0,2 до 15% соответственно (табл. 2).

Уровень гомологии нуклеотидных последовательностей, выделенных в 2021 г. для сегмента 1, соста-

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидных праймеров, используемых в работе

Table 1. Oligonucleotide primer used in the work

Ген-мишень Target gene	Праймер Primer	Структура праймера Primer sequence	Температура отжига, °С T annealing, °C	Длина ампликона, п.н. Amplicon length, bp
Internal transcribed spacer 2	Boophits 2F	GCCGTCGACTCGTTTTGA	57	825
	Boophits 2R	TCCGAACAGTTGCGTGATAAA		
Сегмент 1 KITV Segment 1	KITV1_aF	TGAAGAACGTC AAGCCCTGG	58	602
	KITV1_aR	GCTGACCCACGAACCTGTTT		
	KITV1_bF	AAAGAAGGGCTCTGAGGGC		
	KITV1_bR	CTTATACAGGCCCTGTCCCG		
	KITV1_cF	GAAGTGCGGATGGAGCGTAG		
	KITV1_cR	ACCTGTGGGAGCAGAAGGAT		
Сегмент 2 KITV Segment 2	KITV2_aF	AACCTTGGGAGTGACCAGGG	58	617
	KITV2_aR	GATAAGGCCGTCAGAGCGAG		
	KITV2_bF	CAGGGACGAGACATTGCCAA		
	KITV2_bR	CCGTGGAGTAGTGGACCGTA		
Сегмент 3 KITV Segment 3	KITV3_aF	AATTGGAGAGGCAGAGGGGA	58	609
	KITV3_aR	GACCTTGTTGACCAGGTCA		
	KITV3_bF	GGCAACTCATGACCTGGTCC		
	KITV3_bR	AGGACCACTGTGGCGTAGT		
Сегмент 4 KITV Segment 4	KITV4_aF	CCCTACCAGGCCTGATACGA	58	615
	KITV4_aR	TAGTAGCGGGCCAGGTTGTA		
	KITV4_bF	GCGGAGAGAGAGAAAACGCA		
	KITV4_bR	ACAGGTTACGAACACAGCC		

**Таблица 2. Выявление РНК КИТВ среди разных видов иксодовых клещей методом ОТ-ПЦР**  
**Table 2. Detection of KITV RNA among different species of ticks by RT-PCR**

Вид клеща Species of ticks	Количество экземпляров (из них положительных) Number of samples (of which positive)	Встречаемость КИТВ Prevalence of KITV
<i>Am. variegatum</i>	197 (0)	0% (95% CI 0–1,9)
<i>Rh. geigy</i>	49 (6)	12,2% (95% CI 5,7–24,2)
<i>Rh. annulatus</i>	45 (2)	4,4% (95% CI 1,2–14,8)
<i>Rh. decoloratus</i>	30 (1)	3,3% (95% CI 0,7–16,1)
<i>Rh. senegalensis</i>	3 (0)	0% (95% CI 0–46,2)
Всего Total	324 (9)	2,8% (95% CI 1,5–5,1)

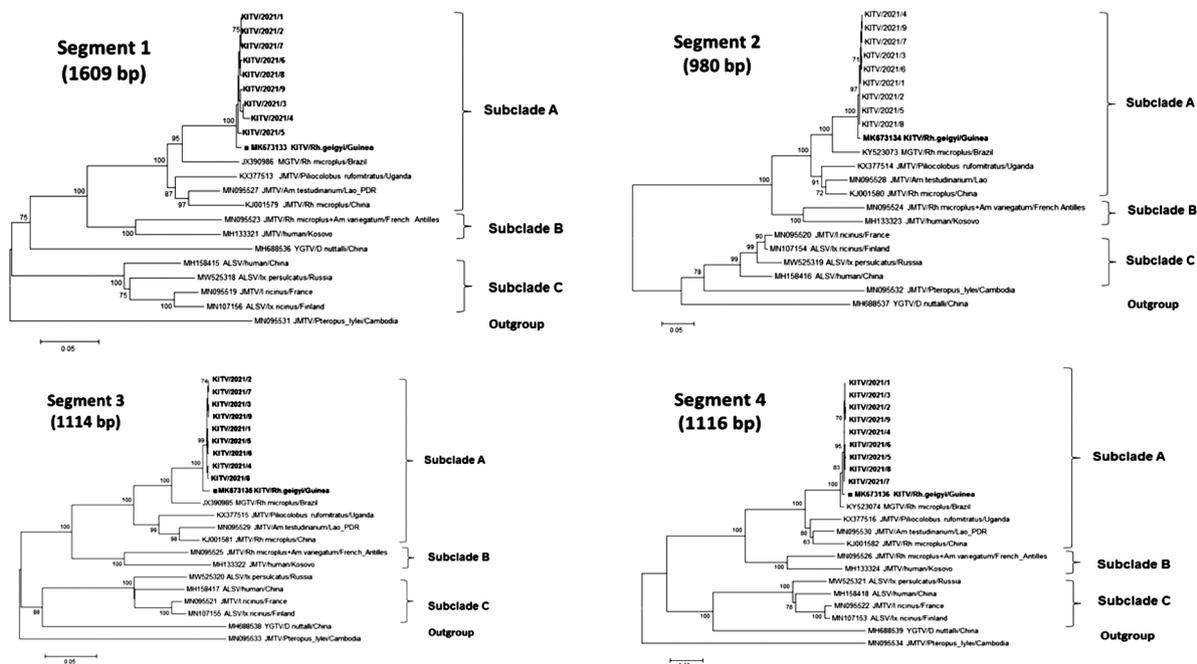
вил 98,5–100%; для сегмента 2 – 99,6–100%; для сегментов 3 и 4 – 99,5–100%. При сравнении с изолятом КИТВ/2017/1, полученным в 2017 г., этот показатель был 98,7–99,2%, по сравнению с другими многокомпонентными флавиподобными вирусами колебался от 72 до 90% для фрагмента 1; от 60 до 90% – для фрагмента 2; от 73 до 90% – для фрагмента 3 и от 61 до 90% – для фрагмента 4.

На **рис. 3** показано, что все последовательности, выделенные в 2021 г., кластеризуются в одну группу вместе с изолятом КИТВ/2017/1 [18]. Обращает на себя внимание тот факт, что филогенетические деревья выявленных изолятов КИТВ и других многокомпо-

нентных вирусов, построенные по каждому из сегментов, имеют практически одинаковую топологию. В 2021 г. КИТВ был обнаружен в трёх видах иксодовых клещей, но последовательности были весьма консервативны, и существенных отличий, связанных с таксономической разницей эктопаразитов, выявлено не было.

Рядом авторов показано, что многокомпонентные флавиподобные вирусы подразделяются как минимум на три субклады [23]. Вирус КИТВ и его выявленные в ходе исследования изоляты при проведении анализа по каждому из четырёх сегментов генома однозначно кластеризуются в субкладу А, куда также относятся МГТВ (Бразилия), JMТV (Китай, Азия) и вариант JMТV/primate/Uganda (Африка). Субклада В включает изоляты JMТV с Антильских островов и варианты JMТV/human/Kosovo (МН133313–МН133316), выделенные от больных КГЛ. Субклада С объединяет изоляты JMТV из Франции (МN095527–МN095530) и вирус Alongshan, обнаруженный у домашних животных и человека в Китае и позднее выявленный в Европе и России.

Можно предположить, что для вирусов с многокомпонентным геномом характерны события перегруппировки/рекомбинации, которые могут вносить вклад в их генетическую изменчивость. Однако имеющиеся данные говорят о том, что геном JMТV чрезвычайно стабилен среди позвоночных и беспозвоночных, что позволяет предположить, что вирус уже хорошо адаптирован к обоим хозяевам. Нуклеотидные последовательности различных сегментов представителей этой группы показывают высокую степень гомологии



**Рис. 3. Филогенетический анализ изолятов КИТВ из индивидуальных иксодовых клещей для всех четырёх сегментов генома.**  
**Fig. 3. Phylogenetic analysis of KITV isolates from individual ixodid ticks for all four genome segments.**

среди географически удалённых вирусов, циркулирующих в Европе, Азии, Африке и Южной Америке. Геномный анализ не позволяет определить очевидные мутации, которые могли бы отразить адаптацию вируса к позвоночному или беспозвоночному хозяину. Возможно, такую консервативность геномов можно связать с распространением одного и того же вируса в различных ареалах. Для более полного понимания такого широкого распространения вируса необходимо исследовать роль перелётных птиц, грызунов и, возможно, летучих мышей.

### Заключение

В настоящем исследовании показано, что Kindia tick virus является первым сегментированным флавиподобным вирусом, обнаруженным на территории Западной Африки. Генетический материал KITV получен при исследовании иксодовых клещей видов *Rh. geigyi*, *Rh. annulatus* и *Rh. decoloratus*, собранных с домашнего скота, уровень инфицированности составил 3,3–12,2%. Филогенетический анализ четырёх фрагментов KITV показал высокий уровень их гомологии (98,5–100%) с ранее обнаруженными изолятами, выделенными в Гвинейской Республике в 2017 г., и позволил кластеризовать их в субкладу A JMTV-подобных вирусов.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод о необходимости проведения дальнейших исследований по изучению циркуляции KITV на территории Западной Африки, выявлению видов носителей/переносчиков и определению степени патогенности для человека и животных.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Karesh W.B., Dobson A., Lloyd-Smith J.O., Lubroth J., Dixon M.A., Bennett M., et al. Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. *Lancet*. 2012; 380(9857): 1936–45. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61678-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61678-X)
2. Gaunt M.W., Sall A.A., Lamballerie X., Falconar A.K.I., Dzhibanian T.I., Gould E.A. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J. Gen. Virol.* 2001; 82(Pt. 8): 1867–76. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-8-1867>
3. Kitchen A., Shackleton L.A., Holmes E.C. Family level phylogenies reveal modes of macroevolution in RNA viruses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2011; 108(1): 238–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011090108>
4. Blitvich B.J., Firth A.E. Insect-specific flaviviruses: a systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. *Viruses*. 2015; 7(4): 1927–59. <https://doi.org/10.3390/v7041927>
5. Qin X.C., Shi M., Tian J.H., Lin X.D., Gao D.Y., He J.R., et al. A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2014; 111(18): 6744–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324194111>
6. Ladner J.T., Wiley M.R., Beitzel B., Auguste A.J., Dupuis A.P. 2<sup>nd</sup>, Lindquist M.E., et al. A multicomponent animal virus isolated from mosquitoes. *Cell Host Microbe*. 2016; 20(3): 357–67. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.011>
7. Emmerich P., Jakupi X., von Possel R., Berisha L., Halili B., Günther S., et al. Viral metagenomics, genetic and evolutionary characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonairovirus in humans, Kosovo. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 65: 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.010>
8. Yu Z.M., Chen J.T., Qin J., Guo J.J., Li K., Xu Q.Y., et al. Identification and characterization of Jingmen tick virus in rodents from

- Xinjiang, China. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 84: 104411. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104411>
9. Jia N., Liu H.B., Ni X.B., Bell-Sakyi L., Zheng Y.C., Song J.L., et al. Emergence of human infection with Jingmen tick virus in China: A retrospective study. *EBioMedicine*. 2019; 43: 317–24. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.004>
  10. Wang Z.D., Wang B., Wei F., Han S.Z., Zhang L., Yang Z.T., et al. A New Segmented Virus Associated with Human Febrile Illness in China. *N. Engl. J. Med.* 2019; 380(22): 2116–25. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1805068>
  11. Maruyama S.R., Castro-Jorge L.A., Ribeiro J.M., Gardinassi L.G., Garcia G.R., Brandão L.G., et al. Characterisation of divergent flavivirus NS3 and NS5 protein sequences detected in Rhipicephalus microplus ticks from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2014; 109(1): 38–50. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130166>
  12. Kuivanen S., Levanov L., Kareinen L., Sironen T., Jääskeläinen A.J., Plyusnin I., et al. Detection of novel tick-borne pathogen, Alongshan virus, in Ixodes Ricinus ticks, south-eastern Finland, 2019. *Euro Surveill.* 2019; 24(27): 1900394. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2019.24.27.1900394>
  13. Kholodilov I.S., Litov A.G., Klimentov A.S., Belova O.A., Polienko A.E., Nikitin N.A., et al. Isolation and characterisation of Alongshan virus in Russia. *Viruses*. 2020; 12(4): 362. <https://doi.org/10.3390/v12040362>
  14. Dinçer E., Hacıoğlu S., Kar S., Emanet N., Brinkmann A., Nitsche A., et al. Survey and characterization of Jingmen tick virus variants. *Viruses*. 2019; 11(11): 1071. <https://doi.org/10.3390/v11111071>
  15. Терновой В.А., Гладышева А.В., Семенцова А.О., Зайковская А.В., Вольнкина А.С., Котенев Е.С. и др. Обнаружение РНК нового многокомпонентного вируса у больных Крымской-Конго геморрагической лихорадкой на юге России. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2020; (2): 116–21. <https://doi.org/10.15690/vramn1192>
  16. Gao X., Zhu K., Wojdyła J.A., Chen P., Qin B., Li Z., et al. Crystal structure of the NS3-like helicase from Alongshan virus. *IUCrJ*. 2020; 7(Pt 3): 375–82. <https://doi.org/10.1107/s2052252520003632>
  17. Wang Z.D., Wang W., Wang N.N., Qiu K., Zhang X., Tana G., et al. Prevalence of the emerging novel Alongshan virus infection in sheep and cattle in Inner Mongolia, northeastern China. *Parasit. Vectors*. 2019; 12(1): 450. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3707-1>
  18. Henderson B.E., Tukei P.M., McCrae A.W., Ssenkubuge Y., Mugo W.N. Virus isolations from Ixodid ticks in Uganda. II. Kadam virus – a new member of arbovirus group B isolated from Rhipicephalus pravus Dontiz. *East Afr. Med. J.* 1970; 47(5): 273–6.
  19. Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Shvalov A.N., Kartashov M.Yu., Bayandin R.B., Tregubchak T.V., et al. Complete coding genome sequence for a novel multicomponent Kindia tick virus detected from ticks collected in Guinea. *bioRxiv*. 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.04.11.036723>
  20. Найденова Е.В., Лопатин А.А., Сафронов В.А., Коломоец Е.В., Левковский А.Е., Силла А.Л. и др. Обеспечение биологической безопасности при проведении противоэпидемических мероприятий в период ликвидации эпидемии лихорадки Эбола в Гвинейской Республике. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2018; 7(3): 102–8. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-13015>
  21. Walker A.R., Bouattour A., Camicas J.L., Agustín Estrada-Peña A., Horak I., Latif A.A., et al. *Ticks of Domestic Animals in Africa: A Guide to Identification of Species*. Edinburgh: Bioscience Reports; 2003.
  22. 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>
  23. Temmam S., Bigot T., Chrétien D., Gondard M., Pérot P., Pommelet V., et al. Insights into the host range, genetic diversity, and geographical distribution of Jingmenviruses. *mSphere*. 2019; 4(6): e00645-19. <https://doi.org/10.1128/msphere.00645-19>

### REFERENCES

1. Karesh W.B., Dobson A., Lloyd-Smith J.O., Lubroth J., Dixon M.A., Bennett M., et al. Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. *Lancet*. 2012; 380(9857): 1936–45. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61678-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61678-X)

2. Gaunt M.W., Sall A.A., Lamballerie X., Falconar A.K.I., Dzhivaniyan T.I., Gould E.A. Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J. Gen. Virol.* 2001; 82(Pt. 8): 1867–76. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-8-1867>
3. Kitchen A., Shackelton L.A., Holmes E.C. Family level phylogenies reveal modes of macroevolution in RNA viruses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2011; 108(1): 238–43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011090108>
4. Blitvich B.J., Firth A.E. Insect-specific flaviviruses: a systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization. *Viruses.* 2015; 7(4): 1927–59. <https://doi.org/10.3390/v7041927>
5. Qin X.C., Shi M., Tian J.H., Lin X.D., Gao D.Y., He J.R., et al. A tick-borne segmented RNA virus contains genome segments derived from unsegmented viral ancestors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2014; 111(18): 6744–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324194111>
6. Ladner J.T., Wiley M.R., Beitzel B., Auguste A.J., Dupuis A.P. 2<sup>nd</sup>, Lindquist M.E., et al. A multicomponent animal virus isolated from mosquitoes. *Cell Host Microbe.* 2016; 20(3): 357–67. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.011>
7. Emmerich P., Jakupi X., von Possel R., Berisha L., Halili B., Günther S., et al. Viral metagenomics, genetic and evolutionary characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonaviruses in humans, Kosovo. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 65: 6–11. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.010>
8. Yu Z.M., Chen J.T., Qin J., Guo J.J., Li K., Xu Q.Y., et al. Identification and characterization of Jingmen tick virus in rodents from Xinjiang, China. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 84: 104411. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104411>
9. Jia N., Liu H.B., Ni X.B., Bell-Sakyi L., Zheng Y.C., Song J.L., et al. Emergence of human infection with Jingmen tick virus in China: A retrospective study. *EBioMedicine.* 2019; 43: 317–24. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.04.004>
10. Wang Z.D., Wang B., Wei F., Han S.Z., Zhang L., Yang Z.T., et al. A New Segmented Virus Associated with Human Febrile Illness in China. *N. Engl. J. Med.* 2019; 380(22): 2116–25. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1805068>
11. Maruyama S.R., Castro-Jorge L.A., Ribeiro J.M., Gardinassi L.G., Garcia G.R., Brandão L.G., et al. Characterisation of divergent flavivirus NS3 and NS5 protein sequences detected in Rhipicephalus microplus ticks from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2014; 109(1): 38–50. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130166>
12. Kuivanen S., Levanov L., Kareinen L., Sironen T., Jääskeläinen A.J., Plyusnin I., et al. Detection of novel tick-borne pathogen, Alongshan virus, in Ixodes Ricinus ticks, south-eastern Finland, 2019. *Euro Surveill.* 2019; 24(27): 1900394. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2019.24.27.1900394>
13. Kholodilov I.S., Litov A.G., Klimentov A.S., Belova O.A., Polienko A.E., Nikitin N.A., et al. Isolation and characterisation of Alongshan virus in Russia. *Viruses.* 2020; 12(4): 362. <https://doi.org/10.3390/v12040362>
14. Dinçer E., Hacıoğlu S., Kar S., Emanet N., Brinkmann A., Nitsche A., et al. Survey and characterization of Jingmen tick virus variants. *Viruses.* 2019; 11(11): 1071. <https://doi.org/10.3390/v11111071>
15. Ternovoy V.A., Gladysheva A.V., Sementsova A.O., Zaykovskaya A.V., Volynkina A.S., Kotenev E.S., et al. Detection of the RNA for new multicomponent virus in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever in southern Russia. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2020; (2): 116–21. <https://doi.org/10.15690/vramn1192> (in Russian)
16. Gao X., Zhu K., Wojdyla J.A., Chen P., Qin B., Li Z., et al. Crystal structure of the NS3-like helicase from Alongshan virus. *IUCrJ.* 2020; 7(Pt 3): 375–82. <https://doi.org/10.1107/s2052252520003632>
17. Wang Z.D., Wang W., Wang N.N., Qiu K., Zhang X., Tana G., et al. Prevalence of the emerging novel Alongshan virus infection in sheep and cattle in Inner Mongolia, northeastern China. *Parasit. Vectors.* 2019; 12(1): 450. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3707-1>
18. Henderson B.E., Tukei P.M., McCrae A.W., Ssenkubuge Y., Mugo W.N. Virus isolations from Ixodid ticks in Uganda. II. Kadam virus – a new member of arbovirus group B isolated from Rhipicephalus pravus Döntiz. *East Afr. Med. J.* 1970; 47(5): 273–6.
19. Ternovoi V.A., Protopopova E.V., Shvalov A.N., Kartashov M.Yu., Bayandin R.B., Tregubchak T.V., et al. Complete coding genome sequence for a novel multicomponent Kindia tick virus detected from ticks collected in Guinea. *bioRxiv.* 2020. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.04.11.036723>
20. Naydenova E.V., Lopatin A.A., Safronov V.A., Kolomoets E.V., Levkovskiy A.E., Silla A.L., et al. Biological safety at carrying out anti-epidemic measures during the liquidation of the epidemic Ebola fever in the Republic of Guinea. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie.* 2018; 7(3): 102–8. <https://doi.org/10.24411/2305-3496-2018-13015> (in Russian)
21. Walker A.R., Bouattour A., Camicas J.L., Agustin Estrada-Peña A., Horak I., Latif A.A., et al. *Ticks of Domestic Animals in Africa: A Guide to Identification of Species.* Edinburgh: Bioscience Reports; 2003.
22. 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>
23. Temmam S., Bigot T., Chrétien D., Gondard M., Pérot P., Pommelet V., et al. Insights into the host range, genetic diversity, and geographical distribution of Jingmenviruses. *mSphere.* 2019; 4(6): e00645-19. <https://doi.org/10.1128/msphere.00645-19>

## НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-146>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



# Молекулярно-эпидемиологический анализ геновариантов SARS-CoV-2 на территории Москвы и Московской области

Ожмегова Е.Н.<sup>1</sup>, Савочкина Т.Е.<sup>1</sup>, Прилипов А.Г.<sup>1</sup>, Тихомиров Е.Е.<sup>1</sup>, Ларичев В.Ф.<sup>1</sup>, Сайфуллин М.А.<sup>1,2</sup>, Гребенникова Т.В.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия

**Введение.** SARS-CoV-2 – вирус, вызывающий тяжёлое острое респираторное заболевание, появившийся в Китае в конце 2019 г., – продолжает быстро распространяться по всему миру, накапливая мутации и тем самым вызывая серьёзные опасения. В настоящее время уже известно о пяти вариантах вируса, вызывающих озабоченность (variant of concern – VOC): альфа (линия В.1.1.7), бета (В.1.351), гамма (Р.1), дельта (В.1.617.2) и омикрон (В.1.1.529). В этой работе мы провели молекулярно-эпидемиологический анализ геновариантов вируса, наиболее часто циркулирующих в Москве и Московской области.

**Цель работы** – оценить распространение различных вариантов SARS-CoV-2 на территории Москвы и Московской области.

**Материалы и методы.** Использовали 227 последовательностей генома SARS-CoV-2. Выделение вируса SARS-CoV-2 производили в культуре клеток Vero E6. Секвенирование проводили по методу Сэнгера. Биоинформационный анализ проводили с помощью пакетов программ MAFFT, IQ-TREE v1.6.12, jModelTest 2.1.7, Nextstrain, Auspice v2.34.

**Результаты.** В результате филогенетического анализа мы выявили основные циркулирующие в России варианты вируса, вызывающие озабоченность на протяжении всего времени существования пандемии, а именно: вариант В.1.1.7, составивший 30% (9/30), AY.122 – 16,7% (5/30), BA.1.1 – 20% (6/30) и В.1.1 – 33,3% (10/30). При исследовании московских образцов на наличие мутаций в структурных белках SARS-CoV-2 разных геновариантов зафиксирована значительная доля наиболее часто встречающихся замен: S-белок – D614G (86,7%), Р681Н/Р (63,3%), Е-белок – Т9I (20,0%); М-белок – I82Т (30,0%), D3G (20,0%), Q19E (20,0%) и, наконец, N-белок – R203K/M (90,0%), G204R/P (73,3%).

**Заключение.** Изучение частоты и влияния мутаций, а также анализ наиболее часто циркулирующих вариантов вируса важны для разработки и совершенствования вакцин для профилактики COVID-19. Следовательно, необходимо постоянно проводить молекулярно-эпидемиологические исследования, поскольку эти данные представляют важную информацию об изменениях в геноме циркулирующих вариантов SARS-CoV-2.

**Ключевые слова:** *коронавирус тяжёлого острого респираторного синдрома 2; SARS-CoV-2; филогенетический анализ вариантов; мутации; кластерный анализ*

**Для цитирования:** Ожмегова Е.Н., Савочкина Т.Е., Прилипов А.Г., Тихомиров Е.Е., Ларичев В.Ф., Сайфуллин М.А., Гребенникова Т.В. Молекулярно-эпидемиологический анализ геновариантов SARS-CoV-2 на территории Москвы и Московской области. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(6): 496-505. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-146>

**Для корреспонденции:** Гребенникова Татьяна Владимировна, д-р биол. наук, профессор, член-корр. РАН, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории молекулярной диагностики, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, г. Москва, Россия. E-mail: [t\\_grebennikova@mail.ru](mailto:t_grebennikova@mail.ru)

**Участие авторов:** Ожмегова Е.Н. – написание статьи, выделение РНК вируса, амплификация и секвенирование, филогенетический анализ; Савочкина Т.Е. – написание статьи, выделение РНК SARS-CoV-2, амплификация и секвенирование; Прилипов А.Г. – выделение РНК SARS-CoV-2, амплификация и секвенирование, анализ сиквенов; Тихомиров Е.Е. – выделение РНК SARS-CoV-2, амплификация и секвенирование; Сайфуллин М.А. – написание статьи, отбор проб от пациентов; Ларичев В.Ф. – выделение SARS-CoV-2 в культуре клеток; Гребенникова Т.В. – организация исследования, анализ полученных результатов, редактирование текста.

**Финансирование.** Государственное задание Минздрава России «Разработка прототипа вакцины на основе VLP для профилактики COVID-19».

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

**Этическое утверждение.** Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол № 32 от 01.12.2022).

Поступила 11.10.2022

Принята в печать 21.11.2022

Опубликована 30.12.2022

## ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-145>

# Molecular epidemiological analysis of SARS-CoV-2 genovariants in Moscow and Moscow region

Ekaterina N. Ozhmegova<sup>1</sup>, Tatyana E. Savochkina<sup>1</sup>, Alexei G. Prilipov<sup>1</sup>, Evgeny E. Tikhomirov<sup>1</sup>, Victor F. Larichev<sup>1</sup>, Mukhammad A. Sayfullin<sup>1,2</sup>, Tatyana V. Grebennikova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, 119997, Moscow, Russia

**Introduction.** SARS-CoV-2, a severe acute respiratory illness virus that emerged in China in late 2019, continues to spread rapidly around the world, accumulating mutations and thus causing serious concern. Five virus variants of concern are currently known: Alpha (lineage B.1.1.7), Beta (lineage B.1.351), Gamma (lineage P.1), Delta (lineage B.1.617.2), and Omicron (lineage B.1.1.529). In this study, we conducted a molecular epidemiological analysis of the most prevalent genovariants in Moscow and the region.

**The aim** of the study is to estimate the distribution of various variants of SARS-CoV-2 in Moscow city and the Moscow Region.

**Materials and methods.** 227 SARS-CoV-2 sequences were used for analysis. Isolation of the SARS-CoV-2 virus was performed on Vero E6 cell culture. Sequencing was performed by the Sanger method. Bioinformatic analysis was carried out using software packages: MAFFT, IQ-TREE v1.6.12, jModelTest 2.1.7, Nextstrain, Auspice v2.34.

**Results.** As a result of phylogenetic analysis, we have identified the main variants of the virus circulating in Russia that have been of concern throughout the existence of the pandemic, namely: variant B.1.1.7, which accounted for 30% (9/30), AY.122, which accounted for 16.7% (5/30), BA.1.1 with 20% (6/30) and B.1.1 with 33.3% (10/30). When examining Moscow samples for the presence of mutations in SARS-CoV-2 structural proteins of different genovariants, a significant percentage of the most common substitutions was recorded: S protein – D614G (86.7%), P681H/R (63.3%), E protein – T9I (20.0%); M protein – I82T (30.0%), D3G (20.0%), Q19E (20.0%) and finally N protein – R203K/M (90.0%), G204R/P (73.3 %).

**Conclusion.** The study of the frequency and impact of mutations, as well as the analysis of the predominant variants of the virus are important for the development and improvement of vaccines for the prevention of COVID-19. Therefore, ongoing molecular epidemiological studies are needed, as these data provide important information about changes in the genome of circulating SARS-CoV-2 variants.

**Keywords:** *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SARS-CoV-2; phylogenetic analysis of variants; mutations; cluster analysis*

**For citation:** Ozhmegova E.N., Savochkina T.E., Prilipov A.G., Tikhomirov E.E., Larichev V.F., Sayfullin M.A., Grebennikova T.V. Molecular epidemiological analysis of SARS-CoV-2 genovariants in Moscow and Moscow region. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(6): 496-505 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-146>

**For correspondence:** Tatyana V. Grebennikova, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Corr. Member RAS, Chief Researcher, Head of Laboratory of Molecular Diagnostics, the National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya, Ministry of Health of the Russian Federation; 123098, Moscow, Russia. E-mail: [t\\_grebennikova@mail.ru](mailto:t_grebennikova@mail.ru)

## Information about the authors:

Ozhmegova E.N., <https://orcid.org/0000-0002-3110-0843>

Savochkina T.E., <https://orcid.org/0000-0003-4366-8476>

Prilipov A.G., <https://orcid.org/0000-0001-8755-1419>

Tikhomirov E.E., <https://orcid.org/0000-0003-4699-1906>

Larichev V.F., <https://orcid.org/0000-0001-8262-5650>

Sayfullin M.A., <https://orcid.org/0000-0003-1058-3193>

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

**Contribution:** Ozhmegova E.N. – article writing, virus RNA isolation, amplification and sequencing, phylogenetic analysis; Savochkina T.E. – article writing, SARS-CoV-2 RNA isolation, amplification and sequencing; Prilipov A.G. – SARS-CoV-2 RNA isolation, amplification and sequencing, sequence analysis; Tikhomirov E.E. – SARS-CoV-2 RNA isolation, amplification and sequencing; Sayfullin M.A. – writing an article, sampling from patients; Larichev V.F. – isolation of SARS-CoV-2 in cell culture; Grebennikova T.V. – organization of the study, analysis of the results, text editing.

**Funding:** State grant of the Ministry of Health of Russia “Development of a prototype vaccine based on VLP for the prevention of COVID-19”.

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

**Ethics approval.** The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya (protocol No. 32 dated Dec. 1, 2022).

Received 11 October 2022  
Accepted 21 November 2022  
Published 30 December 2022

## Введение

Благодаря беспрецедентным усилиям учёных, врачей и работников клинично-диагностических лабораторий по секвенированию генома SARS-CoV-2 появилась возможность наиболее полно отслеживать и анализировать появляющиеся новые варианты SARS-CoV-2 с отличающимся эпидемиологическим поведением. В настоящее время в общедоступной базе данных GISAID (Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data) содержится более 12 млн полных геномов SARS-CoV-2, и данный факт является первым случаем такого масштабного секвенирования за всю историю циркулирования вирусов в мире [1]. В условиях продолжающейся пандемии и адаптивной эволюции вируса [2] данная информация является крайне важной и служит предиктором новых вариантов SARS-CoV-2, которые имеют более выраженные эпидемиологические, иммунологические или патогенные свойства [3].

Ввиду зависимости распространения вирусных вариантов от таких факторов, как случайность, свойства вируса и хозяина, а также социальных факторов и мер здравоохранения предсказать распределение генетических линий в том или ином географическом регионе практически невозможно. Тем более, как подчеркивают авторы некоторых исследований, зачастую это распределение не зависит от приспособленности отдельных геновариантов, а обусловлено эпидемиологическими факторами [4–6].

Анализ проявлений эпидемического процесса COVID-19 и циркуляции геновариантов SARS-CoV-2 на территории РФ за 2020–2022 гг. позволил выделить два этапа и пять подъёмов заболеваемости COVID-19, каждый из которых имел свои особенности. Первый этап (март – декабрь 2020 г.) был обусловлен появлением нового возбудителя в популяции человека, который под воздействием социальных и природных факторов дал начало дальнейшему развитию эпидемического процесса COVID-19. На втором этапе пандемии COVID-19 на территории РФ (с декабря 2020 г. по настоящее время) произошли изменения биологических свойств вируса SARS-CoV-2 с последующей сменой преобладающих геновариантов [7].

В начале 2020 г. разнообразие SARS-CoV-2 на территории России ограничивалось несколькими генетическими линиями, из которых доминировала линия B.1, появившаяся в Северной Италии и достигавшая своего пика в 62% в марте – мае 2020 г., и линия B.1.1, циркулировавшая вплоть до февраля 2021 г. и достигавшая своего пика в 82% в июле – августе 2020 г. [8]. По данным GISAID, скорость появления новых линий возросла во время второй волны пандемии, начавшейся в России в сентябре 2020 г. [9]. Так, согласно Всемирной организации здравоохранения, в мире появились варианты, вызывающие озабоченность (variant of concern – VOC), которые были названы альфа (линия B.1.1.7), бета (B.1.351), гамма (P.1), дельта (B.1.617.2) и омикрон (B.1.1.529) [10]. Все перечисленные линии обладали повышенной трансмиссивностью благодаря мутациям в RBD-связывающем домене спайкового белка, а также пониженной чув-

ствительностью к нейтрализации моноклональными антителами, сывороткам выздоравливающих и иммунизированных людей, а также вакцинам [11].

Несмотря на постоянный мониторинг циркулирующих геновариантов в мире и огромный вклад всех стран по созданию новых терапевтических противовирусных средств, моноклональных антител и вакцин, SARS-CoV-2 продолжает эволюционировать и производить новые VOC, а в его геноме появляются всё новые значимые мутации. Соответственно, исследования по изучению распространения вируса в разных странах и регионах, в том числе для совершенствования и разработки новых препаратов для профилактики COVID-19, является актуальной задачей.

**Целью** данной работы было оценить распространение различных вариантов SARS-CoV-2 на территории Москвы и Московской области.

## Материалы и методы

### *Составление набора данных последовательностей*

В исследовании было использовано 227 последовательностей SARS-CoV-2, 31 из которых была получена при взятии назофарингеальных мазков у пациентов с симптомами новой коронавирусной инфекции из Инфекционной клинической больницы (ИКБ) № 1 г. Москвы в период с марта 2021 г. по апрель 2022 г., а 196 образцов были получены из общедоступной базы данных GISAID [1].

Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол № 32 от 01.12.2022).

### *Выделение вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero E6*

В работе использовали перевиваемую линию клеток почки африканской зелёной мартышки (*Chlorocebus aethiops*) Vero E6, предоставленную Всероссийской коллекцией клеточных культур ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Выращивание клеток осуществляли на среде DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium) с 5% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС). В 96-луночные культуральные плоскодонные планшеты помещали клетки Vero E6 по 12 000 кл/луночка в объёме 100 мкл свежеприготовленной среды. Культивировали 24 ч при температуре 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> до образования монослоя клеток.

Перед внесением проб из планшетов удаляли ростовую среду, промывали клетки 1–2 раза бессысывороточной средой и вносили поддерживающую среду (DMEM с 1% ЭТС).

Пробы носоглоточных мазков от пациентов с клиническим диагнозом «новая коронавирусная инфекция»

обследовали на наличие вируса методом выделения в культуре клеток Vero E6. С палочки тампона делали смыв поддерживающей средой и вносили жидкость в лунки планшета с монослоем клеток. Планшеты инкубировали при температуре 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 96 ч.

Для обнаружения изменения состояния клеточного монослоя (развитие цитопатического действия (ЦПД) вируса) просматривали лунки планшета в инвертированном микроскопе каждые 24 ч. При обнаружении ЦПД культуральную жидкость переносили в новую лунку с монослоем (пассировали). После выявления ЦПД в пассажных клетках культуральную жидкость отбирали и исследовали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) для обнаружения рибонуклеиновой кислоты (РНК) вируса SARS-CoV-2. Положительные образцы секвенировали и регистрировали в международной базе данных GISAID.

#### *Выделение РНК SARS-CoV-2*

Выделение РНК проводили путём экстракции из суспензии исследуемых образцов (культуральной жидкости) смесью гуанидина изотиоцианата, фенола и хлороформа [12].

#### *Проведение обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции*

Для получения амплифицированных фрагментов использовали набор OneTube RT-PCR («Евроген», Россия) согласно рекомендациям производителя. Обратную транскрипцию (ОТ) и ПЦР проводили в тонкостенных пробирках объёмом 0,2 и 0,5 мл (QSP) на амплификаторах Mastercycler Gradient (Eppendorf, Германия) или «Терцик» («ДНК-технология», Россия). Общий объём реакционной смеси составлял 20 мкл. В реакционную смесь входили следующие компоненты: 10 мкл ОТ-ПЦР mix, по 5 пМ прямого и обратного праймера, 3 мкл раствора РНК и 1 мкл смеси ферментов. Амплификацию ОТ-ПЦР осуществляли с использованием следующих параметров: 42 °С 40 мин, 85 °С 2 мин (94 °С 15 с, 50 °С 15 с, 72 °С 90 с) 35 циклов; 72 °С 5 мин 1 цикл.

#### *Секвенирование*

Первичную нуклеотидную последовательность определяли по методу Сэнгера при помощи прямого секвенирования ПЦР-продукта с использованием BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) согласно рекомендациям изготовителя. Электрофорез ДНК осуществлялся на автоматическом ДНК-анализаторе ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems, США).

#### *Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей*

Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей проводили с помощью пакетов программ DNASTAR (Lasergene v.6). Подбор праймеров для проведения реакций ОТ, ПЦР и секвенирования выполняли с помощью программы Primer Premier 5.00 (PREMIER Biosoft International, США). В работе были использованы

синтетические олигонуклеотиды производства фирмы «Литех» (Россия).

#### *Клинико-эпидемиологические данные*

Эпидемиологические метаданные, такие как возраст, пол, район отбора проб, а также клиническая и вирусологическая информация были доступны для 31 последовательности и использовались в качестве данных о признаках. В силу плохого качества нуклеотидной последовательности одного образца было задепонировано в общедоступную базу GISAID 30 последовательностей. Номера доступа GISAID для последовательностей, используемых в этом исследовании: EPI\_ISL\_14995632, EPI\_ISL\_14988081, EPI\_ISL\_14988080, EPI\_ISL\_14988061, EPI\_ISL\_14988083, EPI\_ISL\_14988060, EPI\_ISL\_14988082, EPI\_ISL\_14988063, EPI\_ISL\_14988085, EPI\_ISL\_14988062, EPI\_ISL\_14988084, EPI\_ISL\_14988065, EPI\_ISL\_14988064, EPI\_ISL\_14988067, EPI\_ISL\_14988066, EPI\_ISL\_14988069, EPI\_ISL\_14988068, EPI\_ISL\_14988070, EPI\_ISL\_14988072, EPI\_ISL\_14988071, EPI\_ISL\_14988074, EPI\_ISL\_14988073, EPI\_ISL\_14988076, EPI\_ISL\_14988075, EPI\_ISL\_14988078, EPI\_ISL\_14988077, EPI\_ISL\_14988058, EPI\_ISL\_14988057, EPI\_ISL\_14988079, EPI\_ISL\_14988059.

#### *Выравнивание последовательностей и филогенетический анализ*

В результате выравнивания последовательностей один образец был удалён в силу плохого качества сиквенса. Нуклеотидные последовательности 30 московских образцов и 196 образцов из GISAID выравнивали с помощью MAFFT [13]. Исходное предковое дерево было создано с помощью филогенетического анализа с использованием метода максимального правдоподобия (ML) в IQ-TREE v1.6.12 [14] по модели нуклеотидных замен GTR, которая была выбрана как наиболее подходящая в jModelTest 2.1.7 [15]. Для проверки геноварианта методом ML к выравненным московским последовательностям из ИКБ № 1 были добавлены эталонные последовательности геновариантов и их сублиний, которые были взяты из базы данных последовательностей SARS-CoV-2 GISAID. Полученное филогенетическое дерево было подтверждено с использованием локального экземпляра рабочего процесса Nextstrain [16], который использует анализ ML, реализованный в Tree-Time [16, 17]. Общий набор данных для анализа Nextstrain ML содержал 226 последовательностей SARS-CoV-2: 30 последовательностей S-, E-, M-, N-белков вируса из Москвы, 196 полных геномов глобальных последовательностей SARS-CoV-2, которые использовались в качестве внешней группы. Визуализация дерева была проведена с помощью Auspice версии 2.34.1 [18]. Корнем дерева считался образец hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 (WIV04), который обозначается в базе GISAID как EPI\_ISL\_402124.

#### *Статистический анализ*

Анализ эпидемиологических характеристик, таких как пол, возраст, компьютерная томография (КТ) при

постановке, мазок при постановке, исход заболевания, был проанализирован с помощью критерия  $\chi^2$  Пирсона или двустороннего точного критерия Фишера (при необходимости). Различия считались достоверными при  $p$  менее 0,05. Все анализы выполнены в программе Statistica 10.0 (StatSoft, США).

#### Клинико-эпидемиологическая характеристика исследуемых образцов

Отобраны пробы от 31 пациента, госпитализированного в ИКБ № 1 в период с марта 2021 г. по апрель 2022 г. (табл. 1). Из них 30 пациентов проживали на территории 8 из 12 административных округов (АО) Москвы (Зеленоградский АО – 4, Южный – 2, Юго-Западный – 3, Центральный – 1, Северо-Западный – 9, Северо-Восточный – 4, Северный – 3, Западный – 3, Восточный – 1), один – в г. Химки (Московская область). Два пациента были госпитализированы из одного эпидемического очага (мать с дочерью). Большая часть госпитализированных из Северо-Западного АО, по нашему мнению, связана с расположением инфекционного стационара в данном округе. За последние 2 недели 29 пациентов не выезжали за пределы региона проживания, одна пациентка выезжала из Москвы в Московскую область. Указания на предшествующий контакт с больным COVID-19 были у 7 заболевших.

Возраст пациентов составил от 24 до 99 лет, в среднем  $57,5 \pm 3,6$  года. В группе было 14 женщин (45,2%). Хронические заболевания установлены у 19 (61,2%) пациентов, сочетанная коморбидная

патология (более одного хронического заболевания) выявлена у 12 человек. Пациенты были госпитализированы на 3–8-й день от начала заболевания, медиана – 6-й [4; 8] день болезни. Противовирусную терапию до госпитализации получали 14 человек (умифенавир, фавипиравир, триазаверин).

Изменения в лёгких при мультиспиральной КТ (МСКТ) грудной клетки были установлены у 25 человек (до 25% поражения лёгких – 20, 25–50% – 4, 50–75% – 1). Двум пациентам МСКТ не была проведена.

Тридцать пациентов были выписаны с улучшением на амбулаторное лечение, один мужчина 50 лет скончался на 23-й день болезни (15-й день стационарного лечения) на фоне прогрессирующей дыхательной, сердечно-сосудистой недостаточности. Количество койко-дней составило от 2 до 26, медиана 8 [6; 12].

#### Филогенетический анализ исследуемых образцов

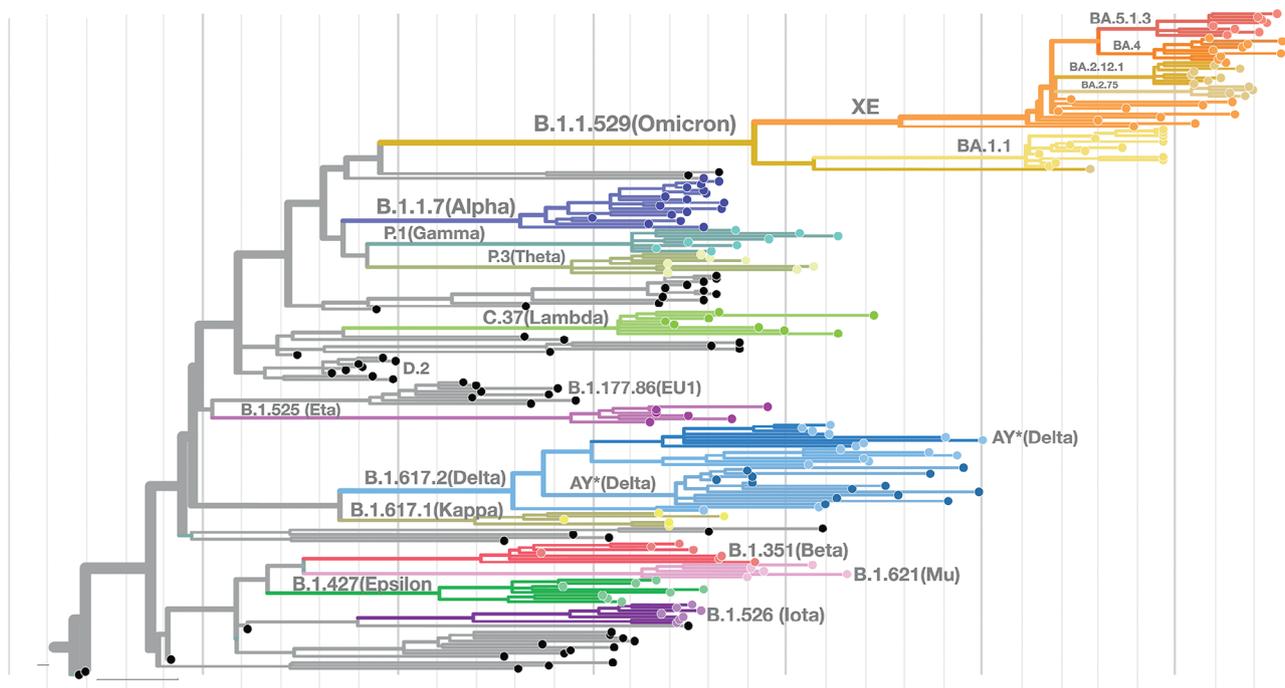
Филогенетическая дендрограмма с использованием метода ML была построена с использованием 196 полных геномов, взятых в открытой базе данных GISAID, включающих референс-штаммы Nextstrain для каждого варианта, а также 31 образец белков вируса S, E, M, N, полученных в лаборатории. Один образец был удалён в силу низкого качества сиквенса. Филогенетический анализ 30 образцов белков S (рецептор-связывающий белок), E (оболочечный белок), M (мембранный белок), N (нуклеокапсидный белок) SARS-CoV-2, полученных в лаборатории, позволил определить 4 клада московских образцов SARS-CoV-2 с высокой статистической поддержкой (PP  $\approx 1,0$  во всех случаях). В результате субтипирования московских образцов, полученных из ИКБ № 1, удалось выявить наиболее часто циркулирующие варианты и VOC в России и в мире, а именно: альфа (GRY; B.1.1.7 + Q.\*), впервые выявленный на территории Великобритании дельта (GK; B.1.617.2 + AY.\*), впервые детектированный в Индии, и омикрон (GRA; B.1.1.529 + BA.\*), впервые обнаруженный в Ботсване, Гонконге и Южной Африке (рис. 1).

В то же время перечисленные VOC являются наиболее интересными вариантами с точки зрения создания вакцин. В результате филогенетического анализа методом ML 10 (33,3%) образцов из ИКБ № 1 были отнесены к линии B.1.1 вместе с референс-штаммами из Японии, США и России (рис. 2). В свою очередь, 8 из 9 образцов образовывали между собой высокоподдерживаемый кластер (PP = 1,0) (рис. 2). Высокая бутстрэп-поддержка (PP = 1) наблюдалась в кладе B.1.1.7 (альфа). В данной кладе группировались вместе 9 (30,0%) образцов из ИКБ № 1 и референс-штаммы из Германии, США и Швеции. Пять московских образцов ( $n = 31$ ; 16,7%), полученные из ИКБ № 1, и референс-штаммы из Англии, Шотландии, США, Швейцарии, Германии и Сингапура вместе образовывали кладу и относились к варианту AY.122 (B.1.617.2, дельта) (PP = 1,0) (рис. 2). В то же время образец 252 объединялся в единый клайд с высокой статистической поддержкой (PP = 1,0) с референс-образцами из Англии, Шотландии и США. И, наконец, 6 (20,0%) московских образцов были отнесены к варианту BA.1.1

Таблица 1. Клинико-эпидемиологические данные исследуемых образцов

Table 1. Clinical and epidemiological data of the studied samples

Показатель/Indicator	Значение/ Value, n (%)	p value
Средний возраст, лет / Average age, years, $M \pm m$	57,5 $\pm$ 3,6	
Пол/Gender		
Мужчины/Men	17 (54,8)	0,27
Женщины/Women	14 (45,2)	
КТ при постановке / CT at diagnosis		
0	4 (12,9)	0,65
1	20 (64,5)	
2	4 (12,9)	
3	1 (3,2)	
Не проведено / Not carried out	2 (6,5)	0,77
Мазок при постановке / Smear at diagnosis		
Положительный/Positive	27 (87,1)	0,018
Отрицательный/Negative	4 (12,9)	
Исход заболевания / Outcome of the disease		
Выписан/Discharged	30 (96,8)	8,32
Умер/Died	1 (3,2)	
Заключительный диагноз / Final diagnosis		
COVID-19, вирус идентифицирован / Virus identified	28 (90,3)	0,007
COVID-19, вирус не идентифицирован / Virus not identified	3 (9,7)	



**Рис. 1.** Общая дендрограмма максимального правдоподобия 30 московских последовательностей, полученных из Инфекционной клинической больницы № 1, с 196 общедоступными последовательностями из открытой базы данных GISAID (использовались референс-варианты Nextstrain). Дерево укоренено с помощью референс-образца из Уханя (hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 (WIV04)). Цветом и подписями обозначены варианты, вызывающие озабоченность и интерес (VOC и VOI).

**Fig. 1.** Maximum likelihood dendrogram for 30 Moscow sequences obtained from Infectious Clinical Hospital No. 1 together with 196 available sequences from the GISAID database (Nextstrain reference variants were used). The tree is rooted using a reference sample from Wuhan (hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019 (WIV04)). Variants of concern and interest (VOC and VOI) are marked with color and captions.

(B.1.1.529, омикрон) вместе с референс-штаммами из Люксембурга, США и Италии (**рис. 2**).

#### *Анализ наиболее часто встречающихся мутаций в структурных белках SARS-CoV-2*

При исследовании московских образцов ( $n = 30$ ), полученных из ИКБ № 1, на наличие мутаций в структурных белках SARS-CoV-2 разных генетических вариантов зафиксирована значительная доля встречающихся вариантов замен, таких как S-белок – D614G (26/30; 86,7%), P681H/R (19/30; 63,3%), H69del + V70del (15/30; 50,0%), Y144del (14/30; 46,7%), N501Y (13/30; 43,3%), E156del + F157del + R158del/G (12/30; 40%), E484K (9/30; 30,0%); E-белок – T9I (6/30; 20,0%); M-белок – I82T (9/30; 30,0%), D3G (6/30; 20,0%), Q19E (6/30; 20,0%), A63T (6/30; 20,0%) и, наконец, N-белок – R203K/M (27/30; 90,0%), G204R/P (22/30; 73,3%), D3L (7/30; 23,3%), S235F (7/30; 23,3%) (**табл. 2**).

На **рис. 3** изображена частота мутаций в структурных белках, самым варибельным участком является нуклеотидная последовательность гена S, именно в данном участке встречалось большее разнообразие мутаций. Мутации N501Y, E484K, D614G и P681H/R являются примерами общих мутаций между вариантами B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2 и B.1.1.529.

Согласно **рис. 3** самым высококонсервативным структурным белком SARS-CoV-2 оказался белок оболочки

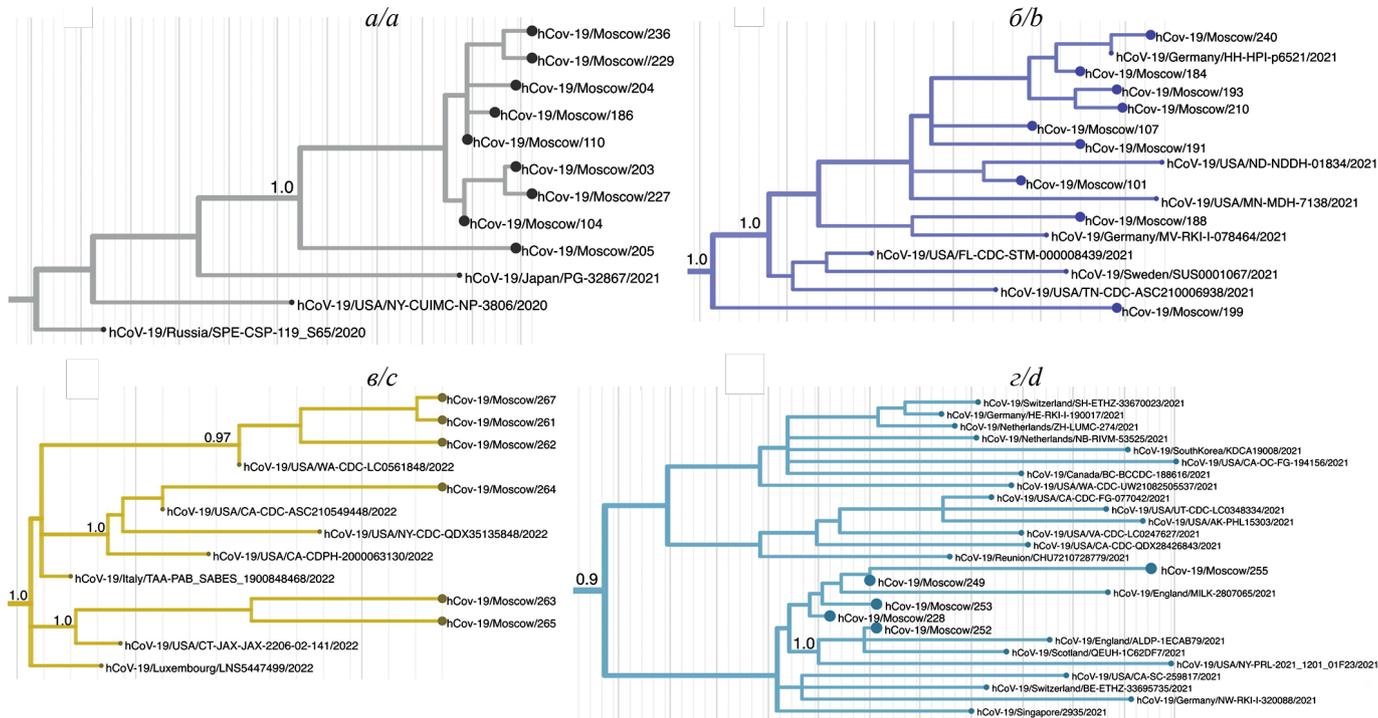
вируса (E), на его участке была найдена только одна мутация – T9I, которая встретила только у образцов, относящихся к варианту B.1.1.529 (омикрон), и, согласно исследованию [19], имела самую высокую распространённость среди всех мутаций в оболочечном белке.

Анализируя частоту встречаемости мутаций в гене мембраны (M), можно сказать, что в нашем исследовании данный белок оставался высококонсервативным, но в настоящее время имеются данные о быстром увеличении мутаций в данном белке за счёт замены I82T, которая была самой распространённой и в нашем исследовании [20].

Вторым по варибельности геном после S-белка стал белок N, отвечающий за формирование новых вирусных частиц. Самыми распространёнными мутациями в данном белке оказались замены R203K/M и G204R/P, часто данные мутации были сопряжены друг с другом. Недавние исследования показали, что частота данных мутаций в белке нуклеокапсида (N) SARS-CoV-2 увеличивается среди новых вариантов, вызывающих озабоченность или интерес.

#### **Результаты и обсуждение**

В начале пандемии COVID-19 Россия оказалась несколько изолированной ввиду того, что были применены строгие эпидемиологические меры против распространения SARS-CoV-2, поэтому первые случаи COVID-19, а также случаи появления VOC произошли



**Рис. 2.** Дендрограммы максимального правдоподобия московских образцов. Жирными точками указаны Московские образцы из ИКБ № 1. Цифрами у узлов дерева указаны высокоподдерживаемые ветви (бутстреп поддержка > 0,9). Названия образцов указаны в соответствии с названиями из базы данных GISAID: *a* – линия B.1.1 вместе с референс-штаммами из Японии, США и России, *b* – линия B.1.1.7 (Alpha) с референс-штаммами из Германии, США и Швеции, *c* – линия BA.1.1 (B.1.1.529; Omicron) вместе с референс-штаммами из Люксембурга, США и Италии, *d* – линия AY.122 (B.1.617.2; Delta) с референс-штаммами из Англии, Шотландии, США, Швейцарии, Германии и Сингапура.

**Fig. 2.** Maximum likelihood dendrograms of Moscow samples. Illuminated dots indicate Moscow samples from IKH№1. The numbers at the tree nodes indicate highly supported branches (bootstrap support > 0.9). The names of the specimens are given according to the names from the GISAID database: *a* – line B.1.1 together with reference strains from Japan, USA and Russia, *b* – line B.1.1.7 (Alpha) with reference strains from Germany, USA and Sweden, *c* – line BA.1.1 (B.1.1.529; Omicron) together with reference strains from Luxembourg, USA and Italy, *d* – line AY.122 (B.1.617.2; Delta) with reference strains from England, Scotland, USA, Switzerland, Germany and Singapore.

здесь позже, чем во многих других странах мира [21]. Тем не менее, несмотря на закрытие границ, импорт новых геновариантов продолжался, также происходили изменения биологических свойств вируса в виде накопления ключевых мутаций, напрямую или косвенно влияющих на контагиозность, патогенность и реакцию на иммунизацию. Это привело к появлению тысячи российских линий, а также VOC [21, 22].

Так, во время второй волны пандемии (сентябрь 2020 г.) в России появилась линия B.1.1.7 (20I (альфа, V1)), которая уже в марте 2021 г. достигла частоты более 15% [22]. Вместе с вариантом B.1.1.7 в апреле 2021 г. в России были уже широко распространены российские линии B.1.1.524 и B.1.1.52. В середине весны 2021 г. ввиду одного случая завоза или нескольких в одно и то же время из одного плохо отобранного географического места в России появился вариант дельта (B.1.617.2; AY.122), частота которого увеличилась с 1% в апреле до более чем 90% в июне [23]. В конце 2021 г. был обнаружен новый VOC – B.1.1.529 (омикрон), который почти сразу вытеснил предыдущий доминирующий во всём мире вариант дельта (B.1.617.2), и в настоящее время он является преобладающим. Вакцины и терапевтические сред-

ства являются очень ценными инструментами в борьбе с SARS-CoV-2 и прогрессированием заболевания. Однако некоторые мутации вируса могут вызывать изменения ряда свойств, таких как инфекционная активность, патогенность, в том числе ускользание от современных терапевтических моноклональных антител и существующих вакцин [24, 25].

В настоящем исследовании мы провели молекулярно-эпидемиологический анализ геновариантов SARS-CoV-2, полученных в ИКБ № 1 (г. Москва). В результате филогенетического анализа мы выявили основные циркулирующие в России VOC на протяжении всего времени существования пандемии, а именно: вариант B.1.1.7 (альфа), который составил 30% (9/30) от общей выборки, исследуемых пациентов ( $n = 30$ ), AY.122 (B.1.617.2, дельта), составивший 16,7% (5/30), BA.1.1 (BB.1.1.529, омикрон), составивший 20% (6/30) и B.1.1, составивший 33,3% (10/30). Следует отметить, что анализ проводился начиная с конца 2020 г., когда доминирующим вариантом в России был B.1.1, по весну 2022 г., когда доминирующим вариантом стал BA.1.1 (омикрон). Поэтому данное исследование отражает распространённость каждого варианта по генеральной совокупности

**Таблица 2. Частота встречаемости мутаций в белках S, E, M, N SARS-CoV-2, n (%)**

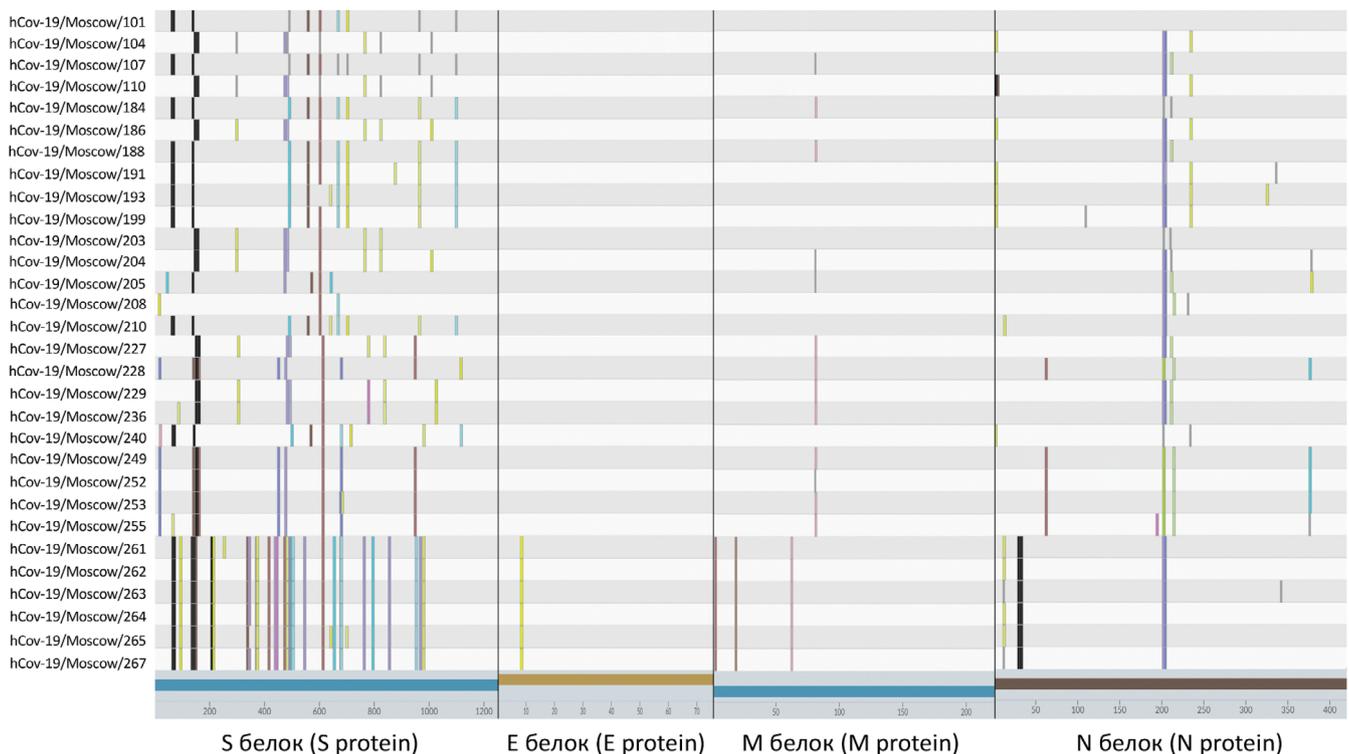
**Table 2. Frequency of mutations in S, E, M, N SARS-CoV-2 proteins, n (%)**

Тип мутации / Mutation type	Частота встречаемости мутации / Mutation frequency
Мутации в белке S / Mutations in protein S	
H69del + V70del	15 (50,0)
Y144del	14 (46,7)
E156del + F157del + R158del/G	12 (40,0)
E484K	9 (30,0)
N501Y	13 (43,3)
A570D	9 (30,0)
D614G	26 (86,7)
P681H/R	19 (63,3)
T716I	8 (26,7)
Мутации в белке E / Mutations in protein E	
T9I	6 (20,0)
Мутации в белке M / Mutations in protein M	
I82T	9 (30,0)
D3G	6 (20,0)
Q19E	6 (20,0)
A63T	6 (20,0)
Мутации в белке N / Mutations in protein N	
D3L	7 (23,3)
R203K/M	27 (90,0)
G204R/P	22 (73,3)
S235F	7 (23,3)

последовательностей разных штаммов коронавируса.

Анализ мутаций в структурных белках S, E, M, N SARS-CoV-2 показал, что разнообразие мутаций в большей степени приходится на S-белок, а именно на часть RBD и других доменов. Данный факт очевиден с точки зрения того, что для эффективной адаптации коронавируса к новому хозяину необходимы мутации, влияющие на связывание с рецептором, поэтому данный белок играет важную роль в патогенезе вирусной инфекции и является критическим детерминантом вирусного тропизма и инфекционности [26].

Самой распространённой мутацией в S-белке различных генетических вариантов SARS-CoV-2 была замена D614G, которая отмечалась повышенной контагиозностью (в 4–9 раз), но не являлась мутацией, ускользающей от иммунного ответа [27]. Вторая по частоте встречаемости была замена P681H/R, которая потенциально могла бы влиять на усиление инфекции и трансмиссивность, однако исследования продолжаются [28, 29]. Следующей по распространённости и значимости была мутация E484K/A, которая вызывает особую озабоченность ввиду того, что она повышает аффинность к рецептору hACE2 (человеческий ангиотензинпревращающий фермент 2) и может ускользать от моноклональных антител, а также сыровороток выздоравливающих/вакцинированных. Часто встречающаяся в данном исследовании замена N501Y, помимо влияния на аффинность к hACE2-рецептору, ускользание от моноклональных антител, а также



**Рис. 3.** Частота мутаций в структурных белках SARS-CoV-2 (S, E, M, N) московских образцов из Инфекционной клинической больницы № 1.

**Fig. 3.** Frequency of mutations in SARS-CoV-2 structural proteins (S, E, M, N) in Moscow samples from Infectious Clinical Hospital No. 1.

сывороток выздоравливающих/вакцинированных, повышает трансмиссивность вируса и влияет на течение заболевания [30–33].

Самой распространённой в белке М была мутация I82T (9/30; 30%). Учитывая её быстрое появление в ряде стран и роль белка М во многих вирусных функциях, включая связывание вирусных клеток-хозяев, врождённый иммунный и Т-клеточный ответ при SARS и SARS-CoV-2 с возможным уклонением от иммунитета, данная мутация требует включения в текущий геномный надзор за SARS-CoV-2 и дальнейшую оценку потенциального увеличения географического распространения и патогенности.

Белок N был вторым по разнообразию и количеству присутствующих мутаций после белка S и представлен в основном мутациями R203K/M и G204R/P. В исследовании [34] было показано, что R203K/G204R связаны с появлением высококонтагиозной линии SARS-CoV-2 B.1.1.7. Конкурентные эксперименты предполагают, что варианты 203K/204R обладают преимуществом репликации по сравнению с предшествующими вариантами R203/G204, возможно, связанными со сборкой рибонуклеокапсида (RNP). Более того, вирус 203K/204R проявляет повышенную инфекционность в клетках лёгких человека и хомяков.

Наконец, наши результаты ограничены областью генов S, E, M, N SARS-CoV-2. Использование полных геномов может обеспечить более точный вывод результатов исследования, что следует учитывать при интерпретации результатов настоящего исследования.

### Заключение

В настоящем исследовании мы выявили основные мутации и варианты вируса SARS-CoV-2, которые были получены из ИКБ № 1 и циркулировали на территории Москвы и Московской области в период с марта 2020 г. по апрель 2022 г. В свою очередь, изучение частоты и влияния мутаций, а также анализ наиболее часто циркулирующих вариантов вируса важны для разработки и совершенствования вакцин для профилактики COVID-19. Можно предположить, что оптимизация антигенного состава вакцин в соответствии с упомянутыми выше мутациями, которые соответствуют разным вариантам вируса, обеспечит синтез специфических антител. Тем не менее предстоящая задача остаётся огромной: уровни передачи высоки даже в районах с широко распространённой вакцинацией и предыдущими волнами инфекции, в геноме SARS-CoV-2 появляются новые мутации, и остаётся много открытых вопросов о будущем эпидемиологическом воздействии данного вируса. Следовательно, эпидемиологические исследования, особенно направленные на изучение генома SARS-CoV-2 молекулярными методами, должны продолжаться и составлять неотъемлемую часть в разработке вирусных вакцин для профилактики COVID-19.

### ЛИТЕРАТУРА

1. GISAID. Available at: <https://gisaid.org/>
2. Kistler K.E., Huddleston J., Bedford T. Rapid and parallel adaptive mutations in spike S1 drive clade success in SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe*. 2022; 30(4): 545–55e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.03.018>

3. (COVID-19 Genomics UK (COG-UK). An integrated national scale SARS-CoV-2 genomic surveillance network. *Lancet Microbe*. 2020; 1(3): e99–e100. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30054-9](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30054-9)
4. Endo A., Abbott S., Kucharski A.J., Funk S.; Group CftMMoIDC-W. Estimating the overdispersion in COVID-19 transmission using outbreak sizes outside China. *Wellcome Open Res*. 2020; 5: 67. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15842.3>
5. Lewis D. Superspreading drives the COVID pandemic – and could help to tame it. *Nature*. 2021; 590(7847): 544–6. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-00460-x>
6. Sun K., Wang W., Gao L., Wang Y., Luo K., Ren L., et al. Transmission heterogeneities, kinetics, and controllability of SARS-CoV-2. *Science*. 2021; 371(6526): eabe2424. <https://doi.org/10.1126/science.abe2424>
7. Акимкин В.Г., Попова А.Ю., Плоскирева А.А., Углева С.В., Семенов Т.А., Пшеничная Н.Ю. и др. COVID-19: эволюция пандемии в России. Сообщение I: проявления эпидемического процесса COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022; 99(3): 269–86. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-276>
8. Outbreak.info. Available at: <https://outbreak.info/>
9. Акимкин В.Г., Попова А.Ю., Хафизов К.Ф., Дубоделов Д.В., Углева С.В., Семенов Т.А. и др. COVID-19: эволюция пандемии в России. Сообщение II: динамика циркуляции геновариантов вируса SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022; 99(4): 381–96. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-295>
10. ВОЗ. Вспышка коронавирусной инфекции COVID-19. Available at: <https://www.who.int/ru/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
11. Planas D., Veyer D., Baidaliuk A., Staropoli I., Guivel-Benhassine F., Rajah M.M., et al. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature*. 2021; 596(7871): 276–80. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03777-9>
12. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc*. 2006; 1(2): 581–5. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
13. Katoh K., Rozewicki J., Yamada K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform*. 2019; 20(4): 1160–6. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
14. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol*. 2015; 32(1): 268–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
15. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*. 2012; 9(8): 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
16. Hadfield J., Megill C., Bell S.M., Huddleston J., Potter B., Callender C., et al. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics*. 2018; 34(23): 4121–3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty407>
17. Sagulenko P., Puller V., Neher R.A. TreeTime: Maximum-likelihood phylodynamic analysis. *Virus Evol*. 2018; 4(1): vex042. <https://doi.org/10.1093/ve/vex042>
18. Auspice. Available at: <https://auspice.us>
19. Mahmanzar M., Houseini S.T., Rahimian K., Namini A.M., Gholamzad A., Tokhanbigli S., et al. The first geographic identification by country of sustainable mutations of SARS-CoV-2 sequence samples: worldwide natural selection trends. *bioRxiv*. 2022. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2022.07.18.500565>
20. Shen L., Bard J.D., Triche T.J., Judkins A.R., Biegel J.A., Gai X. Emerging variants of concern in SARS-CoV-2 membrane protein: a highly conserved target with potential pathological and therapeutic implications. *Emerg. Microbes Infect.* 2021; 10(1): 885–93. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1922097>
21. Komissarov A.B., Safina K.R., Garushyants S.K., Fadeev A.V., Sergeeva M.V., Ivanova A.A., et al. Genomic epidemiology of the early stages of the SARS-CoV-2 outbreak in Russia. *Nat. Commun*. 2021; 12(1): 649. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20880-z>
22. Klink G.V., Safina K.R., Garushyants S.K., Moldovan M., Nabieva E., Komissarov A.B., et al. Spread of endemic SARS-CoV-2 lineages in Russia before April 2021. *PLoS One*. 2022; 17(7): e0270717. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270717>
23. Борисова Н.И., Котов И.А., Колесников А.А., Каптелова В.В., Сперанская А.С., Кондрашева Л.Ю. и др. Мониторинг распространения вариантов SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus) на территории Московского региона с помощью таргетного высокопроизводительного секвенирования. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(4): 269–78. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-72>
24. Kannan S., Shaik Syed Ali P., Sheeza A. Omicron (B.1.1.529) – variant of concern – molecular profile and epidemiology: a mini review. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci*. 2021; 25(24): 8019–22. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_202112\\_27653](https://doi.org/10.26355/eurrev_202112_27653)

25. 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)
26. Unni S., Aouti S., Thiyagarajan S., Padmanabhan B. Identification of a repurposed drug as an inhibitor of Spike protein of human coronavirus SARS-CoV-2 by computational methods. *J. Biosci.* 2020; 45(1): 130. <https://doi.org/10.1007/s12038-020-00102-w>
27. Daniloski Z., Jordan T.X., Ilmain J.K., Guo X., Bhabha G., tenOever B.R., et al. The Spike D614G mutation increases SARS-CoV-2 infection of multiple human cell types. *Elife*. 2021; 10: e65365. <https://doi.org/10.7554/eLife.65365>
28. Zuckerman N.S., Fleishon S., Bucris E., Bar-Ilan D., Linial M., Bar-Or I., et al. A unique SARS-CoV-2 spike protein P681H variant detected in Israel. *Vaccines (Basel)*. 2021; 9(6): 616. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060616>
29. Baden L.R., El Sahly H.M., Essink B., Kotloff K., Frey S., Novak R., et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2021; 384(5): 403–16. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389>
30. Polack F.P., Thomas S.J., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(27): 2603–15. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>
31. Sadoff J., Gray G., Vandebosch A., Cárdenas V., Shukarev G., Grinsztejn B., et al. Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2021; 384(23): 2187–201. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2101544>
32. Dong E., Du H., Gardner L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect. Dis.* 2020; 20(5): 533–4. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30120-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30120-1)
33. Wang R., Chen J., Gao K., Wei G.W. Vaccine-escape and fast-growing mutations in the United Kingdom, the United States, Singapore, Spain, India, and other COVID-19-devastated countries. *Genomics*. 2021; 113(4): 2158–70. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.05.006>
34. Wu H., Xing N., Meng K., Fu B., Xue W., Dong P., et al. Nucleocapsid mutations R203K/G204R increase the infectivity, fitness, and virulence of SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe*. 2021; 29(12): 1788–801.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.11.005>
- tion. *Brief Bioinform.* 2019; 20(4): 1160–6. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
14. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 2015; 32(1): 268–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
15. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*. 2012; 9(8): 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
16. Hadfield J., Megill C., Bell S.M., Huddleston J., Potter B., Callender C., et al. Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics*. 2018; 34(23): 4121–3. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty407>
17. Sagulenko P., Puller V., Neher R.A. TreeTime: Maximum-likelihood phylodynamic analysis. *Virus Evol.* 2018; 4(1): vex042. <https://doi.org/10.1093/ve/vex042>
18. Auspice. Available at: <https://auspice.us>
19. Mahmanzar M., Houseini S.T., Rahimani K., Namini A.M., Gholamzad A., Tokhanbigli S., et al. The first geographic identification by country of sustainable mutations of SARS-COV2 sequence samples: worldwide natural selection trends. *bioRxiv*. 2022. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2022.07.18.500565>
20. Shen L., Bard J.D., Triche T.J., Judkins A.R., Biegel J.A., Gai X. Emerging variants of concern in SARS-CoV-2 membrane protein: a highly conserved target with potential pathological and therapeutic implications. *Emerg. Microbes Infect.* 2021; 10(1): 885–93. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1922097>
21. Komissarov A.B., Safina K.R., Garushyants S.K., Fadeev A.V., Sergeeva M.V., Ivanova A.A., et al. Genomic epidemiology of the early stages of the SARS-CoV-2 outbreak in Russia. *Nat. Commun.* 2021; 12(1): 649. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20880-z>
22. Klink G.V., Safina K.R., Garushyants S.K., Moldovan M., Nabieva E., Komissarov A.B., et al. Spread of endemic SARS-CoV-2 lineages in Russia before April 2021. *PLoS One*. 2022; 17(7): e0270717. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270717>
23. Borisova N.I., Kotov I.A., Kolesnikov A.A., Kaptelova V.V., Speranskaya A.S., Kondrasheva L.Yu., et al. Monitoring the spread of the SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus) variants in the Moscow region using targeted high-throughput sequencing. *Voprosy virusologii*. 2021; 66(4): 269–78. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-72> (in Russian)
24. Kannan S., Shaik Syed Ali P., Sheeza A. Omicron (B.1.1.529) – variant of concern – molecular profile and epidemiology: a mini review. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2021; 25(24): 8019–22. [https://doi.org/10.26355/eurrev\\_202112\\_27653](https://doi.org/10.26355/eurrev_202112_27653)
25. 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)
26. Unni S., Aouti S., Thiyagarajan S., Padmanabhan B. Identification of a repurposed drug as an inhibitor of Spike protein of human coronavirus SARS-CoV-2 by computational methods. *J. Biosci.* 2020; 45(1): 130. <https://doi.org/10.1007/s12038-020-00102-w>
27. Daniloski Z., Jordan T.X., Ilmain J.K., Guo X., Bhabha G., tenOever B.R., et al. The Spike D614G mutation increases SARS-CoV-2 infection of multiple human cell types. *Elife*. 2021; 10: e65365. <https://doi.org/10.7554/eLife.65365>
28. Zuckerman N.S., Fleishon S., Bucris E., Bar-Ilan D., Linial M., Bar-Or I., et al. A unique SARS-CoV-2 spike protein P681H variant detected in Israel. *Vaccines (Basel)*. 2021; 9(6): 616. <https://doi.org/10.3390/vaccines9060616>
29. Baden L.R., El Sahly H.M., Essink B., Kotloff K., Frey S., Novak R., et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2021; 384(5): 403–16. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389>
30. Polack F.P., Thomas S.J., Kitchin N., Absalon J., Gurtman A., Lockhart S., et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2020; 383(27): 2603–15. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2034577>
31. Sadoff J., Gray G., Vandebosch A., Cárdenas V., Shukarev G., Grinsztejn B., et al. Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19. *N. Engl. J. Med.* 2021; 384(23): 2187–201. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2101544>
32. Dong E., Du H., Gardner L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Infect. Dis.* 2020; 20(5): 533–4. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30120-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30120-1)
33. Wang R., Chen J., Gao K., Wei G.W. Vaccine-escape and fast-growing mutations in the United Kingdom, the United States, Singapore, Spain, India, and other COVID-19-devastated countries. *Genomics*. 2021; 113(4): 2158–70. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2021.05.006>
34. Wu H., Xing N., Meng K., Fu B., Xue W., Dong P., et al. Nucleocapsid mutations R203K/G204R increase the infectivity, fitness, and virulence of SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe*. 2021; 29(12): 1788–801.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.11.005>

## REFERENCES

1. GISAID. Available at: <https://gisaid.org/>
2. Kistler K.E., Huddleston J., Bedford T. Rapid and parallel adaptive mutations in spike S1 drive clade success in SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe*. 2022; 30(4): 545–55.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.03.018>
3. (COVID-19 Genomics UK (COG-UK). An integrated national scale SARS-CoV-2 genomic surveillance network. *Lancet Microbe*. 2020; 1(3): e99–e100. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30054-9](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30054-9)
4. Endo A., Abbott S., Kucharski A.J., Funk S., Group CfMMoIDC-W. Estimating the overdispersion in COVID-19 transmission using outbreak sizes outside China. *Wellcome Open Res.* 2020; 5: 67. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.15842.3>
5. Lewis D. Superspreading drives the COVID pandemic – and could help to tame it. *Nature*. 2021; 590(7847): 544–6. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-00460-x>
6. Sun K., Wang W., Gao L., Wang Y., Luo K., Ren L., et al. Transmission heterogeneities, kinetics, and controllability of SARS-CoV-2. *Science*. 2021; 371(6526): eabe2424. <https://doi.org/10.1126/science.abe2424>
7. Akimkin V.G., Popova A.Yu., Ploskireva A.A., Ugleva S.V., Semenenko T.A., Pshenichnaya N.Yu., et al. COVID-19: the evolution of the pandemic in Russia. Report I: manifestations of the COVID-19 epidemic process. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022; 99(3): 269–86. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-276>
8. Outbreak.info. Available at: <https://outbreak.info/>
9. Akimkin V.G., Popova A.Yu., Khafizov K.F., Dubodelov D.V., Ugleva S.V., Semenenko T.A., et al. COVID-19: evolution of the pandemic in Russia. Report II: dynamics of the circulation of SARS-CoV-2 genetic variants. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022; 99(4): 381–396. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2959311-295>
10. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>
11. Planas D., Veyer D., Baidaliuk A., Staropoli I., Guivel-Benhassine F., Rajah M.M., et al. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature*. 2021; 596(7871): 276–80. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03777-9>
12. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* 2006; 1(2): 581–5. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.83>
13. Katoh K., Rozewicki J., Yamada K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization.

## НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-148>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



## Противовирусная и вирулицидная активность дезоксирибонуклеата натрия и его комплекса с железом в отношении вирусов разных царств и семейств

Носик Д.Н., Калнина Л.Б., Лобач О.А., Чатаева М.С., Бережная Е.В., Бочкова М.С., Киселева И.А., Селимова Л.М., Носик Н.Н.

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

**Введение.** Актуальнейшей проблемой современной медицины является борьба с острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ), для которой необходимы лекарства широкого противовирусного спектра действия, а также средства, повышающие защитные функции иммунного ответа. Подобным эффектом обладают дезоксирибонуклеат натрия (ДНК-Na) и его комплекс с железом (ДНК-Na-Fe), созданные на основе двухнитевой ДНК природного происхождения.

**Цель исследования** – изучение противовирусной и вирулицидной активности ДНК-Na и ДНК-Na-Fe в отношении вирусов разных царств и семейств.

**Материалы и методы.** На модели культур клеток, инфицированных вирусами, изучена противовирусная и вирулицидная активность ДНК-Na и ДНК-Na-Fe.

**Результаты и обсуждение.** Показано, что ДНК-Na и ДНК-Na-Fe обладали противовирусной активностью в отношении аденовируса в концентрациях 250–1000 мкг/мл при профилактической и лечебной схеме введения препаратов. Противовирусный эффект не был обнаружен в случае вируса полиомиелита ни при какой схеме введения обоих препаратов. ДНК-Na и ДНК-Na-Fe обладали противовирусной активностью в отношении коронавируса при всех схемах введения. ЭК<sub>50</sub> для ДНК-Na – ~ 2500 мкг/мл, для ДНК-Na-Fe – ~ 1000 мкг/мл. В клетках, обработанных ДНК-Na-Fe, обнаружена секреция цитокинов: провоспалительных – ИЛ-1β, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-18, ИФН-α, ИФН-γ и противовоспалительных – ИЛ-4, ИЛ-10, антагониста рецептора ИЛ-1. Очевидно, что ДНК-Na и ДНК-Na-Fe обладают противовирусным эффектом, однако механизм действия, по-видимому, не связан со специфическим воздействием на репликацию вирусов. Установлено наличие вирулицидной активности препаратов в отношении представителей семейств Coronaviridae, Adenoviridae, Picornaviridae, Retroviridae, Herpesviridae в суспензионном тесте *in vitro* при концентрации 1000 мкг/мл в пределах 1,0–3,0 lg ТЦИД<sub>50</sub>.

**Заключение.** Наличие у ДНК-Na и ДНК-Na-Fe одновременно противовирусной и вирулицидной активности в отношении адено- и коронавируса позволяет рассчитывать на их перспективность в профилактике и лечении ОРВИ.

**Ключевые слова:** противовирусная активность; вирулицидная активность; дезоксирибонуклеат натрия; Coronaviridae; Adenoviridae; Picornaviridae; Retroviridae; Herpesviridae

**Для цитирования:** Носик Д.Н., Калнина Л.Б., Лобач О.А., Чатаева М.С., Бережная Е.В., Бочкова М.С., Киселева И.А., Селимова Л.М., Носик Н.Н. Противовирусная и вирулицидная активность дезоксирибонуклеата натрия и его комплекса с железом в отношении вирусов разных царств и семейств. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(6): 506-515. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-148>

**Для корреспонденции:** Лобач Ольга Александровна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории противовирусных и дезинфекционных средств Института вирусологии имени Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи», 123098, г. Москва, Россия. E-mail: victoriola@yandex.ru

**Участие авторов.** Все авторы сделали равный вклад в подготовку публикации.

**Финансирование.** Исследование выполнено за счет государственного бюджета.

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

Поступила 29.10.2022  
Принята в печать 10.12.2022  
Опубликована 30.12.2022

## ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-148>

# Antiviral and virucidal activity of sodium deoxyribonucleate and its complex with iron against viruses of different kingdoms and families

Dmitry N. Nosik, Lyudmila B. Kalnina, Olga A. Lobach, Marina S. Chataeva, Elena V. Berezhnaya, Marina S. Bochkova, Irina A. Kiseleva, Lyudmila M. Selimova, Nikolai N. Nosik

D.I. Ivanovsky Institute of Virology of National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia

**Introduction.** The urgent problem of modern medicine is the fight against acute respiratory viral infections (ARVI). To combat ARVI, drugs of wide antiviral potency are needed, as well as immunomodulating drugs. Such antiviral and immunomodulatory effects has sodium deoxyribonucleate (DNA-Na) and its complex with iron (DNA-Na-Fe) developed on the basis of double-stranded DNA of natural origin.

**Aim of the study:** To assess antiviral and virucidal activity of DNA-Na and DNA-Na-Fe against viruses of different kingdoms and families.

**Materials and methods.** Antiviral and virucidal activity of DNA-Na and DNA-Na-Fe was assessed in cell cultures infected with viruses.

**Results and discussion.** DNA-Na and DNA-Na-Fe had antiviral activity against adenovirus at concentrations of 250–1000 mcg/ml. Antiviral effect of both drugs was not detected in case of poliovirus. DNA-Na and DNA-Na-Fe had antiviral activity against coronavirus in all administration schemes.  $EC_{50}$  for DNA-Na ~ 2500 mcg/ml, for DNA-Na-Fe ~ 1000 mcg/ml. In cells treated with DNA-Na-Fe, secretion of following pro-inflammatory cytokines was detected: Interleukin (IL) 1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-18, interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), IFN- $\gamma$ , as well as anti-inflammatory cytokines: IL-4, IL-10, antagonist of IL-1 receptor. Evidently, DNA-Na and DNA-Na-Fe have antiviral effect, but mechanism of action does not seem to be associated with specific effect on viral replication. Presence of virucidal activity of drugs against representatives of Coronaviridae, Adenoviridae, Picornaviridae, Retroviridae, Herpesviridae *in vitro* test in range of 1.0–3.0 lg TCID<sub>50</sub> was identified.

**Conclusion.** Presence of simultaneous antiviral and virucidal activity of DNA-Na and DNA-Na-Fe against adenovirus and coronaviruses shows their prospects for prevention and treatment of ARVI.

**Keywords:** *antiviral activity; virucidal activity; sodium deoxyribonucleate; Coronaviridae; Adenoviridae; Picornaviridae; Retroviridae; Herpesviridae*

**For citation:** Nosik D.N., Kalnina L.B., Lobach O.A., Chataeva M.S., Berezhnaya E.V., Bochkova M.S., Kiseleva I.A., Selimova L.M., Nosik N.N. Antiviral and virucidal activity of sodium deoxyribonucleate and its complex with iron against viruses of different kingdoms and families. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(6): 506-515 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-148>

**For correspondence:** Olga A. Lobach, PhD (Biol.), Senior Researcher at the Laboratory of Antivirals and Disinfectants, D.I. Ivanovsky Institute of Virology of National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia. E-mail: [victoriola@yandex.ru](mailto:victoriola@yandex.ru)

**Information about the authors:**

Nosik D.N., <https://orcid.org/0000-0001-5757-5671>

Kalnina L.B., <https://orcid.org/0000-0002-2702-8578>

Lobach O.A., <https://orcid.org/0000-0001-9351-6433>

Chataeva M.S., <https://orcid.org/0000-0002-5379-2406>

Berezhnaya E.V., <https://orcid.org/0000-0002-1551-718X>

Bochkova M.S., <https://orcid.org/0000-0001-9295-8379>

Kiseleva I.A., <https://orcid.org/0000-0003-3693-6081>

Selimova L.M., <https://orcid.org/0000-0003-3709-770X>

Nosik N.N., <https://orcid.org/0000-0003-1943-6536>

**Contribution.** All authors have made an equal contribution to the preparation of the publication.

**Funding.** The research was funded by the state budget.

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

Received 29 October 2022  
Accepted 10 December 2022  
Published 30 December 2022

## Введение

Актуальнейшей проблемой современной медицины является борьба с острыми респираторными вирусными инфекциями (ОРВИ). Эта группа заболеваний, к сожалению, хорошо известна миллионам жителей нашей страны. Среди возбудителей ОРВИ – вирусы гриппа, аденовирусы, риновирусы, коронавирусы.

Представители последнего семейства – Coronaviridae – HCoV-229E, -OC43, -NL63 и -HKU1, HCoV-229E, круглогодично присутствуют в структуре ОРВИ. Однако печально известными в начале XXI в. стали три других вируса – SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2, вызывающие тяжёлые пневмонии, часто со смертельным исходом [1, 2].

Для борьбы с ОРВИ необходимы лекарства широкого противовирусного спектра действия, а также средства, повышающие защитные функции иммунного ответа. Подобным эффектом – противовирусным и иммуномодулирующим – обладают препарат дезоксирибонуклеата натрия (ДНК-Na) и его комплекс с железом (ДНК-Na-Fe), созданные на основе двухнитевой ДНК природного происхождения.

Показана их эффективность в отношении РНК- и ДНК-содержащих вирусов: вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вирусов гриппа, вирусов семейства герпеса, вируса японского энцефалита [3–5]. В то же время нами не обнаружена активность в отношении вируса энцефаломиокардита мышей, у вириона которого нет липидной оболочки.

Помимо антивирусных свойств, у ДНК-Na возможно наличие вирулицидных свойств – действие на вирусные частицы, находящиеся вне клетки. Данные об этом, а также информация о противовирусных свойствах ДНК-Na в отношении представителей семейств Coronaviridae, Adenoviridae, Picornaviridae в доступной нам литературе не обнаружены. Поэтому целью исследования было изучение противовирусной активности ДНК-Na и его комплекса с железом в отношении вышеназванных семейств вирусов, а также вирулицидной эффективности в отношении этих вирусов и представителей семейств Retroviridae и Herpesviridae.

## Материалы и методы

Исследования эффективности действия препаратов проводились на модели клеток, инфицированных вирусами. Для накопления вирусов использовали 50-миллилитровые культуральные флаконы. При определении инфекционных титров противовирусного и вирулицидного действия использовали 96-луночные культуральные планшеты. Каждая экспериментальная точка включала по четыре повтора.

*Вирус полиомиелита типа 1, вакцинный штамм*, получен из ГУ НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова РАМН. Титр вируса 6,5 lg ТЦИД<sub>50</sub>.

*Аденовирус человека, тип 5* получен из Государственной коллекции вирусов Института вирусологии имени Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный

исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» (НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи) Минздрава России. Титр вируса 5,5 lg ТЦИД<sub>50</sub>.

*Коронавирус свиней – вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней (Alphacoronavirus)* получен из Государственной коллекции вирусов Института вирусологии имени Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Титр вируса 6,5 lg ТЦИД<sub>50</sub>.

*ВИЧ 1-го типа (ВИЧ-1)*. В качестве источника ВИЧ использовали штамм ВИЧ-1<sub>899A</sub> из коллекции штаммов ВИЧ Института вирусологии имени Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Титр вируса 7,0 lg ТЦИД<sub>50</sub>.

*Вирус герпеса простого (ВПГ)*. В качестве источника взят ВПГ типа 1 (ВПГ-1), штамм Л2, из Государственной коллекции вирусов «Института вирусологии имени Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Титр вируса 5,0 lg ТЦИД<sub>50</sub>.

*Клетки*. Для работы с вирусом полиомиелита и ВПГ использовали культуру клеток почки зелёных мартышек Vero. Для работы с аденовирусом использовали перевиваемую линию клеток человека HEp-2. Для работы с ВИЧ использовали лимфобластоидные клетки человека MT-4. Для работы с коронавирусом использовали культуру клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ) из коллекции культур клеток Института вирусологии имени Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Суспензионные клетки MT-4 культивировали в среде RPMI 1640 с 10% сыворотки эмбрионов коров (НПП «ПанЭко»), 146 мг L-глутамин (НПП «ПанЭко»), 100 мкг/мл гентамицина (Shandong Weifang Pharmaceutical Factory Co., Ltd., Швейцария), а монослойные культуры СПЭВ, Vero и HEp-2 – в среде DMEM (НПП «ПанЭко») с 10% сыворотки эмбрионов коров (НПП «ПанЭко»), 146 мг L-глутамин (НПП «ПанЭко»), 100 мкг/мл гентамицина (Shandong Weifang Pharmaceutical Factory Co., Ltd., Швейцария). Монослойные культуры клеток пересеивали с помощью смеси раствора Версена с трипсином (НПП «ПанЭко»). Клетки культивировали в 96-луночных пластиковых панелях и культуральных флаконах (SPL Lifesciences, Корея).

*Препараты*: ДНК-Na и ДНК-Na-Fe производства ООО «ФЗ Иммунолекс» в виде коммерческого раствора. Активной субстанцией препарата является биологически активная натриевая соль нативной высокоочищенной низкополимерной дезоксирибонуклеиновой кислоты из молок осетровых рыб, относящейся к классу полимерных соединений с молярной массой 270–500 кД, гиперхромным эффектом свыше 37%, модифицированная ионами железа [3].

*Исследование цитотоксического действия*. Клетки рассеивали на 96-луночные планшеты и добавляли исследуемое средство в различных концентрациях. Инкубировали клетки при 37 °С в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> и 98% влажности. Через 3 дня определяли жизнеспособность

способность с использованием 0,4% раствора трипанового синего и тетразолиевого красителя (метод МТТ) [6, 7]. В случае оценки жизнеспособности и подсчёта количества клеток с использованием трипанового синего клеточную суспензию и краситель смешивали в соотношении 1 : 1, через 5 мин помещали в камеру Горяева и определяли количество живых и мёртвых клеток под световым микроскопом. Процент живых клеток определяли путём умножения на 100 отношения количества живых клеток в 1 мл суспензии к общему количеству клеток в 1 мл суспензии. В опытах, в которых использовали МТТ бромида 3-(4,5-диметилтиазол)-2,5-дифенилтетразолия (Sigma-Aldrich, St. Louis, США), через определённое время для оценки жизнеспособности в каждую лунку добавляли 10 мкл 5 мг/мл МТТ (Sigma-Aldrich, St. Louis, США). После инкубации 2–4 ч при 37 °С вносили в каждую лунку 100 мкл раствора диметилсульфоксида, содержащего 10% додецилсульфата натрия. Затем определяли оптическую плотность (ОП) при 490 нм. Выживаемость клеток рассчитывали по формуле (1):

(ОП опытных лунок – ОП среды) / (ОП контр. лунки – ОП среды) × 100%. (1)

*Исследование противовирусного действия.* К культуре клеток добавляли исследуемое средство по разным схемам: за 1 и 2 ч до инфицирования, одновременно с вирусом, через 1 ч после инфицирования клеток. Множественность инфекции –  $10^{-3}$  ТЦИД<sub>50</sub>/клетка. Инкубировали культуры клеток при 37 °С в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub> и 98% влажности 3–4 дня. Учёт результатов: определение подавления репродукции вируса в клетках с помощью световой микроскопии: исследование цитопатического эффекта вируса (ЦПЭ) [6, 8], как описано выше.

Степень защиты клеток от цитодеструктивного действия вируса определяли по формуле (2):

$$\% \text{ защиты} = \frac{A - B}{K - B} \times 100, \quad (2)$$

где А – число жизнеспособных клеток в опытной группе; В – то же в инфицированной культуре (контроль вируса); К – то же в неинфицированной культуре (контроль клеток).

В качестве препаратов сравнения использовали антиретровирусные препараты: ингибитор обратной транскриптазы ВИЧ ретровир (азидотимидин) (GlaxoSmithKline, Великобритания) и ингибитор протеазы ВИЧ криксиван (индинавир) (Merck Sharp & Dohme B.V., Нидерланды).

*Исследование вирулицидного действия* проводили методом смешивания вирусной суспензии и исследуемого средства (тест *in vitro*) при температуре 20 ± 2 °С, а также на тест-объекте – искусственной коже, где создавали вирусную пленку [8, 9]. В тесте *in vitro* смешивали тест-вирус (в соотношении 1 : 9) с исследуемым средством, инкубировали (согласно схеме исследования), готовили 10-кратные разведения смеси вируса и средства ( $10^{-1}$ – $10^{-8}$ ), а затем вносили в планшеты с культурой неинфицированных клеток. Планшеты инкубировали в CO<sub>2</sub>-термостате при опти-

мальной для данного вируса температуре (34–37 °С) до развития 100% ЦПЭ (3–6 дней). Репродукцию вируса в клетках оценивали методом световой микроскопии по вирусиндуцированному ЦПЭ и окрашиванием клеток с помощью 0,4% раствора трипанового синего и тетразолиевого красителя [6–8], как описано выше.

При испытании на тест-объекте суспензию тест-вируса в объёме 0,2 мл наносили на поверхность тест-объекта и высушивали при температуре 20 ± 2 °С в течение 20–30 мин. Контаминированный вирусом тест-объект протирали тампоном, смоченным исследуемым средством, и оставляли на заданное время для обеззараживания. Контроль – проба, взятая с контаминированной вирусом поверхности, протёртая тампоном, смоченным водой. После истечения времени контакта вируса со средством контаминированную поверхность протирали тампоном, смоченным питательной средой. Аналогичную процедуру проводили с контролем (обработка поверхности без исследуемого средства). Затем проводили титрование тест-вируса на культурах клеток, как описано выше.

*Индукция цитокинов.* Клетки МТ-4 (концентрация 10<sup>6</sup>/мл) инкубировали с ДНК-Na-Fe в концентрации 1000 мкг/мл в культуральной среде RPMI 1640 в течение 1 ч, отмывали (центрифугирование 5 мин при 800 оборотов/мин), добавляли свежую среду RPMI 1640 и инкубировали 12 ч при 37 °С.

*Определение цитокинов.* Определение цитокинов в культуральной жидкости проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов «ИФА-Бест» («Вектор-Бест», Россия) согласно инструкции изготовителя. Результаты учитывали с помощью фотометра Stat Fax-3200 (США) при длине волны 450/630 нм.

*Методы статистической обработки результатов.* Статистический анализ данных описательной статистики и определения коэффициента Стьюдента проводили с помощью программы BioStat 2009, версия 5 (AnalystSoft Inc., США). Уровень значимости α был равен 0,05.

## Результаты

Полученные данные (табл. 1–3) показали, что ДНК-Na и ДНК-Na-Fe в дозах 250–2500 мкг/мл не оказывали цитотоксического действия на клетки Vero, HEp-2 и СПЭВ.

Исследование противовирусного действия ДНК-Na и ДНК-Na-Fe показало (табл. 1), что они обладали противовирусной активностью в отношении аденовируса при всех схемах введения (до инфицирования клеток, одновременно с вирусом) при всех исследованных концентрациях – 250–1000 мкг/мл. Однако ЭК<sub>50</sub> (50% эффективная концентрация) была достигнута только в случае дозы 1000 мкг/мл при применении ДНК-Na-Fe за 2 ч до инфицирования клеток. Индекс селективности (ИС) равен 10.

Противовирусный эффект не был обнаружен в случае вируса полиомиелита ни при какой схеме введения обоих препаратов (табл. 2).

**Таблица 1. Исследование противовирусной активности дезоксирибонуклеата натрия и его комплекса с железом в отношении аденовируса**

**Table 1. Study of antiviral activity of sodium deoxyribonucleate and its complex with iron against adenovirus**

Препарат Agent	Концентрация, мкг/мл Concentration, µg/ml	Токсичность*, % Toxicity*, %	Защита клеток**, % Cell protection**, %		
			за 2 ч до инфицирования 2 h before infection	за 1 ч до инфицирования 1 h before infection	одновременно с инфицированием Simultaneously with infection
ДНК-Na DNA-Na	1000	79,7 ± 0,03	40,6 ± 0,04	38,2 ± 0,03	31,2 ± 0,05
	500	83,0 ± 0,04	36,1 ± 0,03	33,8 ± 0,05	28,3 ± 0,05
	250	87,4 ± 0,04	32,9 ± 0,05	25,9 ± 0,06	23,0 ± 0,06
ДНК-Na-Fe DNA-Na-Fe	1000	82,0 ± 0,03	51,0 ± 0,07	42,9 ± 0,03	37,9 ± 0,04
	500	86,5 ± 0,04	42,0 ± 0,04	34,1 ± 0,04	35,3 ± 0,07
	250	91,4 ± 0,05	33,2 ± 0,04	28,3 ± 0,05	25,9 ± 0,03

**Примечание.** \*По отношению к интактному контролю клеток. \*\*Показатель защиты действия препарата от вируса, выраженный в %, ± стандартное отклонение (по формуле Рида–Менча).

**Note.** \*In relation to intact cell control. \*\*The indicator of drug-induced protection from the virus, expressed in %, ± standard deviation (according to the Reed–Mench formula).

**Таблица 2. Исследование противовирусной активности дезоксирибонуклеата натрия и его комплекса с железом в отношении полиовируса**

**Table 2. Study of antiviral activity of sodium deoxyribonucleate and its complex with iron against poliovirus**

Препарат Agent	Концентрация, мкг/мл Concentration, µg/ml	Токсичность* % Toxicity*, %	Защита клеток**, % Cell protection**, %		
			за 2 ч до инфицирования 2 h before infection	за 1 ч до инфицирования 1 h before infection	одновременно с инфицированием simultaneously with infection
ДНК-Na DNA-Na	1000	81,0 ± 0,03	0	0	0
	500	81,4 ± 0,04	0	0	0
	250	92,5 ± 0,05	0	0	0
ДНК-Na-Fe DNA-Na-Fe	1000	84,2 ± 0,03	0	0	0
	500	90,7 ± 0,04	0	0	0
	250	91,0 ± 0,05	0	0	0

**Примечание.** \*По отношению к интактному контролю клеток. \*\*Показатель защиты действия препарата от вируса, выраженный в %, ± стандартное отклонение (по формуле Рида–Менча).

**Note.** \*In relation to intact cell control. \*\*The indicator of drug-induced protection from the virus, expressed in %, ± standard deviation (according to the Reed–Mench formula).

Исследование противовирусного действия препаратов показало (табл. 3), что оба препарата обладали противовирусной активностью в отношении коронавируса при всех схемах введения (до инфицирования клеток, одновременно с вирусом, после инфицирования клеток) при всех исследованных концентрациях – 100–2500 мкг/мл. ЭК<sub>50</sub> для ДНК-Na составила ~2500 мкг/мл, для ДНК-Na-Fe – ~1000 мкг/мл. Уровень противовирусной защиты был практически одинаковым при всех схемах введения – и профилактической, и лечебной. ИС равен 4,6 и 10 соответственно.

С целью изучения механизма противовирусного действия препаратов исследовали секрецию цитокинов клетками МТ-4 после обработки ДНК-Na-Fe.

После инкубации с препаратом методом ИФА обнаружены провоспалительные цитокины – интерлейкин (ИЛ) 1β (70 ± 0,014 пкг/мл), ИЛ-2 (2 ± 0,012 пкг/мл), ИЛ-6 (6 ± 0,017 пкг/мл), ИЛ-18 (11 ± 0,021 пкг/мл), интерферон (ИФН) α (37 ± 0,009 пкг/мл), ИФН-γ (24 ± 0,017 пкг/мл) и противовоспалительные цитоки-

ны – ИЛ-4 (2 ± 0,012 пкг/мл), ИЛ-10 (34 ± 0,011 пкг/мл), антагонист рецептора ИЛ-1 (12 ± 0,016 пкг/мл). В культуральной жидкости клеток, не обработанных препаратом, цитокины не обнаружены.

Исследование вирулицидной активности препаратов (табл. 4) показало наличие определенного эффекта в случае всех пяти вирусов при исследовании в суспензионном тесте *in vitro* при концентрации 1000 мкг/мл в пределах 1,0–3,0 lg ТЦИД<sub>50</sub>. Наибольшая вирусная редукция обнаружена в случае коронавируса при времени обеззараживания 60 мин – 3,0 lg ТЦИД<sub>50</sub>.

При уменьшении концентрации препаратов до 500 мкг/мл уровень редукции коронавируса оставался на прежнем уровне, но снижался при уменьшении концентрации до 250 мкг/мл или уменьшении времени обеззараживания до 15 мин (табл. 5). В случае применения способа обеззараживания методом протирания отмечено снижение исходного титра вируса на 4,0–5,0 lg ТЦИД<sub>50</sub>. Согласно нормативным документам (Р 4.2.3676-20), снижение титра тест-ви-

**Таблица 3. Исследование противовирусной активности дезоксирибонуклеата натрия и его комплекса с железом в отношении коронавируса****Table 3. Study of antiviral activity of sodium deoxyribonucleate and its complex with iron against coronavirus**

Препарат Agent	Концентрация, мкг/мл Concentration, µg/ml	Токсичность* % Toxicity*, %	Защита клеток**, % Cell protection**, %		
			за 2 ч до инфицирования 2 h before infection	за 1 ч до инфицирования 1 h before infection	одновременно с инфицированием simultaneously with infection
ДНК-Na DNA-Na	2500	85,3 ± 0,04	60,2 ± 0,07	57,0 ± 0,06	56,2 ± 0,08
	1000	86,5 ± 0,02	43,2 ± 0,05	40,9 ± 0,07	40,0 ± 0,03
	500	87,8 ± 0,03	40,7 ± 0,03	37,9 ± 0,03	37,9 ± 0,02
	250	96,0 ± 0,07	36,9 ± 0,02	36,1 ± 0,03	35,6 ± 0,04
	100	97,6 ± 0,05	34,0 ± 0,04	33,5 ± 0,03	33,1 ± 0,06
ДНК-Na-Fe DNA-Na-Fe	1000	92,0 ± 0,03	57,4 ± 0,03	55,3 ± 0,05	53,7 ± 0,05
	500	97,5 ± 0,04	44,2 ± 0,05	43,0 ± 0,04	37,3 ± 0,03
	250	98,4 ± 0,08	41,5 ± 0,06	39,8 ± 0,02	33,3 ± 0,06
	100	99,5 ± 0,02	40,7 ± 0,04	39,4 ± 0,05	32,9 ± 0,07
Ретровир Retrovir	2,5	84,0 ± 0,03	Н.и. / N.i.	26,8 ± 0,05	Н.и. / N.i.
	0,3	91,5 ± 0,05	Н.и. / N.i.	23,1 ± 0,04	Н.и. / N.i.
Криксиван Crixivan	2,5	80,2 ± 0,06	Н.и. / N.i.	27,7 ± 0,06	Н.и. / N.i.
	0,6	85,7 ± 0,04	Н.и. / N.i.	23,7 ± 0,02	Н.и. / N.i.

**Примечание.** Н.и. – не исследовали. \*По отношению к интактному контролю клеток. \*\*Показатель защиты действия препарата от вируса, выраженный в %, ± стандартное отклонение (по формуле Рида–Менча).

**Note.** N.i. – not investigated. \*In relation to intact cell control. \*\*The indicator of drug-induced protection from the virus, expressed in %, ± standard deviation (according to the Reed–Mench formula).

**Таблица 4. Исследование вирулицидной активности препаратов в концентрации 1000 мкг/мл в отношении аденовируса, полиовируса, коронавируса, вируса иммунодефицита человека, вируса простого герпеса в суспензионном опыте (смешивание вируса и средства 1 : 9) *in vitro*****Table 4. Study of the virucidal activity of drugs in concentration 1000 µg/ml against adenovirus, poliovirus, coronavirus, human immunodeficiency virus, herpes simplex virus in suspension (virus and agent mixed 1 : 9) *in vitro***

Препарат Agent	Время обеззараживания, мин Decontamination time, min	Степень ингибирования, lg ТЦИД <sub>50</sub> * Degree of inhibition, lg TCID <sub>50</sub> *				
		аденовирус Adenovirus	полиовирус Poliovirus	коронавирус Coronavirus	ВИЧ-1 HIV-1	ВПГ-1 HSV-1
ДНК-Na DNA-Na	60	1,3 ± 0,04	1,6 ± 0,06	3,0 ± 0,03	1,3 ± 0,06	2,0 ± 0,03
	15	1,0 ± 0,05	1,0 ± 0,05	2,0 ± 0,06	1,0 ± 0,04	1,7 ± 0,06
ДНК-Na-Fe DNA-Na-Fe	60	2,0 ± 0,05	2,3 ± 0,04	2,0 ± 0,04	1,0 ± 0,06	1,7 ± 0,04
	15	1,5 ± 0,03	2,0 ± 0,03	1,9 ± 0,05	1,0 ± 0,05	1,7 ± 0,05

**Примечание.** \*Степень ингибирования вируса, выраженная в lg ТЦИД<sub>50</sub>, ± стандартное отклонение (по формуле Рида–Менча).

**Note.** \*The degree of inhibition of the virus, expressed in lg TCID<sub>50</sub>, ± standard deviation (according to the Reed–Mench formula).

руса на 4,0 lg ТЦИД<sub>50</sub> и более позволяет считать средство обладающим вирулицидной активностью [9].

### Обсуждение

Более 80% всех инфекционных заболеваний человека приходится на вирусные инфекции, многие из которых носят эпидемический характер. Поэтому человечество всегда стремилось воздействовать на болезнетворного возбудителя, даже не зная его природу.

Принципиально способы воздействия веществ на вирусы можно условно разделить на действие вне клетки и внутри клетки. Препараты, действующие

на вирус вне клетки, называют вирулицидными, а действующие внутри клетки, – противовирусными. Средства, обладающие одновременно и противовирусной, и вирулицидной активностью, естественно, представляют особый интерес.

В качестве объекта исследования были выбраны препараты ДНК-Na и ДНК-Na-Fe, ранее показавшие свою эффективность в отношении РНК- и ДНК-содержащих вирусов [3, 4].

Обнаружена противовирусная активность ДНК-Na и ДНК-Na-Fe в отношении аденовируса. Полученные результаты позволяют отметить, что степень

**Таблица 5. Исследование вирулицидной активности препаратов при обработке тест-объектов, инфицированных коронавирусом**  
**Table 5. Study of the virucidal activity of drugs in the treatment of test objects infected with coronavirus**

Препарат Agent	Концентрация, мкг/мл Concentration, µg/ml	Способ применения Method of application			
		смешивание вируса и средства 1 : 9 <i>in vitro</i> Virus and agent mixed 1 : 9 <i>in vitro</i>		протираание искусственной кожи Wiping an artificial leather	
		время обеззараживания, мин decontamination time, min	степень ингибирования, lg ТЦИД <sub>50</sub> degree of inhibition, lg TCID <sub>50</sub>	время обеззараживания, мин decontamination time, min	степень ингибирования, lg ТЦИД <sub>50</sub> * degree of inhibition, lg TCID <sub>50</sub> *
ДНК-Na DNA-Na	500	60	3,0 ± 0,03	15	5,0 ± 0,02
	250		2,3 ± 0,02		5,0 ± 0,05
	500	15	1,9 ± 0,06	5	4,3 ± 0,03
	250		1,9 ± 0,04		4,0 ± 0,04
ДНК-Na-Fe DNA-Na-Fe	500	60	3,0 ± 0,06	15	5,0 ± 0,05
	250		2,1 ± 0,04		5,0 ± 0,02
	500	15	2,3 ± 0,02	5	5,0 ± 0,03
	250		2,0 ± 0,03		4,0 ± 0,05

**Примечание.** \*Степень ингибирования вируса, выраженная в lg ТЦИД<sub>50</sub>, ± стандартное отклонение (по формуле Рида–Менча).

**Note.** \*The degree of inhibition of the virus, expressed in lg TCID<sub>50</sub>, ± standard deviation (according to the Reed–Mench formula).

защиты при воздействии ДНК-Na колебалась в пределах 25–40%. При этом наблюдалась зависимость эффективности от дозы и времени применения средства. Несмотря на небольшой разброс данных, можно отметить, что профилактическое применение за 1–2 ч до заражения было эффективнее, чем одновременное введение препарата с инфицированием клеток.

Однако в отношении полиовируса антивирусный эффект ДНК-Na и ДНК-Na-Fe не был обнаружен ни в одной из схем введения.

В цикле репродукции коронавируса есть этапы, связанные с функционированием фермента вируса полимеразы и использованием вирусом протеаз клетки TMPRSS2 и 3CLpro. Поэтому китайские специалисты, первые столкнувшиеся с эпидемией, попробовали применить различные ингибиторы вирусных ферментов [10]. В частности, было предложено использовать средства, которые применяют при лечении ВИЧ-инфекции, – препараты, ингибирующие ферменты ВИЧ.

В связи с этим нами были использованы в качестве референс-препаратов антиретровирусные средства ретровир и криксиван. Полученные результаты показали незначительную активность данных средств, что свидетельствует не в пользу их перспективности для ингибирования коронавируса.

Напротив, исследованные препараты ДНК-Na и ДНК-Na-Fe, созданные на основе двухспиральной ДНК природного происхождения, обладают противовирусной активностью в отношении представителя семейства Coronaviridae – вируса трансмиссивного гастроэнтерита. ДНК-Na-Fe более эффективен, чем ДНК-Na. В отличие от аденовируса, не наблюдается разницы в применении средства за 2 или 1 ч до инфицирования, одновременно или на 1 ч позд-

нее. Следует отметить, что и при внесении препарата через 1 ч после инфекции сохранялась противовирусная активность.

Исследование вирулицидной активности препаратов на модели РНК- и ДНК-содержащих вирусов, оболочечных и безоболочечных, выявило вирулицидную активность препаратов. Наблюдается ингибирование инфекционности на 1–2 lg ТЦИД<sub>50</sub>. Наиболее чувствительным к действию препаратов оказался коронавирус. Речь идет о тесте *in vitro*. При обработке поверхности, контаминированной вирусом, степень ингибирования достигала 4–5 lg ТЦИД<sub>50</sub>, что говорит о вирулицидной активности препаратов.

Данные вирусы принадлежат к разным вирусным семействам: Coronaviridae, Adenoviridae, Picornaviridae, и по классификации Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) общий у них только один раздел – группа. По остальным градациям – надцарство (realm), царство, (kingdom), тип, класс, порядок и семейство – они не совпадают.

Ключевым параметром для разделения вирусов на таксоны является тип их генетического материала – нуклеиновая кислота (НК): РНК- и ДНК-содержащие вирусы. Другая важная характеристика – наличие липидной оболочки у вириона, а также количество цепочек (нитей) НК.

Два из исследованных на наличие противовирусной активности вирусов являются одноплетчатыми РНК-содержащими – вирус полиомиелита и коронавирус. Аденовирус – ДНК-содержащий вирус с двумя цепями НК. Полио- и аденовирус объединяет отсутствие липидной оболочки у вирусной частицы. Самый мелкий из них – полиовирус – 25–30 нм. Коронавирус и аденовирус крупнее – 70–90 и 120–160 нм соответственно.

**Таблица 6. Противовирусная активность комплекса дезоксирибонуклеата натрия с железом в отношении вирусов разных семейств**  
**Table 6. Antiviral activity of the complex of sodium deoxyribonucleate with iron against viruses of different families**

Вирус Virus	Строение вириона Virion structure	Наличие оболочки The presence of the envelope	Размер вириона, нм Virion size, nm	Противовирусная активность* Antiviral activity*
Вирус герпеса простого Herpes simplex virus	Сферическая форма, линейная ДНК (2 цепочки) Spherical shape, linear DNA (double-stranded)	Оболочка липопротеидная Lipoprotein envelope	120–200	Есть Yes
Цитомегаловирус Cytomegalovirus	Сферическая форма, линейная ДНК (2 цепочки) Spherical shape, linear DNA (double-stranded)	Оболочка липопротеидная Lipoprotein envelope	120–200	Есть Yes
Вирус гриппа Influenza virus	Сферическая форма, РНК (1 цепочка), минус-нить, сегментированный Spherical shape, RNA (single-stranded), minus-strand, segmented	Оболочка липопротеидная Lipoprotein envelope	100	Есть Yes
Вирус японского энцефалита Japanese encephalitis virus	РНК (1 цепочка), плюс-нить, несегментированный RNA (single-stranded), plus-strand, unsegmented	Оболочка липопротеидная Lipoprotein envelope	40–70	Есть Yes
Вирус иммунодефицита человека Human immunodeficiency virus	Сферическая форма, 2 молекулы РНК (1 цепочка), плюс-нить, обратная транскрипция Spherical shape, 2 RNA molecules (single-stranded), plus-strand, reverse transcription	Оболочка липопротеидная Lipoprotein envelope	80–120	Есть Yes
Вирус энцефаломиокардита Encephalomyocarditis virus	Икосаэдрическая форма, РНК (1 цепочка), плюс-нить, несегментированный Icosahedral shape, RNA (single-stranded), plus-strand unsegmented	Нет оболочки No envelope	30	Нет No
Аденовирус Adenovirus	Икосаэдрическая форма, линейная ДНК (2 цепочки) Icosahedral shape, linear DNA (double-stranded)	Нет оболочки No envelope	70–90	Есть Yes
Полиовирус Poliovirus	Сферическая форма, РНК (1 цепочка), плюс-нить Spherical shape, RNA (single-stranded), plus-strand	Нет оболочки No envelope	25–30	Нет No
Коронавирус Coronavirus	Сферическая форма, РНК (1 цепочка), плюс-нить Spherical shape, RNA (single-stranded), plus-strand	Оболочка липопротеидная Lipoprotein envelope	120–160	Есть Yes

Ранее нами была установлена противовирусная активность ДНК-Na-Fe в отношении ВИЧ, ВПГ, цитомегаловируса, вирусов гриппа человека и птиц, вируса японского энцефалита [3, 4]. Однако не было обнаружено ингибирования репродукции вируса энцефаломиокардита мышей, который так же, как и полиовирус, является мелким безоболочечным вирусом из семейства *Ricovnaviridae* (табл. 6).

Пока остаётся неясным, почему исследуемые препараты избирательно не обладают противовирусным действием в отношении вируса полиомиелита и вируса энцефаломиокардита мышей, относящихся к семейству *Ricovnaviridae*. При этом их вирулицидное действие такое же, как и на другие исследуемые вирусы. Сам факт заслуживает дальнейшего внимания и исследования.

В поисках механизма противовирусного действия ДНК-Na ранее мы обнаружили индукцию в клетках продуктов амплификации ИЛ-1 $\alpha$ , фактора некроза опухоли- $\alpha$  и  $\beta$ , а также низкомолекулярных факторов (< 3 кДа) в ответ на воздействие ДНК-Na-Fe [11]. В настоящем исследовании установили секрецию цитокинов: провоспалительных – ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-18, ИФН- $\alpha$  и - $\gamma$  и противовоспалительных – ИЛ-4, ИЛ-10, антагониста рецептора ИЛ-1.

Секреция цитокинов также обнаружена А.М. Нананди и соавт. [12] при применении синтетических ДНК-олигонуклеотидов с высоким содержанием CpG (CpG – сокращение для цитозина и гуанина, разделённых фосфатом, связывающим эти два нуклеотида в структуре ДНК) для защиты от ВПГ-2 при вагинальной герпесвирусной инфекции у мышей.

Авторы объясняют 80% защиту животных от смертельной инфекции именно продукцией ИФН- $\gamma$ , ИЛ-12, ИЛ-18 и хемокина RANTES клетками слизистой половых путей мышей под воздействием ДНК-олигонуклеотидов.

Наличие в клетках Toll-подобных рецепторов (TLR), и в особенности TLR9, указывает на возможность лиганд-рецепторного взаимодействия TLR9 [13, 14] и ДНК-На. В основе этого взаимодействия лежит сложный сигнальный путь, в конечном счёте приводящий к активации нескольких транскрипционных факторов, включая NF- $\kappa$ B, AP-1, IRF-7, что, в свою очередь, активирует продукцию провоспалительных цитокинов [5, 15].

При изучении иммуномодулирующей активности ДНК-На-Fe в системе *in vitro* при использовании в качестве модели неопластической клеточной линии МТ-4, представляющей собой CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты человека, трансформированные Т-лимфотропным вирусом человека 1-го типа, обнаружено снижение количества клеток, содержащих такие маркеры активации, как CD28, CD38, CD62L, CD69 и HLA-DR [16].

Белок CD62L, известный также как L-селектин, участвует в инфильтрации активированных Т-лимфоцитов в различные органы и ткани, где с их участием возможно развитие многих биологических процессов, в том числе и патологических. Вероятно, благодаря такому действию ДНК-На-Fe снижается распространение клеток, содержащих интегрированный патогенетический материал, по органам и тканям, что приводит к замедлению генерализации инфекционного процесса. В то же время ДНК-На-Fe не влиял на экспрессию интегринов  $\beta$ 1 (CD29),  $\alpha$ 4 (CD49d) и рецептора интегринов ICAM-1 (CD54) [17].

Очевидно, что ДНК-На и ДНК-На-Fe обладают противовирусным эффектом, однако механизм действия, по-видимому, не связан со специфическим воздействием на репликацию вирусов. Также оба препарата обладают иммуномодулирующим действием и способны снижать активацию клеток. Это свойство может быть особенно полезно при лечении цитокинового шторма, характерного для COVID-19, а также нормализации иммунного ответа при ВИЧ-инфекции. Снижение уровня активации клеток иммунной системы к тому же снижает риск развития оппортунистических инфекций.

Исследование непосредственного действия (вне клетки) ДНК-На и ДНК-На-Fe на все исследованные вирусы (полиовирус, аденовирус, коронавирус, ВИЧ-1, ВПГ-1) показало наличие определённого вирулицидного эффекта. Особенно это интересно в случае вируса полиомиелита, у которого не обнаружен противовирусный эффект.

Таким образом, можно предположить, что при непосредственном контакте как ДНК-На, так и ДНК-На-Fe и вируса происходит некое воздействие на вирионы, приводящее к снижению их инфекционной активности.

Подобный вирулицидный эффект обнаружен в отношении ВПГ при использовании олигонуклеотида

ISIS 5652 в микромолярных количествах (1–2 мкМ) при 37 °C [18]. Авторы предполагают, что GT-олигонуклеотид индуцирует конформационные изменения в гликопротеине В ВПГ, который играет важную роль в прикреплении вируса к клетке и проникновении в неё. Отмечено исчезновение вирулицидного эффекта при 4 °C.

Следует отметить, что вирулицидный эффект в 2–3 lg ТЦИД<sub>50</sub> на практике означает снижение урожая вируса в 100–1000 раз.

Наличие у ДНК-На и ДНК-На-Fe одновременно и противовирусной, и вирулицидной активности в отношении адено- и коронавирусов позволяет рассчитывать на их перспективность в профилактическом и лечебном применении. Нанесённый на слизистые оболочки препарат будет воздействовать на разные стадии вирусного цикла, начиная с этапа их прикрепления к клеткам организма-хозяина.

Помимо корона- и аденовирусов, препараты ДНК-На и ДНК-На-Fe обладают, как нами было показано ранее, противовирусным действием в отношении вирусов гриппа человека и птиц [3, 4]. Поэтому можно предположить, что данные средства будут эффективны в отношении всех основных возбудителей ОРВИ.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013.
2. Временные методические рекомендации. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 15; 2022. Available at: [https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/059/392/original/BMP\\_COVID-19\\_V15.pdf](https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/059/392/original/BMP_COVID-19_V15.pdf)
3. Носик Д.Н., Каплина Э.Н. *Ферровир. Опыт применения в экспериментальной и лечебной практике*. М.: Научная книга; 2005.
4. Носик Д.Н., Носик Н.Н., Каплина Э.Н., Калнина Л.Б., Киселева И.А., Кондрашина Н.Г. и др. Активность препарата «Ферровир» в отношении РНК- и ДНК-вирусов. *Вопросы вирусологии*. 2002; 47(3): 21–3.
5. Беседнова Н.Н., Макаренко И.Д., Федянина Л.Н., Авдеева Ж.И., Крыжановский С.П., Кузнецова Т.А. и др. Дезоксирибонуклеиновая кислота про- и зукариот в профилактике и терапии инфекционных болезней. *Антибиотики и химиотерапия*. 2018; 63(5-6): 52–67.
6. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. М.; 2012.
7. Mosmann T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 1983; 65(1-2): 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
8. Носик Д.Н., Носик Н.Н. *Борьба с вирусами. Дезинфекция*. М.: МИА; 2018.
9. Р 4.2.3676-20. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности. М.; 2020.
10. Handbook of COVID-19 Prevention and Treatment. The First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine; 2020. Available at: [https://globalce.org/downloads/Handbook\\_of\\_COVID\\_19\\_Prevention\\_en\\_Mobile.pdf](https://globalce.org/downloads/Handbook_of_COVID_19_Prevention_en_Mobile.pdf)
11. Nosik D., Kaplina E., Nosik N., Kalnina L., Tsutsumi R., Miura Y., et al. A Fe3+/DNA Complex induces an anti-human immunodeficiency virus factor(s) in CD4+ lymphocyte cell lines. *Acta Virol*. 1999; 43(1): 25–30.
12. Harandi A.M., Eriksson K., Holmgren J. A protective role of locally administered immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide in a mouse model of genital herpes infection. *J. Virol*. 2003; 77(2): 953–62. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.2.953-962.2003>

13. Iwasaki A., Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol. J.* 2004; 5(10): 987–95. <https://doi.org/10.1038/ni1112>
14. Kumagai Y., Takeuchi O., Akira S. Pathogen recognition by innate receptors. *J. Infect. Chemother.* 2008; 14(2): 86–92. <https://doi.org/10.1007/s10156-008-0596-1>
15. Sauter M.M., Gauger J.J., Brandt C.R. Oligonucleotides designed to inhibit TLR9 block Herpes simplex virus type 1 infection at multiple steps. *Antiviral. Res.* 2014; 109: 83–96. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.06.015>
16. Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Каплина Э.Н., Носик Д.Н. Влияние ферровира на экспрессию поверхностных маркеров активации клетками неопластической линии МТ-4. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62(6): 355–9. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-6-355-359>
17. Калнина Л.Б., Селимова Л.М., Каплина Э.Н., Носик Д.Н. Экспрессия интегринов  $\beta 1$ ,  $\alpha 4$  и молекулы клеточной адгезии ICAM-1 в присутствии дезоксирибонуклеата натрия с железом комплекса (ДНК-Na-Fe) клетками МТ-4, трансформированными Т-лимфотропным вирусом человека 1 типа (Retroviridae: Orthoretrovirinae: Deltaretrovirus: Human T-lymphotropic virus type 1). *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(3): 227–32. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-57>
18. Shogan B., Kruse L., Mulamba G., Hu A., Coen D. Virucidal activity of a GT-Rich oligonucleotide against herpes simplex virus mediated by glycoprotein B. *J. Virol.* 2006; 80(10): 4740–7. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.10.4740-4747.2006>
6. Mironov A.N., Bunatyan N.D. *Guidelines for Conducting Preclinical Studies of Medicinal Products [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv]*. Moscow; 2012. (in Russian)
7. Mosmann T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 1983; 65(1-2): 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
8. Nosik D.N., Nosik N.N. *Fight against viruses. Disinfection [Bor'ba s virusami. Dezinfektsiya]*. Moscow: MIA; 2018. (In Russian)
9. Guidelines R 4.2.3676-20. Methods of laboratory research and testing of disinfectants to evaluate their effectiveness and security. Moscow; 2020. (in Russian)
10. Handbook of COVID-19 Prevention and Treatment. The First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine; 2020. Available at: [https://globalce.org/downloads/Handbook\\_of\\_COVID\\_19\\_Prevention\\_en\\_Mobile.pdf](https://globalce.org/downloads/Handbook_of_COVID_19_Prevention_en_Mobile.pdf)
11. Nosik D., Kaplina E., Nosik N., Kalnina L., Tsutsumi R., Miura Y., et al. A Fe3+/DNA Complex induces an anti-human immunodeficiency virus factor(s) in CD4+ lymphocyte cell lines. *Acta Virol.* 1999; 43(1): 25–30.
12. Harandi A.M., Eriksson K., Holmgren J. A protective role of locally administered immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotide in a mouse model of genital herpes infection. *J. Virol.* 2003; 77(2): 953–62. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.2.953-962.2003>
13. Iwasaki A., Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol. J.* 2004; 5(10): 987–95. <https://doi.org/10.1038/ni1112>
14. Kumagai Y., Takeuchi O., Akira S. Pathogen recognition by innate receptors. *J. Infect. Chemother.* 2008; 14(2): 86–92. <https://doi.org/10.1007/s10156-008-0596-1>
15. Sauter M.M., Gauger J.J., Brandt C.R. Oligonucleotides designed to inhibit TLR9 block Herpes simplex virus type 1 infection at multiple steps. *Antiviral. Res.* 2014; 109: 83–96. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.06.015>
16. Selimova L.M., Kalnina L.B., Kaplina E.N., Nosik D.N. The effect of Ferrovir on to expression of surface markers of activation by cells neoplastic line MT-4. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2017; 62(6): 355–9. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-6-355-359> (in Russian)
17. Kalnina L.B., Selimova L.M., Kaplina E.N., Nosik D.N. Expression of integrins  $\beta 1$ ,  $\alpha 4$  and cell adhesion molecule ICAM-1 in the presence of sodium deoxyribonucleate with Ferrum complex (DNA-Na-Fe) by MT-4 cells transformed by human T-lymphotropic virus type 1 (Retroviridae: orthoretrovirinae: deltaretrovirus: human T-lymphotropic virus type 1). *Voprosy virusologii.* 2021; 66(3): 227–32. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-57> (in Russian)
18. Shogan B., Kruse L., Mulamba G., Hu A., Coen D. Virucidal activity of a GT-Rich oligonucleotide against herpes simplex virus mediated by glycoprotein B. *J. Virol.* 2006; 80(10): 4740–7. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.10.4740-4747.2006>

## REFERENCES

1. L'vov D.K., ed. *Guidance to Virology: Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii: Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
2. Temporary guidelines. Prevention, diagnosis, and treatment of novel coronavirus infection (COVID-19). Version 15; 2022. Available at: [https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/059/392/original/BMP\\_COVID-19\\_V15.pdf](https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/059/392/original/BMP_COVID-19_V15.pdf) (in Russian)
3. Nosik D.N., Kaplina E.N. *Ferrovir. Experience of Application in Experimental and Medical Practice [Ferrovir. Opyt primeneniya v eksperimental'noy i lechebnoy praktike]*. Moscow: Nauchnaya kniga; 2005. (in Russian)
4. Nosik D.N., Nosik N.N., Kaplina E.N., Kalnina L.B., Kiseleva I.A., Kondrashina N.G., et al. Activity of «Ferrovir» preparation towards RNA and DNA viruses. *Voprosy virusologii.* 2002; 47(3): 21–3. (in Russian)
5. Besednova N.N., Makarenkova I.D., Fedyanina L.N., Avdeeva Zh.I., Kryzhanovskiy S.P., Kuznetsova T.A., et al. Prokaryotic and eukaryotic DNA in prevention and treatment of infectious diseases. *Antibiotiki i khimioterapiya.* 2018; 63(5-6): 52–67. (in Russian)

## НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-149>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



## Адьювантное действие дисперсного фуллера C<sub>60</sub> на иммунный ответ против конструкций, имитирующих аминокислотные и нуклеотидные последовательности неструктурного белка NS5B вируса гепатита С

Масалова О.В.<sup>1</sup>, Леснова Е.И.<sup>1</sup>, Андреев С.М.<sup>2</sup>, Шершакова Н.Н.<sup>2</sup>, Козлов В.В.<sup>1</sup>,  
Пермякова К.Ю.<sup>1,3</sup>, Демидова Н.А.<sup>1</sup>, Валуев-Эллистон В.Т.<sup>4</sup>, Турецкий Е.А.<sup>2,5</sup>, Иванов А.В.<sup>4</sup>,  
Николаева Т.Н.<sup>1</sup>, Хаитов М.Р.<sup>2,6</sup>, Пронин А.В.<sup>1</sup>, Куц А.А.<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Государственный научный центр «Институт иммунологии» ФМБА России, 115522, г. Москва, Россия;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, 109472, г. Москва, Россия;

<sup>4</sup>ФГБУН «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, 119991, г. Москва, Россия;

<sup>5</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, г. Москва, Россия;

<sup>6</sup>ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, г. Москва, Россия

**Введение.** Вакцина против гепатита С пока не разработана. Рекомбинантные белки и плазмиды, кодирующие белки вируса гепатита С (ВГС), – компоненты кандидатных вакцин – индуцируют слабый иммунный ответ и требуют использования адьювантов.

**Цель работы** – изучить адьювантную способность водного раствора фуллера C<sub>60</sub> при иммунизации мышей рекомбинантным белком NS5B (rNS5B) ВГС – РНК-зависимой РНК-полимеразой, а также плазмидой pcNS5B, экспрессирующей этот белок.

**Материалы и методы.** Водный раствор дисперсного фуллера (dnC<sub>60</sub>) получен методом ультрафильтрации. Мышей C57BL/6 иммунизировали rNS5B подкожно, pcNS5B – внутримышечно в смеси с разными дозами dnC<sub>60</sub> трёхкратно, затем оценивали гуморальный и клеточный ответ на ВГС.

**Результаты.** Показано, что иммунизация мышей rNS5B в смеси с dnC<sub>60</sub> в дозах 2–50 мкг/мышь приводила к значительной индукции гуморального ответа: дозозависимый прирост титров антител IgG1 был в 7–20 раз выше. Усиления клеточного ответа к rNS5B при введении с dnC<sub>60</sub> не наблюдалось: продукция IFN-γ лимфоцитами, стимулированными *in vitro*, не увеличивалась; антитела изотипа IgG2a – маркера Th1 звена иммунного ответа – не обнаруживались. Гуморальный ответ на ДНК-иммунизацию был слабым у мышей всех групп, получавших pcNS5B. Клеточный ответ при введении плазмиды в смеси с dnC<sub>60</sub> подавлялся. Показана обратная зависимость индекса стимуляции пролиферации лимфоцитов в ответ на специфические стимуляторы *in vitro* от дозы dnC<sub>60</sub>, снижение количества клеток, синтезирующих IFN-γ, в реакции ELISpot, сокращение популяции CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов.

**Заключение.** Дисперсный фуллерен dnC<sub>60</sub> представляется весьма обещающим адьювантом для повышения иммуностимулирующей активности слабоиммуногенных белков, к которым относятся белки ВГС, включая поверхностные, важные для протективного ответа. Для повышения способности dnC<sub>60</sub> усиливать клеточный иммунный ответ на компоненты кандидатной вакцины необходимы дальнейшие исследования.

**Ключевые слова:** вирус гепатита С; неструктурный белок NS5B; ДНК-иммунизация; фуллерен C<sub>60</sub>; адьюванты; иммунный ответ

**Для цитирования:** Масалова О.В., Леснова Е.И., Андреев С.М., Шершакова Н.Н., Козлов В.В., Пермякова К.Ю., Демидова Н.А., Валуев-Эллистон В.Т., Турецкий Е.А., Иванов А.В., Николаева Т.Н., Хаитов М.Р., Пронин А.В., Куц А.А. Адьювантное действие дисперсного фуллера C<sub>60</sub> на иммунный ответ против конструкций, имитирующих аминокислотные и нуклеотидные последовательности неструктурного белка NS5B вируса гепатита С. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(6): 516–526. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-149>

**Для корреспонденции:** Масалова Ольга Владимировна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией клеточной инженерии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия. E-mail: [ol.mas@mail.ru](mailto:ol.mas@mail.ru)

**Участие авторов:** Масалова О.В. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Леснова Е.И. – проведение экспериментов; Андреев С.М. – проведение экспериментов, редактирование статьи; Шершакова Н.Н. – проведение экспериментов; Козлов В.В. – проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, редактирование статьи; Пермякова К.Ю. – проведение экспериментов; Демидова Н.А. – проведение экспериментов; Валуев-Эллистон В.Т. – проведение экспериментов; Турецкий Е.А. – проведение экс-

периментов; Иванов А.В. – проведение экспериментов, редактирование статьи; Николаева Т.Н. – проведение экспериментов, редактирование статьи; Хаитов М.Р. – редактирование статьи; Пронин А.В. – редактирование статьи; Куц А.А. – концепция и дизайн исследования, редактирование статьи.

**Финансирование.** Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

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

**Этическое утверждение.** Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Протокол № 10 от 07.06.2021).

Поступила 29.10.2022

Принята в печать 10.12.2022

Опубликована 30.12.2022

## ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-149>

# Adjuvant effect of dispersed fullerene C<sub>60</sub> on the immune response to constructs harboring amino acid and nucleotide sequences of hepatitis C virus nonstructural NS5B protein

Olga V. Masalova<sup>1</sup>, Ekaterina I. Lesnova<sup>1</sup>, Sergey M. Andreev<sup>2</sup>, Nadezda N. Shershakova<sup>2</sup>, Vyacheslav V. Kozlov<sup>1</sup>, Kristina Yu. Permyakova<sup>1,3</sup>, Natalia A. Demidova<sup>1</sup>, Vladimir T. Valuev-Elliston<sup>4</sup>, Evgeny A. Turetskiy<sup>2,5</sup>, Alexander V. Ivanov<sup>4</sup>, Tatiana N. Nikolaeva<sup>1</sup>, Musa R. Khaitov<sup>2,6</sup>, Alexander V. Pronin<sup>1</sup>, Alla A. Kushch<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, 115522, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA by K.I. Skryabin», 109472, Moscow, Russia;

<sup>4</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991, Moscow, Russia;

<sup>5</sup>Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 119991 Moscow, Russia;

<sup>6</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, 119997, Moscow, Russia

**Introduction.** A vaccine against hepatitis C has not yet been developed. Recombinant proteins and plasmids encoding hepatitis C virus (HCV) proteins, the components of candidate vaccines, induce a weak immune response and require the use of adjuvants.

**The aim of the work** was to study the adjuvant action of an aqueous solution of fullerene C<sub>60</sub> during immunization of mice with HCV recombinant protein NS5B (rNS5B) that is an RNA-dependent RNA polymerase, or with NS5B-encoding pcNS5B plasmid.

**Materials and methods.** An aqueous solution of dispersed fullerene (dnC<sub>60</sub>) was obtained by ultrafiltration. C57BL/6 mice were immunized with rNS5B subcutaneously, pcNS5B – intramuscularly mixed with different doses of dnC<sub>60</sub> three times, then the humoral and cellular response to HCV was evaluated.

**Results.** Mice immunization with rNS5B in a mixture with dnC<sub>60</sub> at doses of 2–50 µg/mouse significantly induced humoral response: a dose-dependent increase in IgG1 antibody titers was 7–20 times higher than in the absence of fullerene. There was no increase in the cellular response to rNS5B when administered with dnC<sub>60</sub>. The humoral response to DNA immunization was weak in mice of all groups receiving pcNS5B. The cellular response was suppressed when the plasmid was injected in a mixture with dnC<sub>60</sub>.

**Conclusions.** Dispersed fullerene dnC<sub>60</sub> is a promising adjuvant for increasing the immunostimulating activity of weakly immunogenic proteins including surface and other HCV proteins, important for a protective response. Further research is needed to enhance the ability of dnC<sub>60</sub> to boost the cellular immune response to the components of the candidate vaccine.

**Keywords:** hepatitis C virus; nonstructural NS5B protein; DNA immunization; fullerene C<sub>60</sub>; adjuvants; immune response

**For citation:** Masalova O.V., Lesnova E.I., Andreev S.M., Shershakova N.N., Kozlov V.V., Permyakova K.Yu., Demidova N.A., Valuev-Elliston V.T., Turetskiy E.A., Ivanov A.V., Nikolaeva T.N., Khaitov M.R., Pronin A.V., Kushch A.A. Adjuvant effect of dispersed fullerene C<sub>60</sub> on the immune response to constructs harboring amino acid and nucleotide sequences of hepatitis C virus nonstructural NS5B protein. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(6): 516–526 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-149>

**For correspondence:** Olga V. Masalova, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Cell Engineering, Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation; 123098, Moscow, Russia. E-mail: ol.mas@mail.ru

**Information about the authors:**

Masalova O.V., <https://orcid.org/0000-0001-5571-5669>  
Lesnova E.I., <https://orcid.org/0000-0002-2801-6843>  
Andreev S.M., <https://orcid.org/0000-0001-8297-579X>  
Shershakova N.N., <https://orcid.org/0000-0001-6444-6499>  
Kozlov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-0502-4824>  
Permyakova K.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-3579-4416>  
Demidova N.A., <https://orcid.org/0000-0003-1961-9789>  
Valuev-Elliston V.T., <https://orcid.org/0000-0003-0365-570X>  
Turetskiy E.A., <https://orcid.org/0000-0002-6822-3409>  
Ivanov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-5659-9679>  
Nikolaeva T.N., <https://orcid.org/0000-0001-6226-7251>  
Khaitov M.R., <https://orcid.org/0000-0003-4961-9640>  
Pronin A.V., <https://orcid.org/0000-0001-5266-9783>  
Kushch A.A., <https://orcid.org/0000-0002-3396-5533>

**Contribution:** Masalova O.V. – the study concept design, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Lesnova E.I. – conducting of the experiments; Andreev S.M. – conducting of the experiments, review and editing; Shershakova N.N. – conducting of the experiments; Kozlov V.V. – conducting of the experiments, analysis and interpretation of the data, review and editing; Permyakova K.Yu. – conducting of the experiments; Demidova N.A. – conducting of the experiments; Valuev-Elliston V.T. – conducting of the experiments; Turetskiy E.A. – conducting of the experiments; Ivanov A.V. – conducting of the experiments, review and editing; Nikolaeva T.N. – conducting of the experiments, review and editing; Khaitov M.R. – review and editing; Pronin A.V. – review and editing; Kushch A.A. – the study concept design, review and editing.

**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 Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, July 23, 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Gamaleya NRC of Epidemiology and Microbiology (Protocol No 10 dated June 7, 2021).

Received 29 October 2022  
Accepted 10 December 2022  
Published 30 December 2022

## Введение

Гепатит С признан одной из главных причин хронических заболеваний печени, включая терминальные стадии – цирроз и гепатокарциному. До 80% случаев острого гепатита С переходят в хроническую форму, вызывая хронический гепатит С, что объясняется повышенной частотой мутаций вируса гепатита С (ВГС), интерференцией вирусных белков с факторами врождённого и адаптивного иммунитета хозяина, образованием эскейп-вариантов ВГС, ускользающих от иммунного ответа [1].

Долгое время проблема эффективного лечения гепатита С оставалась нерешённой, так как стандартная терапия, основанная на сочетании пегилированного рекомбинантного интерферона (IFN)  $\alpha$  и рибавирина, позволяла излечивать не более половины пациентов и сопровождалась серьёзными побочными эффектами [2]. В 2014 г. в терапии гепатита С произошёл прорыв: благодаря применению пангенотипных препаратов прямого противовирусного действия (ПППД), блокирующих вирусные ферменты NS3, NS5B и NS5A, число пациентов с устойчивым исчезновением вируса из периферической крови превысило 95% [3]. Это событие называют новой эрой в лечении гепатита С. Однако со временем выявился ряд фактов, показывающих, что точку в решении проблемы гепатита С ставить рано. Так, ПППД крайне дороги, что делает лечение малодоступным. Исследования последних лет показали, что исчезновение вируса при

действии ПППД не приводит к полной нормализации функций лимфоцитов: не восстанавливается пролиферация Т-клеток, продолжается синтез цитокинов, вызывающих воспаление и фиброз, наблюдается экспансия супрессорных клеток [4, 5]. Мало изучены отдалённые последствия блокирования вирусных ферментов, так как ВГС может оставаться в печени и клетках крови после исчезновения вирусной РНК в плазме периферической крови [6, 7]. При лечении ПППД часто отмечается реактивация вирусов других таксономических групп [8, 9]. Успешная элиминация ВГС с помощью ПППД не защищает от реинфекции.

Отсутствие вакцины – главное препятствие в контроле за гепатитом С [10]. Доказано, что эффективная вакцина должна стимулировать мощный мульти-эпитопный и функциональный клеточный иммунный ответ, а также индуцировать высокоактивные вируснейтрализующие антитела [11]. Усугубляет проблему разработки вакцин отсутствие адекватной лабораторной модели гепатита С на животных [12]. Поэтому на начальных этапах разработки вакцин используют стандартный подход, который заключается в анализе эффективности иммунного ответа, индуцированного вакцинами, в иммунокомпетентных мышцах [13].

Основой для разработки вакцин служат генно-инженерные продукты, имитирующие последовательности ВГС: рекомбинантные белки, пептиды, представляющие В- и Т-клеточные эпитопы, ДНК в составе плазмид и вирусных векторов. Что касается рекомбинантных белков в качестве вакцинных пре-

паратов, то основная проблема состоит в их слабой иммуногенности, в том числе в недостаточной индукции В-клеточного ответа. При ДНК-иммунизации иммунный ответ носит в основном Т-клеточную направленность, тогда как образования антител практически не наблюдается. Несмотря на испытания многочисленных вакцин против гепатита С разного состава, ни одна из них пока не одобрена для применения, что в значительной степени связано с отсутствием высокоэффективных адъювантов [14, 15].

В связи с этим большой интерес представляют углеродсодержащие наноматериалы, в том числе фуллерены [16]. Они нетоксичны, биосовместимы; это сильные антиоксиданты, некоторые из них обладают выраженной противовоспалительной и противовирусной активностью [17–21], могут ингибировать фиброз печени и предотвращать цирроз в экспериментальной крысиной модели [22]. Эти препараты могут повышать иммуногенность за счёт комплексования иммуногена и формирования мультиплетной структуры, а также улучшения транспорта в антигенпрезентирующие клетки с дальнейшим процессингом. Например, фуллеренол – гидроксированный фуллерен  $C_{60}(OH)_{22}$  – испытывали как адъювант для иммунизации животных вирусными белками и ДНК-вакциной. Результаты показали, что такие наночастицы обладают иммуномодулирующей активностью, усиливая врождённый иммунный ответ через активацию различных Toll-подобных рецепторов дендритных клеток и макрофагов [23, 24]. В последние годы на основе легко масштабируемой зелёной технологии была разработана водорастворимая нанодисперсная форма немодифицированного фуллерена  $C_{60}$  ( $dnC_{60}$ ); она проявляет противовоспалительный, противовирусный и ранозаживляющий эффекты и относится к группе нетоксичных субстанций [19, 25, 26].

**Целью** настоящей работы было выяснение способности водного раствора  $dnC_{60}$  оказывать иммуностимулирующее действие при введении мышам компонентов кандидатной вакцины против гепатита С – рекомбинантного белка NS5B ВГС – РНК-зависимой РНК-полимеразы, а также ДНК-конструкции, кодирующей этот белок.

### Материалы и методы

**Рекомбинантный белок NS5B ВГС (rNS5B)** – полноразмерный белок без С-концевого гидрофобного участка, содержащего 21 аминокислотный остаток (а.о.), (2420–3011 а.о., генотип 1b) был экспрессирован в *Escherichia coli* и очищен на агарозе Ni-NTA (никель – нитрилоацетат), как описано ранее [27]. Его использовали как иммуноген при иммунизации мышей, как антиген для стимуляции Т-клеточных реакций *in vitro*, а также как сорбент в иммуноферментном анализе (ИФА) для оценки продукции антител.

**Синтетические олигопептиды** синтезированы в НПО «Иммунотэкс» (Белки Антитела.РФ, г. Ставрополь, Россия) с чистотой более 98%, аминокислотные последовательности приведены в **таблице**. Пептиды имитировали ВГС-специфические эпитопы цитоток-

сических лимфоцитов (CTL) и Т-хелперов 1-го типа (Th1); их использовали как стимуляторы Т-клеточных реакций *in vitro*. Поиск эпитопов проводили в соответствии с картированными последовательностями [28–32] с использованием ресурса Immune Epitope Database Analysis Resource<sup>1</sup>.

**Плазмида pcNS5B**, кодирующая полноразмерный белок NS5B ВГС, получена на основе вектора pcDNA3.1(+ (Invitrogen, США) и описана ранее [33, 34].

**Дисперсный фуллерен  $dnC_{60}$** . Водный раствор фуллерена ( $dnC_{60}$ ) был получен ультрафильтрационным методом из высокоочищенного фуллерена (99,95%, «НеоТекПродакт», Россия), как описано ранее [19, 25]. Этот метод обеспечивает высокий выход фуллерена  $C_{60}$  без использования ультразвука и нагревания, при этом гидродинамический размер частиц, определённый методом динамического светорассеяния, составляет около 200 нм. В настоящей работе исходная концентрация стерильного раствора была 1 мг/мл. Дозы рассчитывали с учётом весового содержания  $C_{60}$ , определённого по оптической плотности раствора при 340 нм (коэффициент молярной экстинкции 50 200).

**Мыши.** Для экспериментов *in vivo* использовали самок мышей инбредной линии C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) в возрасте 6–8 недель (средний вес  $20 \pm 3$  г), полученных из питомника лабораторных животных «Столбовая».

**Иммунизация мышей.** Проводили две серии экспериментов по испытанию иммуностимулирующей активности  $dnC_{60}$  на модели рекомбинантного белка rNS5B и ДНК-конструкции pcNS5B. Белок rNS5B вводили мышам подкожно в корень хвоста в дозе 4 мкг/мышь либо в физиологическом растворе (ф/р), либо в смеси с  $dnC_{60}$  в дозах 2, 10 и 50 мкг/мышь. Плазмиду pcNS5B вводили в дозе 100 мкг/мышь внутримышечно в четырёхглавую мышцу бедра задних лап, в ф/р или в смеси с  $dnC_{60}$  в дозах 5 и 25 мкг/мышь. Контрольным группам мышей вводили ф/р. Иммунизацию проводили трёхкратно с интервалом 2 недели, через 7–9 дней после последней инъекции учитывали иммунный ответ индивидуально для каждой мыши ( $n = 8$  в каждой группе).

**Оценка иммунного ответа, гуморальный ответ.** Активность взаимодействия антител к белку rNS5B ВГС в сыворотках крови мышей определяли методом непрямого ИФА, как описано ранее [33]. 96-луночные планшеты сенсibilizировали rNS5B в фосфатно-солевом буфере, pH 7,2 (PBS), в концентрации 1 мкг/мл в течение ночи при комнатной температуре. В качестве вторичных использовали антитела к иммуноглобулинам мышши изотипов IgG1 и IgG2a, конъюгированные с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch Laboratories, США), в качестве субстрата пероксидазы – тетраметилбензидин (Sigma, США); оптическую плотность измеряли при 450 нм. За титр сывороток в ИФА принимали предельное разведение сыворотки

<sup>1</sup>T Cell Epitope Prediction Tools. Available from: <http://tools.immuneepitope.org/main/tcell/>.

крови, при котором значение оптической плотности при  $A_{450}$  в 2 раза превышало значение для контрольного образца (сыворотка крови неиммунизированных мышей).

**Анализ пролиферации лимфоцитов** иммунизированных мышей проводили *in vitro* по включению в лимфоциты [ $^3$ H]-тимидина. Для получения лимфоцитов селезенки диспергировали, клеточные суспензии процеживали через ситочки с размером пор 100 мкм (BD Falcon Cell Strainers, США), дважды отмывали в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия). Лимфоциты помещали в 96-луночные культуральные панели по  $5 \times 10^5$  клеток в лунку в среде RPMI-1640, содержащую 20% эмбриональной телячьей сыворотки (Invitrogen, США), 2 mM глутамина, 4,5 г/л глюкозы, 50 мкг/мл гентамицина, 0,2 ед/мл инсулина. К клеткам добавляли стимулятор – рекомбинантный белок NS5B в конечной концентрации 1 мкг/мл и культивировали при 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 5 сут. Культуральные жидкости отбирали для анализа цитокинов, в клетки добавляли свежую среду с [ $^3$ H]-тимидином (1 мКи/лунка) (ФГБУ «Институт молекулярной генетики НИЦ «Курчатовский институт» РАН). Через 18 ч радиоактивность в клетках измеряли с помощью  $\beta$ -счетчика MicroBeta2 (PerkinElmer, США). Рассчитывали индекс стимуляции пролиферации (ИСП) как отношение радиоактивности (в имп/мин) в лунках со стимуляторами к радиоактивности в лунках со средой.

**Измерение концентрации IFN- $\gamma$**  в культуральных жидкостях, полученных после стимуляции лимфоцитов, проводили методом ИФА с помощью наборов Mouse IFN- $\gamma$  ELISA development kit (HRP) (Mabtech, Швеция) в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию цитокина определяли по калибровочным кривым стандартных образцов. Предел чувствительности для IFN- $\gamma$  составлял 2 пг/мл.

**Определение количества IFN- $\gamma$ -секретирующих клеток** проводили методом ELISpot с использованием тест-системы Mouse IFN- $\gamma$  ELISpotPLUS kit (ALP

(Mabtech, Швеция). Изолированные спленоциты ( $4 \times 10^5$  клеток в лунке) инкубировали с иммобилизованными на 96-луночных планшетах антителами к IFN- $\gamma$  мыши течение 2,5 сут при 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в присутствии стимуляторов – rNS5B (1 мкг/мл) и пептидов (1 и 5 мкг/мл в двух повторах, данные усредняли). Окрашивание клеток проводили в соответствии с инструкцией. Окрашенные пятна (spots, споты) детектировали визуально с помощью стереоскопического микроскопа МБС-10 (ОАО «ЛЗСО», Россия). Результаты выражали как разницу в количестве спотов на  $10^6$  клеток в лунках в присутствии стимуляторов и в контрольных лунках без стимуляторов (со средой).

**Определение фенотипа лимфоцитов методом проточной цитометрии.** Лимфоциты, выделенные из селезенок иммунизированных мышей, анализировали методом проточной цитометрии с использованием меченных флуорохромами антител к кластерам дифференцировки CD4 и CD8 (BD Biosciences, США). Окрашивание клеток ( $10^6$  клеток/проба) проводили по стандартной методике, рекомендованной производителем. Измерения выполняли на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II (США), результаты анализировали с помощью программы BD FACSDiva v.6.1.3 (BD Biosciences, США).

**Для статистической обработки** результатов использовали программы Statistica 8.0 и GraphPad Prism 7. Данные представляли как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Для сравнения параметрических количественных данных использовали t-test (критерий Стьюдента), непараметрических – U-test (критерий Манна–Уитни). Значения  $p < 0,05$  принимались как статистически значимые.

## Результаты

В первой серии экспериментов изучали способность dnC<sub>60</sub> в дозах 2, 10 и 50 мкг/мышь проявлять адьювантные свойства при иммунизации рекомби-

Таблица. Характеристика синтетических олигопептидов из региона белка NS5B вируса гепатита С

Table. Characteristics of synthetic oligopeptides from hepatitis C virus NS5B protein

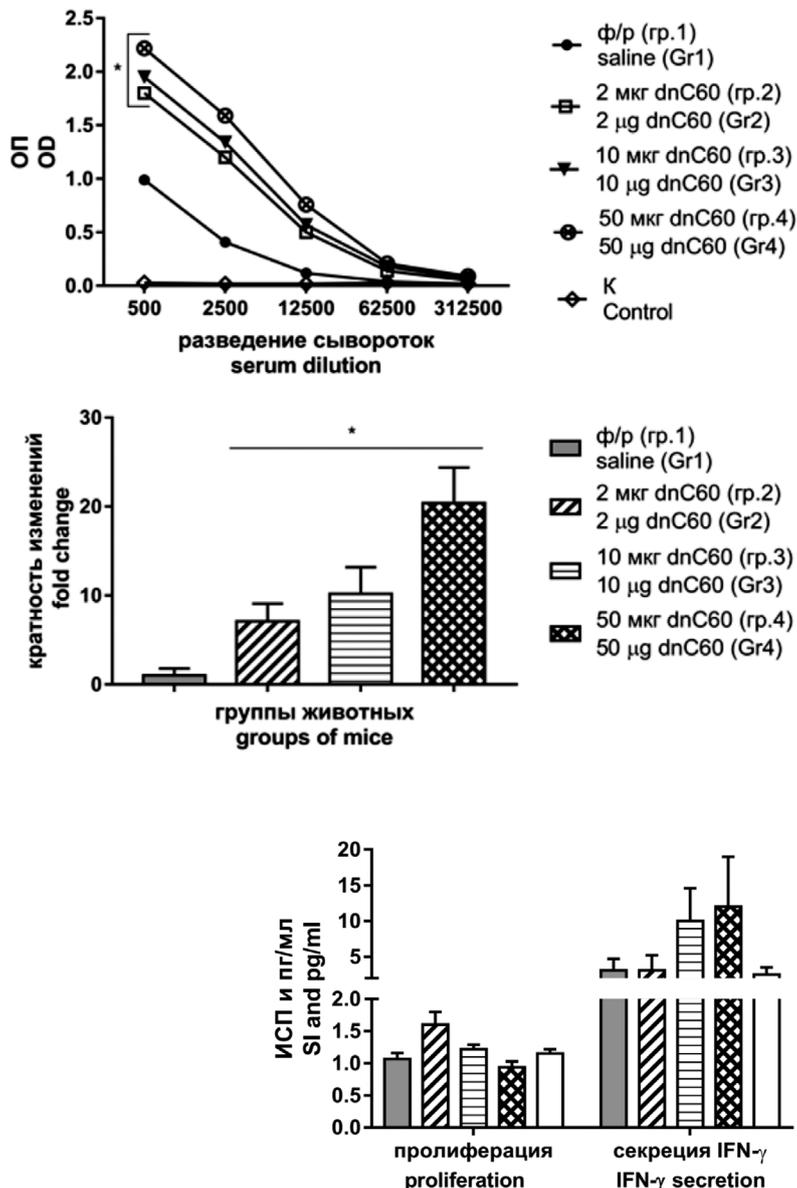
Обозначение Designation	Позиция аминокислотных остатков Amino acid positions	Последовательность Sequence	Характеристика эпитопа Epitope characteristics	Источник Reference
p1	2726–2733	AGLQDCTM	CTL, синтез IFN- $\gamma$ CTL, IFN- $\gamma$ release	N. Himoudi и соавт. [28], S. Vertuani и соавт. [32]
p2	2555–2563	TTIMAKNEV	CTL, консервативный CTL, conservative	A. Ikram и соавт. [29]
p3	2576–2584	ARLIVFPDL	CTL, протективный, синтез IFN- $\gamma$ CTL, protective, IFN- $\gamma$ release	N. Himoudi и соавт. [28]
p4	2594–2601	LYDVVSKL	CTL, синтез IFN- $\gamma$ CTL, IFN- $\gamma$ release	N. Himoudi и соавт. [28], A.C. Tan и соавт. [31]
p5	2820–2827	RHTPVNSW	CTL, протективный CTL, protective	K. Nitschke и соавт. [30]
p6	2423–2430	SYSWTGAL	Th1	A. Ikram и соавт. [29]

нантным белком rNS5B ВГС. Среднегеометрический титр антител IgG1 к NS5B, введённого в ф/р (группа 1), составил  $1 : 10^5$  (рис. 1 а), антител изотипа IgG2a обнаружено не было (титр  $< 1 : 100$ ). У мышей, которых иммунизировали белком rNS5B ВГС в смеси с dnC<sub>60</sub> (группы 2–4), был зарегистрирован дозозависимый эффект увеличения уровня антител IgG1 в 7, 10 и 20 раз соответственно ( $p < 0,05$ ) (рис. 1 а, б); антитела изотипа IgG2a не выявлялись.

Клеточный ответ оценивали по пролиферации лимфоцитов *in vitro* и секреции ими IFN- $\gamma$  в ответ на

стимуляцию rNS5B. Оба показателя были на низком уровне, варьировали среди индивидуальных мышей, статистически значимо не различаясь как между группами, которым вводили рекомбинантный белок, так и с контрольной группой, которая получала только ф/р (рис. 2).

При проведении экспериментов *in vivo* не было зарегистрировано ни падежа иммунизированных мышей, ни потери ими массы тела. Поведенческие реакции у животных контрольной и опытных групп не различались. Однако при вскрытии животных



**Рис. 1.** Активность антител изотипа IgG1 к рекомбинантному белку rNS5B вируса гепатита С в сыворотках мышей, иммунизированных rNS5B в смеси с дисперсным фуллереном: а – кривые титрования сывороток в ИФА; б – кратность увеличения титров антител в группах мышей, за единицу принят титр антител в группе 1 ( $1 : 10^5$ ). ОП – оптическая плотность при 450 нм.

\*Статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) по сравнению с группой 1, которой rNS5B вводили с физиологическим раствором.

**Fig. 1.** Activity of IgG1 antibodies to the recombinant HCV rNS5B protein in the sera of mice immunized with rNS5B in a mixture with dispersed fullerene: а – sera titration curves in ELISA; б – the increase of antibody titers in groups of mice, the antibody titer in group 1 ( $1 : 10^5$ ) was taken as a unit. OD – optical density at 450 nm.

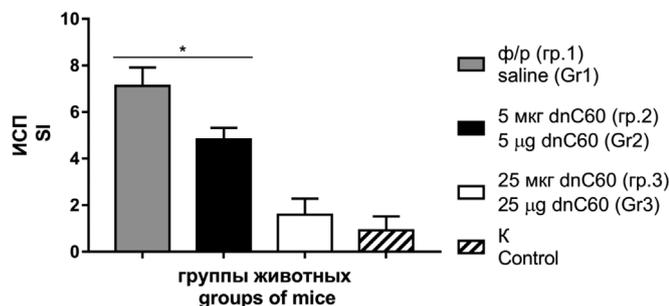
\*  $p < 0.05$  compared to group 1, to which rNS5B was administered with saline solution (saline).

**Рис. 2.** Клеточный ответ к рекомбинантному белку NS5B в спленocyтaх мышей, иммунизированных rNS5B в смеси с дисперсным фуллереном. Пролиферативный ответ лимфоцитов выражен в виде индекса стимуляции пролиферации, секреция IFN- $\gamma$  – концентрация в пг/мл; индекс стимуляции пролиферации рассчитывали как отношение радиоактивности (в имп/мин) в лунках со стимуляторами к радиоактивности в лунках со средой. Контрольной группе вводили только физиологический раствор.

**Fig. 2.** Cellular response to recombinant NS5B protein in splenocytes of mice immunized with rNS5B in a mixture with dispersed fullerene. The lymphocyte proliferation is expressed as a stimulation index (SI); IFN- $\gamma$  secretion is a cytokine concentration in culture fluids by ELISA, in pg/ml; SI was calculated as the ratio of radioactivity (in cpm/min) in wells with stimulants to radioactivity in wells with medium alone. The control group (Control) was administered saline alone.

в группе 4, получивших 50 мкг dnC<sub>60</sub>, наблюдались жировые отложения на внутренних органах – печени, желудке, селезёнке. При этом органы были слегка увеличены в размерах, нормального цвета. Можно судить о первой (начальной) степени ожирения. Ткань печени и почек при визуальной оценке не была изменена. В связи с этим в следующих экспериментах мы вдвое уменьшили максимально использованную дозу dnC<sub>60</sub>.

Изучение способности dnC<sub>60</sub> проявлять стимулирующую активность проводили при иммунизации плазмидой, кодирующей ген NS5B, фуллерен вводили в дозах 5 и 25 мкг/мышь. Гуморальный ответ на ДНК-иммунизацию был слабым у мышей всех групп, получавших pcNS5B: титры антител к целевому белку обоих изотипов не превышали 1 : 100.



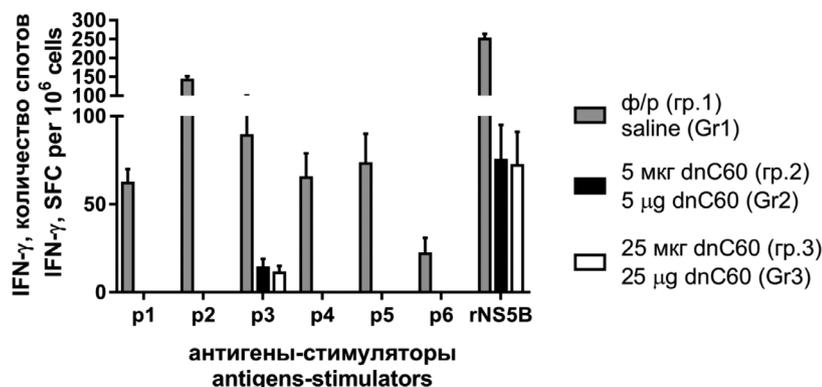
**Рис. 3.** Снижение пролиферативной активности *in vitro* спленоцитов мышей, иммунизированных плазмидой pcNS5B с дисперсным фуллереном, в ответ на стимуляцию белком гNS5B. Индекс стимуляции пролиферации рассчитывали как отношение радиоактивности (в имп/мин) в лунках со стимулятором (гNS5B) к радиоактивности в лунках со средой.

\*Статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой, которой вводили только физиологический раствор.

**Fig. 3.** Reduction of lymphocyte proliferation of mice immunized with pcNS5B plasmid with dispersed fullerene in response to *in vitro* stimulation by гNS5B protein.

The stimulation index (SI) was calculated as the ratio of radioactivity (in cpm/min) in wells with stimulants to radioactivity in wells with medium alone.

\* $p < 0.05$  compared to the control group (Control), which was administered saline alone.



В процессе оценки Т-клеточного иммунного ответа показано, что при стимуляции спленоцитов, полученных от мышей, иммунизированных pcNS5B, была выявлена активная пролиферация лимфоцитов в ответ на гNS5B. При этом ИСП у мышей группы 1 достигал 8 (рис. 3). При иммунизации плазмидой в смеси с dnC<sub>60</sub> наблюдалась обратная зависимость показателя ИСП от дозы dnC<sub>60</sub>.

Анализ количества лимфоцитов, синтезирующих IFN-γ, проводили *in vitro* методом ELISpot. В качестве стимуляторов клеток использовали гNS5B и 6 пептидов, имитирующих Т-клеточные эпитопы белка. Как показано на рис. 4, все антигены вызывали формирование спотов в группе 1, в группах 2 и 3 – только один из пептидов и гNS5B, но в значительно меньшем количестве.

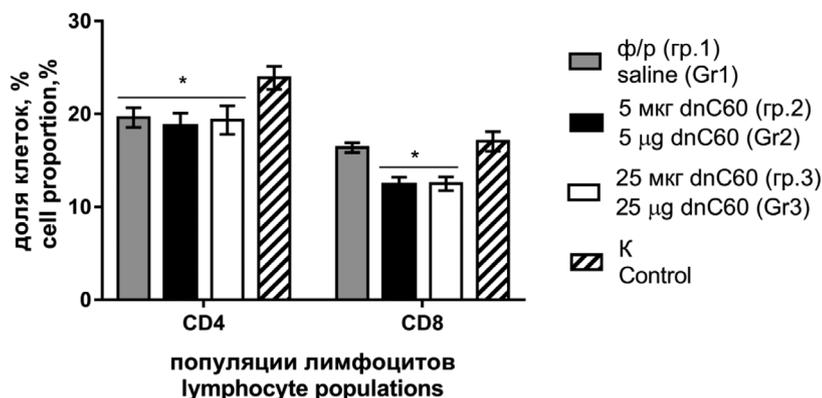
Подсчёт популяций Т-клеток в селезёнках иммунизированных мышей проводили методом проточной цитометрии. Установлено статистически значимое снижение ( $p < 0,0001$ ) Th/CD4<sup>+</sup> во всех экспериментальных группах, получивших плазмиду, по сравнению с контрольной группой, которой вводили только ф/р, показатели не зависели от концентрации dnC<sub>60</sub> (рис. 5). В случае CTL/CD8<sup>+</sup> наблюдалась другая картина: данная популяция клеток была снижена только в группах 2 и 3, иммунизированных с добавлением dnC<sub>60</sub> ( $p < 0,0001$ ).

### Обсуждение

В качестве кандидата для включения в вакцину был выбран неструктурный белок NS5B ВГС, так как это один из важнейших ферментов вируса и мишень для действия ряда ПППД; в нём картировано самое большое число, по сравнению с другими вирусными белками, консервативных Т-клеточных эпитопов, важных для индукции эффективного иммунного ответа [35]. Результаты работы показали высокую эффективность водного раствора дисперсного фуллерена в стимуляции гуморального ответа на белок NSB: при трёхкратном введении прирост титров антител в зависимости от дозы dnC<sub>60</sub> был в 7–20 раз выше. Ранее на модели рекомбинантного белка NS4 ВГС мы показали, что водорастворимые производные фуллерена C<sub>60</sub> с глюкозаминилмурамилдипептидом и натриевой со-

**Рис. 4.** Различия в количестве IFN-γ-синтезирующих клеток, полученных от мышей, иммунизированных плазмидой pcNS5B в присутствии/отсутствии dnC<sub>60</sub>. Результаты представлены как разница в количестве спотов на 10<sup>6</sup> клеток в лунках со стимуляторами и в контрольных лунках без стимуляторов (со средой); p1–p6 – пептиды, перечисленные в таблице, представляющие последовательности вируса гепатита С.

**Fig. 4.** Differences in the number of IFN-γ-synthesizing cells obtained from mice immunized with pcNS5B plasmid in the presence/absence of dnC<sub>60</sub>. The results are presented as a difference in the number of spot-forming cells (SFC) per 10<sup>6</sup> cells in wells with stimulants and in control wells without stimulants (with medium alone); p1–p6 are peptides listed in Table representing HCV sequences.



**Рис. 5.** Определение доли лимфоцитов CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> в группах мышей, иммунизированных плазмидой pcNS5B в сочетании с дисперсным фуллереном, методом проточной цитометрии.

\*Статистически значимые различия ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контрольной группой, которой вводили только физиологический раствор.

**Fig. 5.** Determination of the proportion of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes in the spleen of mice immunized with pcNS5B plasmid in combination with dispersed fullerene by flow cytometry.

\* $p < 0.05$  compared to the control group (Control), which was administered saline alone.

лью аминокaproновой кислоты на порядок усиливали гуморальный ответ, при этом антиген вводился в дозе в 5 раз большей (20 мкг/мышь) по сравнению с использованной в настоящей работе (4 мкг). Эти препараты, однако, не были эффективны при инъекции малых доз антигена и стимулировали иммунный ответ только после 4–5 иммунизаций [36]. Следует также отметить, что в работе китайских учёных применение C<sub>60</sub>(OH)<sub>22</sub> в сочетании с тремя белками ВГС повышало гуморальный ответ только к одному из них, притом менее значительно (в 4 раза) и после 4 иммунизаций [23].

Введение белка подкожно с максимально использованной дозой dnC<sub>60</sub> 50 мкг/мышь вызывало некоторые побочные эффекты. Ранее показано, что при однократном введении фуллерена C<sub>60</sub> независимо от пути введения (внутривенный, внутрибрюшинный, интрагастральный) препарат не обладает острым токсическим эффектом в большом диапазоне доз, вплоть до 2700 мкг/мышь [37]. Острой токсичности мы также не наблюдали; возможно, жировые отложения на внутренних органах могут объясняться неоднократной (трёхкратной) иммунизацией, а также путём введения препарата. Интересно, что при изучении противоаллергических свойств dnC<sub>60</sub> на модели атопического дерматита у мышей показаны различные эффекты при накожном и подкожном введении препарата: только при накожной экспликации увеличивалась выработка ключевых цитокинов Th1-профиля интерлейкина (IL) 12 и IFN-γ; в большей степени повышалась экспрессия маркера активации Т-регуляторных клеток Foxp3, блокирующих клеточный иммунный ответ [21].

Клеточный ответ к rNS5B при иммунизации белком с dnC<sub>60</sub> не усиливался, о чём свидетельствует отсутствие значимого увеличения пролиферации и продукции IFN-γ стимулированными лимфоцитами *in vitro*, а также антител изотипа IgG2a – маркера Th1 звена иммунного ответа. Для изучения влияния дисперсного фуллерена на клеточный ответ при ДНК-иммунизации мышей иммунизировали плазмидой pcNS5B совместно с dnC<sub>60</sub>. Установлено, что внутримышечная иммунизация плазмидой в физиологическом растворе вызывает на достаточно высоком уровне пролифера-

цию лимфоцитов в ответ на специфический антиген и синтез IFN-γ не только к rNS5B, но и к ряду пептидов – эпитопов CTL и Th1. Оказалось, что добавление dnC<sub>60</sub> дозозависимо ингибирует клеточный ответ. В группах мышей, получивших плазмиду с дисперсным фуллереном, снижалась доля CD8<sup>+</sup>-лимфоцитов. Доля CD4<sup>+</sup>-лимфоцитов также была снижена по сравнению с контрольными мышами, но не с группой, получившей pcNS5B без dnC<sub>60</sub>.

Полученные данные согласуются с опубликованными ранее результатами о противовоспалительной активности фуллерена и дополняют их. Так, показано, что некоторые производные фуллерена C<sub>60</sub> ингибируют активацию одного из основных провоспалительных транскрипционных факторов NF-κB [38]. С использованием экспериментальной модели на мышах в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) установлено, что введение dnC<sub>60</sub> ингибирует продукцию цитокинов Th1-, Th2- и Th17-профиля [39]. Аналогичные данные получены японскими исследователями: водная наносуспензия кристаллического фуллерена частично подавляла ГЗТ-опосредованное воспаление, при этом также выявлено снижение секреции IL-6, IL-17 и относительный рост популяции Т-регуляторных клеток [40].

### Заключение

Таким образом, полученные данные демонстрируют, что препарат dnC<sub>60</sub> представляется весьма обещающим адьювантом для повышения иммуногенности слабоиммуногенных белков, к которым относятся белки ВГС, включая поверхностные, важные для протективного ответа. Однако для повышения способности dnC<sub>60</sub> усиливать клеточный иммунный ответ на компоненты кандидатной вакцины против гепатита С необходимы дальнейшие исследования.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Dustin L.B. Innate and adaptive immune responses in chronic HCV infection. *Curr. Drug Targets*. 2017; 18(7): 826–43. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150825110532>.
2. Pawlotsky J.M. Hepatitis C virus: standard-of-care treatment. *Adv. Pharmacol.* 2013; 67: 169–215. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405880-4.00005-6>

3. Spearman C.W., Dusheiko G.M., Hellard M., Sonderup M. Hepatitis C. *Lancet*. 2019; 394(10207): 1451–66. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32320-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32320-7)
4. Osuch S., Metzner K.J., Caraballo Cortes K. Reversal of T cell exhaustion in chronic HCV infection. *Viruses*. 2020; 12(8): 799. <https://doi.org/10.3390/v12080799>
5. Telatin V., Nicoli F., Frasson C., Menegotto N., Barbaro F., Castelli E., et al. In chronic hepatitis C infection, myeloid-derived suppressor cell accumulation and T cell dysfunctions revert partially and late after successful direct-acting antiviral treatment. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9: 190. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00190>
6. Elmasry S., Wadhwa S., Bang B.R., Cook L., Chopra S., Kanel G., et al. Detection of occult hepatitis C virus infection in patients who achieved a sustained virologic response to direct-acting antiviral agents for recurrent infection after liver transplantation. *Gastroenterology*. 2017; 152(3): 550-53.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.11.002>
7. Wang Y., Rao H., Chi X., Li B., Liu H., Wu L., et al. Detection of residual HCV-RNA in patients who have achieved sustained virological response is associated with persistent histological abnormality. *EBioMedicine*. 2019; 46: 227–35. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.07.043>
8. Holmes J.A., Yu M.L., Chung R.T. Hepatitis B reactivation during or after direct acting antiviral therapy – implication for susceptible individuals. *Expert Opin. Drug Saf.* 2017; 16(6): 651–72. <https://doi.org/10.1080/14740338.2017.1325869>
9. Ghweil A.A., Helal M.M. Reactivation of herpesvirus in patients with hepatitis C treated with direct-acting antiviral agents. *Infect. Drug Resist.* 2019; 12: 759–62. <https://doi.org/10.2147/IDR.S184598>
10. Verma R., Khanna P., Chawla S. Hepatitis C vaccine. Need of the hour. *Hum. Vacc. Immunother.* 2014; 10(7): 1927–9. <https://doi.org/10.4161/hv.29033>
11. Bailey J.R., Barnes E., Cox A.L. Approaches, progress, and challenges to hepatitis C vaccine development. *Gastroenterology*. 2019; 156(2): 418–30. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.060>
12. Ploss A., Kapoor A. Animal models of hepatitis C virus infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2020; 10(5): a036970. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036970>
13. Ahlén G., Frelin L. Methods to evaluate novel hepatitis C virus vaccines. *Methods Mol. Biol.* 2016; 1403: 221–44. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3387-7\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3387-7_11)
14. Andrianov A.K., Fuerst T.R. Immunopotentiating and delivery systems for HCV vaccines. *Viruses*. 2021; 13(6): 981. <https://doi.org/10.3390/v13060981>
15. Sepulveda-Crespo D., Resino S., Martinez I. Innate immune response against hepatitis C virus: targets for vaccine adjuvants. *Vaccines (Basel)*. 2020; 8(2): 313. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020313>
16. Gaur M., Misra C., Yadav A.B., Swaroop S., Maolmhuaidh F.O., Bechelany M., et al. Biomedical applications of carbon nanomaterials: fullerenes, quantum dots, nanotubes, nanofibers, and graphene. *Materials (Basel)*. 2021; 14(20): 5978. <https://doi.org/10.3390/ma14205978>
17. Barzegar A., Naghizadeh E., Zakariazadeh M., Azamat J. Molecular dynamics simulation study of the HIV-1 protease inhibit ion using fullerene and new fullerene derivatives of carbon nanostructures. *Mini Rev. Med. Chem.* 2017; 17(7): 633–47. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160609080157>
18. Hurmach V., Platonov M., Prylutska S., Klestova Z., Cherepanov V., Prylutsky Y., et al. Anticoronavirus activity of water-soluble pristine C60 fullerenes: in vitro and in silico screenings. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2021; 1352: 159–72. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-85109-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-85109-5_10)
19. Klimova R., Andreev S., Momotyuk E., Demidova N., Fedorova N., Chernoryzh Y., et al. Aqueous fullerene C60 solution suppresses herpes simplex virus and cytomegalovirus infections. *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostructures*. 2019; 28(6): 487–99. <https://doi.org/10.1080/1536383x.2019.1706495>
20. Reina G., Peng S., Jacquemin L., Andrade A.F., Bianco A. Hard nanomaterials in time of viral pandemics. *ACS nano*. 2020; 14(8): 9364–88. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c04117>
21. Shershakova N., Baraboshkina E., Andreev S., Purgina D., Struchkova I., Kamyshnikov O., et al. Anti-inflammatory effect of fullerene C60 in a mice model of atopic dermatitis. *J. Nanobiotechnology*. 2016; 14: 8. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0159-z>
22. Kuznietsova H., Dziubenko N., Hurmach V., Chereschuk I., Motuziuk O., Ogloblya O., et al. Water-soluble pristine C60 fullerenes inhibit liver fibrotic alteration and prevent liver cirrhosis in rats. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020; 2020: 8061246. <https://doi.org/10.1155/2020/8061246>
23. Liu J., Feng X., Chen Z., Yang X., Shen Z., Guo M., et al. The adjuvant effect of C60(OH)22 nanoparticles promoting both humoral and cellular immune responses to HCV recombinant proteins. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2019; 97: 753–9. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.088>
24. Xu L., Liu Y., Chen Z., Li W., Liu Y., Wang L., et al. Morphologically virus-like fullereneol nanoparticles act as the dual-functional nanoadjuvant for HIV-1 vaccine. *Adv. Mater.* 2013; 25: 5928–36. <https://doi.org/10.1002/adma.201300583>
25. Andreev S., Purgina D., Bashkatova E., Garshev A., Maerle A., Andreev I., et al. Study of fullerene aqueous dispersion prepared by novel dialysis method: simple way to fullerene aqueous solution. *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostructures*. 2015; 23(9): 792–800. <https://doi.org/10.1080/1536383x.2014.998758>
26. Shershakova N.N., Andreev S.M., Tomchuk A.A., Makarova E.A., Nikonova A.A., Turetskiy E.A., et al. Wound healing activity of aqueous dispersion of fullerene C60 produced by “green technology”. *Nanomedicine*. 2023; 47: 102619. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2022.102619>
27. Ivanov A.V., Korovina A.N., Tunitskaya V.L., Kostyuk D.A., Rechinsky V.O., Kukhanova M.K., et al. Development of the system ensuring a high-level expression of hepatitis C virus nonstructural NS5B and NS5A proteins. *Protein Expr. Purif.* 2006; 48(1): 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.02.011>
28. Himoudi N., Abraham J.D., Fournillier A., Lone Y.C., Joubert A., Op De Beeck A., et al. Comparative vaccine studies in HLA-A2.1-transgenic mice reveal a clustered organization of epitopes presented in hepatitis C virus natural infection. *J. Virol.* 2002; 76(24): 12735–46. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.12735-12746.2002>
29. Ikram A., Zaheer T., Awan F.M., Obaid A., Naz A., Hanif R., et al. Exploring NS3/4A, NS5A and NS5B proteins to design conserved subunit multi-epitope vaccine against HCV utilizing immunoinformatics approaches. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 16107. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34254-5>
30. Nitschke K., Barriga A., Schmidt J., Timm J., Viazov S., Kuntzen T., et al. HLA-B\*27 subtype specificity determines targeting and viral evolution of a hepatitis C virus-specific CD8+ T cell epitope. *J. Hepatol.* 2014; 60(1): 22–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.08.009>
31. Tan A.C., Eriksson E.M., Kedzierska K., Deliyannis G., Valkenburg S.A., Zeng W., et al. Polyfunctional CD8(+) T cells are associated with the vaccination-induced control of a novel recombinant influenza virus expressing an HCV epitope. *Antiviral Res.* 2012; 94(2): 168–78. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.03.009>
32. Vertuani S., Bazzaro M., Gualandi G., Micheletti F., Marastoni M., Fortini C., et al. Effect of interferon-alpha therapy on epitope-specific cytotoxic T lymphocyte responses in hepatitis C virus-infected individuals. *Eur. J. Immunol.* 2002; 32(1): 144–54. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200201\)32:1<144::AID-IMMU144>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200201)32:1<144::AID-IMMU144>3.0.CO;2-X)
33. Масалова О.В., Леснова Е.И., Иванов А.В., Пичугин А.В., Пермьякова К.Ю., Смирнова О.А. и др. Сравнительный анализ иммунного ответа на ДНК-конструкции, кодирующие неструктурные белки вируса гепатита С. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58(2): 21–8.
34. Ivanov A.V., Smirnova O.A., Ivanova O.N., Masalova O.V., Kochetkov S.N., Isagulians M.G. Hepatitis C virus proteins activate NRF2/ARE pathway by distinct ROS-dependent and independent mechanisms in HUH7 cells. *PLoS One*. 2011; 6(9): e24957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024957>
35. Rao X., Hoof I., van Baarle D., Kesmir C., Textor J. HLA preferences for conserved epitopes: a potential mechanism for hepatitis C clearance. *Front. Immunol.* 2015; 6: 552. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00552>
36. Масалова О.В., Шепелев А.В., Атанадзе С.Н., Парнес З.Н., Романова В.С., Вольпина О.М. и др. Иммуностимулирующее действие водорастворимых производных фуллере́на – перспектив-

ных адъювантов для вакцин нового поколения. Доклады РАН. 1999; 369(3): 411–3.

37. Шершакова Н.Н., Барабошкина Е.Н., Андреев С.М., Шабанова Д.Д., Смирнов В.В., Камышников О.Ю. и др. Отсутствие острой токсичности у водного раствора фуллерена C<sub>60</sub>. *Immunologiya*. 2016; 37(6): 325–9. <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2016-37-6-325-329>

38. Funakoshi-Tago M., Miyagawa Y., Ueda F., Mashino T., Moriwaki Y., Tago K., et al. A bis-malonic acid fullerene derivative significantly suppressed IL-33-induced IL-6 expression by inhibiting NF-kappaB activation. *Int. Immunopharmacol.* 2016; 40: 254–64. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.08.031>

39. Башкагова Е.Н., Андреев С.М., Шершакова Н.Н., Бабахин А.А., Шиловский И.П., Хаитов М.Р. Изучение модулирующей активности производных фуллерена C60 на реакцию гиперчувствительности замедленного типа. *Физиология и патология иммунной системы*. 2012; 16(2): 17–27.

40. Yamashita K., Sakai M., Takemoto N., Tsukimoto M., Uchida K., Yajima H., et al. Attenuation of delayed-type hypersensitivity by fullerene treatment. *Toxicology*. 2009; 261(1-2): 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.04.034>

## REFERENCES

- Dustin L.B. Innate and adaptive immune responses in chronic HCV infection. *Curr. Drug Targets*. 2017; 18(7): 826–43. <https://doi.org/10.2174/1389450116666150825110532>.
- Pawlotsky J.M. Hepatitis C virus: standard-of-care treatment. *Adv. Pharmacol.* 2013; 67: 169–215. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405880-4.00005-6>
- Spearman C.W., Dusheiko G.M., Hellard M., Sonderup M. Hepatitis C. *Lancet*. 2019; 394(10207): 1451–66. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32320-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32320-7)
- Osuch S., Metzner K.J., Caraballo Cortes K. Reversal of T cell exhaustion in chronic HCV infection. *Viruses*. 2020; 12(8): 799. <https://doi.org/10.3390/v12080799>
- Telatin V., Nicoli F., Frasson C., Menegotto N., Barbaro F., Castelli E., et al. In chronic hepatitis C infection, myeloid-derived suppressor cell accumulation and T cell dysfunctions revert partially and late after successful direct-acting antiviral treatment. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019; 9: 190. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00190>
- Elmasry S., Wadhwa S., Bang B.R., Cook L., Chopra S., Kanel G., et al. Detection of occult hepatitis C virus infection in patients who achieved a sustained virologic response to direct-acting antiviral agents for recurrent infection after liver transplantation. *Gastroenterology*. 2017; 152(3): 550–53.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.11.002>
- Wang Y., Rao H., Chi X., Li B., Liu H., Wu L., et al. Detection of residual HCV-RNA in patients who have achieved sustained virological response is associated with persistent histological abnormality. *EBioMedicine*. 2019; 46: 227–35. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.07.043>
- Holmes J.A., Yu M.L., Chung R.T. Hepatitis B reactivation during or after direct acting antiviral therapy – implication for susceptible individuals. *Expert Opin. Drug Saf.* 2017; 16(6): 651–72. <https://doi.org/10.1080/14740338.2017.1325869>
- Ghweil A.A., Helal M.M. Reactivation of herpesvirus in patients with hepatitis C treated with direct-acting antiviral agents. *Infect. Drug Resist.* 2019; 12: 759–62. <https://doi.org/10.2147/IDR.S184598>
- Verma R., Khanna P., Chawla S. Hepatitis C vaccine. Need of the hour. *Hum. Vacc. Immunother.* 2014; 10(7): 1927–9. <https://doi.org/10.4161/hv.29033>
- Bailey J.R., Barnes E., Cox A.L. Approaches, progress, and challenges to hepatitis C vaccine development. *Gastroenterology*. 2019; 156(2): 418–30. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.060>
- Ploss A., Kapoor A. Animal models of hepatitis C virus infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2020; 10(5): a036970. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a036970>
- Ahlén G., Frelin L. Methods to evaluate novel hepatitis C virus vaccines. *Methods Mol. Biol.* 2016; 1403: 221–44. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3387-7\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3387-7_11)
- Andrianov A.K., Fuerst T.R. Immunopotentiating and delivery systems for HCV vaccines. *Viruses*. 2021; 13(6): 981. <https://doi.org/10.3390/v13060981>
- Sepulveda-Crespo D., Resino S., Martinez I. Innate immune response against hepatitis C virus: targets for vaccine adjuvants. *Vaccines (Basel)*. 2020; 8(2): 313. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020313>
- Gaur M., Misra C., Yadav A.B., Swaroop S., Maolmhuaidh F.O., Bechelany M., et al. Biomedical applications of carbon nanomaterials: fullerenes, quantum dots, nanotubes, nanofibers, and graphene. *Materials (Basel)*. 2021; 14(20): 5978. <https://doi.org/10.3390/ma14205978>
- Barzegar A., Naghizadeh E., Zakariazadeh M., Azamat J. Molecular dynamics simulation study of the HIV-1 protease inhibit ion using fullerene and new fullerene derivatives of carbon nanostructures. *Mini Rev. Med. Chem.* 2017; 17(7): 633–47. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160609080157>
- Hurmach V., Platonov M., Prylutska S., Klestova Z., Cherepanov V., Prylutsky Y., et al. Anticoronavirus activity of water-soluble pristine C60 fullerenes: in vitro and in silico screenings. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2021; 1352: 159–72. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-85109-5\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-030-85109-5_10)
- Klimova R., Andreev S., Momotyuk E., Demidova N., Fedorova N., Chernoryzh Y., et al. Aqueous fullerene C60 solution suppresses herpes simplex virus and cytomegalovirus infections. *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostructures*. 2019; 28(6): 487–99. <https://doi.org/10.1080/1536383x.2019.1706495>
- Reina G., Peng S., Jacquemin L., Andrade A.F., Bianco A. Hard nanomaterials in time of viral pandemics. *ACS nano*. 2020; 14(8): 9364–88. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c04117>
- Shershakova N., Baraboshkina E., Andreev S., Purgina D., Struchkova I., Kamyschnikov O., et al. Anti-inflammatory effect of fullerene C60 in a mice model of atopic dermatitis. *J. Nanobiotechnology*. 2016; 14: 8. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0159-z>
- Kuznietsova H., Dziubenko N., Hurmach V., Chereschuk I., Motuziuk O., Ogloblya O., et al. Water-soluble pristine C60 fullerenes inhibit liver fibrotic alteration and prevent liver cirrhosis in rats. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020; 2020: 8061246. <https://doi.org/10.1155/2020/8061246>
- Liu J., Feng X., Chen Z., Yang X., Shen Z., Guo M., et al. The adjuvant effect of C60(OH)<sub>22</sub> nanoparticles promoting both humoral and cellular immune responses to HCV recombinant proteins. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2019; 97: 753–9. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.12.088>
- Xu L., Liu Y., Chen Z., Li W., Liu Y., Wang L., et al. Morphologically virus-like fullereneol nanoparticles act as the dual-functional nanoadjuvant for HIV-1 vaccine. *Adv. Mater.* 2013; 25: 5928–36. <https://doi.org/10.1002/adma.201300583>
- Andreev S., Purgina D., Bashkatova E., Garshev A., Maerle A., Andreev I., et al. Study of fullerene aqueous dispersion prepared by novel dialysis method: simple way to fullerene aqueous solution. *Fuller. Nanotub. Carbon Nanostructures*. 2015; 23(9): 792–800. <https://doi.org/10.1080/1536383x.2014.998758>
- Shershakova N.N., Andreev S.M., Tomchuk A.A., Makarova E.A., Nikonova A.A., Turetskiy E.A., et al. Wound healing activity of aqueous dispersion of fullerene C60 produced by “green technology”. *Nanomedicine*. 2023; 47: 102619. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2022.102619>
- Ivanov A.V., Korovina A.N., Tunitskaya V.L., Kostyuk D.A., Rechinsky V.O., Kukhanova M.K., et al. Development of the system ensuring a high-level expression of hepatitis C virus nonstructural NS5B and NS5A proteins. *Protein Expr. Purif.* 2006; 48(1): 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2006.02.011>
- Himoudi N., Abraham J.D., Fournillier A., Lone Y.C., Joubert A., Op De Beeck A., et al. Comparative vaccine studies in HLA-A2.1-transgenic mice reveal a clustered organization of epitopes presented in hepatitis C virus natural infection. *J. Virol.* 2002; 76(24): 12735–46. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.12735-12746.2002>
- Ikram A., Zaheer T., Awan F.M., Obaid A., Naz A., Hanif R., et al. Exploring NS3/4A, NS5A and NS5B proteins to design conserved subunit multi-epitope vaccine against HCV utilizing immunoinformatics approaches. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 16107. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34254-5>
- Nitschke K., Barriga A., Schmidt J., Timm J., Viazov S., Kuntzen T., et al. HLA-B\*27 subtype specificity determines targeting and viral evolution of a hepatitis C virus-specific CD8+ T cell epitope. *J. Hepatol.* 2014; 60(1): 22–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.08.009>
- Tan A.C., Eriksson E.M., Kedzierska K., Deliyannis G., Valkenburg S.A., Zeng W., et al. Polyfunctional CD8(+) T

- cells are associated with the vaccination-induced control of a novel recombinant influenza virus expressing an HCV epitope. *Antiviral Res.* 2012; 94(2): 168–78. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.03.009>
32. Vertuani S., Bazzaro M., Gualandi G., Micheletti F., Marastoni M., Fortini C., et al. Effect of interferon-alpha therapy on epitope-specific cytotoxic T lymphocyte responses in hepatitis C virus-infected individuals. *Eur. J. Immunol.* 2002; 32(1): 144–54. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200201\)32:1<144::AID-IMMU144>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200201)32:1<144::AID-IMMU144>3.0.CO;2-X).
  33. Masalova O.V., Lesnova E.I., Ivanov A.V., Pichugin A.V., Permyakova K.Yu., Smirnova O.A., et al. Comparative analysis of the immune response to DNA constructions encoding hepatitis C virus nonstructural proteins. *Voprosy virusologii.* 2013; 58(2): 21–8. (in Russian)
  34. Ivanov A.V., Smirnova O.A., Ivanova O.N., Masalova O.V., Kochetkov S.N., Isagulians M.G. Hepatitis C virus proteins activate NRF2/ARE pathway by distinct ROS-dependent and independent mechanisms in HUH7 cells. *PLoS One.* 2011; 6(9): e24957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024957>
  35. Rao X., Hoof I., van Baarle D., Kesmir C., Textor J. HLA preferences for conserved epitopes: a potential mechanism for hepatitis C clearance. *Front. Immunol.* 2015; 6: 552. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00552>
  36. Masalova O.V., Shepelev A.V., Atanadze S.N., Parnes Z.N., Romanova V.S., Vol'pina O.M., et al. Immunostimulating effect of water-soluble fullerene derivatives--perspective adjuvants for a new generation of vaccine. *Doklady RAN.* 1999; 369(3): 411–3. (in Russian)
  37. Shershakova N.N., Baraboshkina E.N., Andreev S.M., Shabanova D.D., Smirnov V.V., Kamyshnikov O.Yu., et al. Fullerene C60 aqueous solution does not show acute toxicity. *Immunologiya.* 2016; 37(6): 325–9. <https://doi.org/10.18821/0206-4952-2016-37-6-325-329> (in Russian)
  38. Funakoshi-Tago M., Miyagawa Y., Ueda F., Mashino T., Moriwaki Y., Tago K., et al. A bis-malonic acid fullerene derivative significantly suppressed IL-33-induced IL-6 expression by inhibiting NF-kappaB activation. *Int. Immunopharmacol.* 2016; 40: 254–64. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.08.031>
  39. Bashkatova E.N., Andreev S.M., Shershakova N.N., Babakhin A.A., Shilovskiy I.P., Khaitov M.R. Study of modulating effects of fullerene [C60] adducts on the reaction of delayed-type hypersensitivity. *Fiziologiya i patologiya immunnoy sistemy.* 2012; 16(2): 17–27. (in Russian)
  40. Yamashita K., Sakai M., Takemoto N., Tsukimoto M., Uchida K., Yajima H., et al. Attenuation of delayed-type hypersensitivity by fullerene treatment. *Toxicology.* 2009; 261(1-2): 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.04.034>

## НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-151>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

# Определение специфического Т-клеточного иммунитета к антигенам вируса SARS-CoV-2 у людей, переболевших COVID-19

Бляхер М.С., Фёдорова И.М., Тульская Е.А., Капустин И.В., Котелева С.И.,  
Рамазанова З.К., Одинцов Е.Е., Сандалова С.В., Новикова Л.И.ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора,  
125212, г. Москва, Россия

**Введение.** Развитие пандемии, связанной с COVID-19, послужило стимулом к научным исследованиям, направленным на изучение механизмов формирования иммунитета против SARS-CoV-2. В настоящее время имеется необходимость разработки отечественного специфического, несложного и экономичного метода, пригодного для мониторинга в популяции Т-клеточного ответа в отношении SARS-CoV-2 у переболевших и вакцинированных людей.

**Цель** работы заключалась в отработке скринингового метода оценки специфического Т-клеточного иммунитета в отношении SARS-CoV-2.

**Материалы и методы.** Обследованы 40 человек, перенёвших COVID-19 лёгкой или средней степени тяжести, и 20 здоровых добровольцев, не имевших в анамнезе данного заболевания. Серологические исследования по наличию и уровню антител класса IgG и IgM к SARS-CoV-2 проводили методом ИФА на тест-системах АО «Вектор-Бест». Антигенную стимуляцию мононуклеаров проводили на коммерческих планшетах с сорбированным цельновирионным инактивированным антигеном SARS-CoV-2 (ФБУН ГНЦ «Вектор», Россия). Концентрацию IFN- $\gamma$  определяли методом ИФА на тест-системах АО «Вектор-Бест». Иммунофенотипирование лимфоцитов проводили на проточном цитометре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ Microsoft Excel и Statistica 10.

**Результаты.** Стимуляция цельновирионным инактивированным антигеном SARS-CoV-2, фиксированным на дне лунок полистиролового планшета, мононуклеарных клеток, выделенных из периферической крови доноров, показала значительно более высокий медианный ответ по продукции IFN- $\gamma$  у 40 человек, перенёвших COVID-19, по сравнению с 20 здоровыми донорами крови (172,1 [34,3–575,1] пг/мл против 15,4 [6,9–25,8] пг/мл,  $p < 0,0001$ ). Не было различий в медианном уровне IFN- $\gamma$  в супернатантах, собранных с нестимулированных мононуклеарных клеток от переболевших COVID-19 и здоровых доноров (2,7 [0,4–11,4] пг/мл против 0,8 [0,0–23,3] пг/мл;  $p < 0,05$ ). Общая чувствительность и специфичность метода составляли 73% (95% доверительный интервал (ДИ) 58–88%) и 100% (95% ДИ 100–100%) соответственно при пороговом значении 50 пг/мл.

**Заключение.** Разработанный способ определения клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2 может быть использован в качестве скринингового для мониторинга в популяции Т-клеточного ответа в отношении новой коронавирусной инфекции у переболевших людей.

**Ключевые слова:** Т-клеточный иммунитет; антигены SARS-CoV-2; продукция IFN- $\gamma$ ; скрининг; цельновирионный инактивированный антиген; клеточный иммунный ответ

**Для цитирования:** Бляхер М.С., Фёдорова И.М., Тульская Е.А., Капустин И.В., Котелева С.И., Рамазанова З.К., Одинцов Е.Е., Сандалова С.В., Новикова Л.И. Определение специфического Т-клеточного иммунитета к антигенам вируса SARS-CoV-2 у людей, переболевших COVID-19. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(6): 527-537. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-151>

**Для корреспонденции:** Бляхер Мария Сергеевна, д-р мед. наук, профессор ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, г. Москва, Россия. E-mail: maria.s.b@bk.ru

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

**Финансирование.** Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

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

**Этическое утверждение.** Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Исследование одобрено этическим комитетом ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора (протокол № 41 от 10 декабря 2020 г.).

Поступила 01.11.2022

Принята в печать 10.12.2022

Опубликована 30.12.2022

## ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-151>

# Assesment of specific T-cell immunity to SARS-CoV-2 virus antigens in COVID-19 reconvalescents

Mariya S. Blyakher, Irina M. Fedorova, Elena A. Tulskeya, Ivan V. Kapustin, Svetlana I. Koteleva, Zarema K. Ramazanova, Evgeny E. Odintsov, Svetlana V. Sandalova, Lidia I. Novikova

G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russia

**Introduction.** The development of the COVID-19 pandemic has stimulated the scientific research aimed at studying of the mechanisms of formation the immunity against SARS-CoV-2. Currently, there is a need to develop a domestic simple and cost-effective specific method suitable for monitoring of T-cell response against SARS-CoV-2 in reconvalescents and vaccinated individuals.

**Aim:** Development of a screening method for evaluation specific T-cell immunity against SARS-CoV-2.

**Materials and methods.** Total 40 individuals who had mild to moderate COVID-19 and 20 healthy volunteers who did not have a history of this disease were examined. The presence and levels of IgG and IgM antibodies to SARS-CoV-2 were identified in participant's sera by ELISA using the diagnostic kits from JSC "Vector-Best" (Novosibirsk, Russian Federation). Antigenic stimulation of mononuclear cells was carried out on commercial plates with adsorbed whole-virion inactivated SARS-CoV-2 antigen (State Research Center of Virology and Biotechnology VECTOR Novosibirsk, Russian Federation). The concentration of IFN- $\gamma$  was measured in ELISA using the test systems from JSC "Vector-Best" (Novosibirsk, Russian Federation). The immunophenotyping of lymphocytes was performed on a flow cytometer Cytomics FC500 (Beckman Coulter, USA). Statistical data processing was carried out using the Microsoft Excel and STATISTICA 10 software package.

**Results.** Stimulation of mononuclear cells isolated from the peripheral blood with whole-virion inactivated SARS-CoV-2 antigen fixed at the bottom of the wells of a polystyrene plate showed a significantly higher median response in terms of IFN- $\gamma$  production in 40 people who had history of COVID-19 compared to 20 healthy blood donors (172.1 [34.3–575.1] pg/ml versus 15.4 [6.9–25.8] pg/ml,  $p < 0.0001$ ).

There was no difference in median IFN- $\gamma$  levels in supernatants collected from unstimulated mononuclear cells from COVID-19 reconvalescents and healthy donors (2.7 [0.4–11.4] pg/ml versus 0.8 [0.0–23.3] pg/ml,  $p < 0.05$ ). The overall sensitivity and specificity of this method were 73% (95% CI 58–88%) and 100% (95% CI 100–100%), respectively, at a cut-off of 50 pg/ml.

**Conclusion.** The developed method for assessment of the cellular immune response to SARS-CoV-2 can be used as a screening method for monitoring the T-cell response in a population against a new coronavirus infection in recovered people.

**Keywords:** *T-cell immunity; SARS-CoV-2 antigens; IFN- $\gamma$  production; screening; whole virion inactivated antigen; cellular immune response*

**For citation:** Blyakher M.S., Fedorova I.M., Tulskeya E.A., Kapustin I.V., Koteleva S.I., Ramazanova Z.K., Odintsov E.E., Sandalova S.V., Novikova L.I. Assesment of specific T-cell immunity to SARS-CoV-2 virus antigens in COVID-19 reconvalescents. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(6): 527-537 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-151>

**For correspondence:** Maria S. Blyakher, Dr. Sci. (Med.), G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 125212, Moscow, Russia. E-mail: [maria.s.b@bk.ru](mailto:maria.s.b@bk.ru)

**Information about the authors:**

Blyakher M.S., <https://orcid.org/0000-0003-3480-6873>

Fedorova I.M., <https://orcid.org/0000-0002-0335-2752>

Tulskeya E.A., <https://orcid.org/0000-0003-1969-4009>

Kapustin I.V., <https://orcid.org/0000-0001-6191-260X>

Koteleva S.I., <https://orcid.org/0000-0003-1878-2234>

Ramazanova Z.K., <https://orcid.org/0000-0002-9314-3312>

Odintsov E.E., <https://orcid.org/0000-0001-5895-2520>

Sandalova S.V., <https://orcid.org/0000-0002-4548-9888>

Novikova L.I., <https://orcid.org/0000-0002-0307-4561>

**Contribution:** All authors made a significant contribution to the experimental 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 no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Ethics approval.** The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the G.N. Gabrichevsky Institute of Epidemiology and Microbiology (protocol No. 41 dated Dec. 10, 2020).

Received 01 November 2022

Accepted 10 December 2022

Published 30 December 2022

## Введение

Стремительное развитие пандемии, связанной с коронавирусом SARS-CoV-2, и тяжесть протекания заболевания COVID-19 послужили стимулом к научным исследованиям, направленным на изучение патогенеза данного заболевания, поиск способов его лечения, механизмов формирования иммунитета против SARS-CoV-2 и разработку вакцин.

В целом ряде исследований после активации лимфоцитов антигенами SARS-CoV-2 были выявлены Т-клетки памяти среди как CD4<sup>+</sup>, так и CD8<sup>+</sup> в большинстве образцов мононуклеаров из крови взрослых пациентов с COVID-19 (80–100 и 70–80% соответственно) [1–8]. Установлено, что формирование этих клеток вызывается широким кругом структурных и неструктурных белков вируса, выявлено множество иммунодоминантных эпитопов. Оценивались специфичность, величина и кинетика ответа у пациентов, связь этих аспектов с тяжестью заболевания [9–11]. Изучали значение перекрёстной реактивности Т-клеток памяти к сезонным коронавирусам (OC43, HKU1, NL63 и 229E) для тяжести течения COVID-19 [12].

При разработке вакцин против SARS-CoV-2 стимуляция не только гуморального, но и Т-клеточного иммунитета рассматривалась как важный целевой пункт [13–16]. Для этого требуются скрининговые методы, отвечающие следующим требованиям:

- невысокая стоимость;
- отсутствие необходимости в высокотехнологичном оборудовании;
- отсутствие необходимости в большом объёме крови пациента;
- возможность получения ответа в короткие сроки.

Кандидаты в такие методы были разработаны в 2020 г. и относятся к группе технологий IGRA (Interferon Gamma Releasing Assay – тесты, основанные на регистрации антиген-стимулированного выделения интерферона гамма (IFN- $\gamma$ )).

В наборе «Тигра-Тест SARS-CoV-2» результат обследования достигается использованием готовой комбинации пептидов S-белка (AG1) и комбинации пептидов белков N, M, ORF3a и ORF7a (AG2), измерение проводится на оборудовании для ELISPOT и требует соответствующей квалификации сотрудников, а также содержит дорогостоящие реагенты [17].

Технология QuantiFERON, как и ELISPOT, относится к группе технологий IGRA. Первоначально эта технология имела коммерческую реализацию в виде набора для диагностики Т-клеточного иммунитета против туберкулёза (QuantiFERON-TB Gold), затем для диагностики Т-клеточного иммунитета против цитомегаловирусной инфекции (QuantiFERON-CMV), а в настоящее время и против SARS-CoV-2 (QuantiFERON SARS-CoV-2)<sup>1</sup>. Набор реагентов

QuantiFERON SARS-CoV-2 предназначен для определения клеточного ответа к пептидным антигенам S1/S2 RBD из спайкового белка коронавируса SARS-CoV-2 по уровню продукции IFN- $\gamma$  в образцах цельной гепаринизированной крови. Для реализации метода цельную кровь делят на 4 порции: негативный контроль (QuantiFERON Nil), позитивный контроль (QuantiFERON Mitogen), антиген S1, антиген S2 RBD (QuantiFERON AntigenTube). Полученные 4 пробирки (по 1 мл крови в каждой) сутки инкубируют в термостате, затем отделяют плазму центрифугированием. Уровень продукции IFN- $\gamma$  определяют методом иммуноферментного анализа (ИФА). Однако реализация данного метода требует использования реагентов от зарубежных производителей, что делает его неэкономичным и усложняет его применение для массовых исследований.

В связи с вышеперечисленным имеется необходимость разработки отечественного специфичного, несложного и экономичного метода, пригодного для мониторинга в популяции Т-клеточного ответа в отношении SARS-CoV-2 у переболевших и вакцинированных людей.

**Цель** работы заключалась в отработке скринингового метода оценки активации специфического Т-клеточного иммунитета, предназначенного для наблюдения за формированием иммунологической памяти в отношении SARS-CoV-2 у людей, переболевших COVID-19.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- оценить специфичность антигенной стимуляции лимфоцитов, выделенных из крови людей, переболевших COVID-19, в лунках готовых полистироловых планшетов ИФА-тест-систем;
- оценить иммунофенотип лимфоцитов, активирующихся при стимуляции антигенами SARS-CoV-2;
- оценить чувствительность и специфичность предлагаемого метода.

## Материалы и методы

Клинические образцы цельной венозной крови и сыворотки были получены от 60 человек обоего пола в возрасте 18–70 лет, постоянно проживающих в Московском регионе. В число обследованных включены: 40 человек, перенёсших COVID-19 лёгкой или средней степени тяжести в период с декабря 2020 г. по октябрь 2021 г. (диагностика и лечение проведены в поликлиниках и клиниках г. Москвы); 20 здоровых добровольцев, не имеющих в анамнезе данного заболевания и планирующих вакцинацию против инфекции SARS-CoV-2. Работы с клиническим материалом проводились в соответствии с международными этическими нормами при информированном добровольном согласии обследуемых. Исследование одобрено этическим комитетом ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Г.Н. Габричевского» (МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского) (протокол № 41 от 10 декабря 2020 г.).

Переболевшие COVID-19 обследовались через 1–1,5 месяца после перенесённого заболевания,

<sup>1</sup>QuantiFERON SARS-CoV-2 RUO. A comprehensive immune response assessment toolset to maximize T cell immune response research insights. Available at: <https://www.qiagen.com/us/products/diagnostics-and-clinical-research/infectious-disease/quantiferon-sars-cov-2-ruo?clear=true#orderinginformation>

здоровый контроль – непосредственно перед вакцинацией (в день введения 1-го компонента вакцины).

Кровь брали в пробирки с гепарином (4 мл крови для исследования лимфоцитов) и в пробирки с активатором образования сгустка (2 мл крови на сыворотку).

Антитела (АТ) класса IgG к SARS-CoV-2 определяли методом ИФА на тест-системе SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ (АО «Вектор-Бест», Россия, № РЗН 2020/10388 от 18.05.2020), антитела класса IgM к SARS-CoV-2 определяли методом ИФА на тест-системе SARS-CoV-2-IgM-ИФА-БЕСТ (АО «Вектор-Бест», Россия, № РЗН 2020/10389 от 18.05.2020 г.) в соответствии с инструкцией разработчика. Трактовка результатов ИФА-тестирования проводилась в зависимости от коэффициента позитивности (КП). Реакция отрицательна при  $KП < 0,8$ , положительна при  $KП \geq 1,1$ , сомнительна при  $0,8 \leq KП < 1,1$ .

Мононуклеары выделяли из цельной венозной крови в градиенте плотности Histopaque-1077, разводили до концентрации  $5 \times 10^6$ /мл в полной среде RPMI-1640 (ООО «ПанЭко», Россия) с антибиотиками и 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FCS). Доля лимфоцитов среди выделенных мононуклеаров колебалась от 85 до 92%.

Для антигенной стимуляции мононуклеаров использовали коммерческие полистироловые 96-луночные планшеты с сорбированным цельновирионным инактивированным антигеном SARS-CoV-2, предназначенные для выявления IgG-антител к SARS-CoV-2 (производство ФБУН ГИЦ «Вектор», № РЗН 2020/10017 от 10.04.2020). Митогенную стимуляцию лимфоцитов проводили в лунках другого полистиролового планшета фитогемагглютинином Р (Sigma, США). Планшеты инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Для контроля специфичности антигенной стимуляции использовали полистироловые планшеты, предназначенные для выявления IgG-антител к вирусу денге (Vircell, S.L., Испания, REF-G1018), с сорбированным вирусом денге (тип 1 – штамм Гавайи, тип 2 – Новая Гвинея, тип 3 – штамм H87 и тип 4 – штамм H241) – возбудителем, с которым большинство жителей Московского региона не контактировало. Спонтанная продукция IFN- $\gamma$  оценивалась в пробах, инкубированных в аналогичных условиях без антигена.

Супернатанты, собранные через 24 ч культивирования, хранили до исследования в замороженном состоянии (-40 °С). Концентрацию IFN- $\gamma$  определяли методом ИФА на тест-системах фирмы АО «Вектор-Бест» (№ РЗН 2017/16008 от 24.07.2017). Результаты учитывали как разницу ( $\Delta$ ) между антиген-стимулированной и спонтанной продукцией IFN- $\gamma$  и представляли в виде медианы (Me) и межквартильного диапазона [Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>]. В качестве порогового значения концентрации IFN- $\gamma$  использовали 50 пг/мл (среднее значение различий между концентрациями IFN- $\gamma$ , измеренными в триплетах, при определении уровня антиген-стимулированной продукции IFN- $\gamma$  выделенными лимфоцитами).

Имунофенотип активированных лимфоцитов определяли на проточном цитометре Cytomics FC 500 (Beck-

man Coulter, США) с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, США), которые содержали следующие флюоресцентные метки: CD69-PC5, CD3-FITC, CD8-PC7, CD4-PE, CD(16+56)-PE. Для исследования применяли две комбинации флюоресцентно меченных антител (CD69, CD3, CD8, CD4), которая давала сведения о количестве активированных Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>), активированных цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>) или (CD69, CD3, CD8, CD(16+56)), с помощью которой оценивали количество активированных NK (CD3<sup>-</sup>CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>) и NKT-клеток (CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>). Результаты учитывали как разницу ( $\Delta$ ) между интактной пробой и SARS-CoV-2-стимулированной пробой и представляли в виде медианы (Me) и межквартильного диапазона [Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>].

Статистический анализ данных проведен с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel и Statistica 10 (StatSoft Inc., США). Достоверность различий оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Справедливость проверяемой гипотезы исследования оценивали по величине *p* value, критическим значением которой считали *p* < 0,05.

## Результаты

Исследование проводилось с декабря 2020 г. по октябрь 2021 г. среди лиц, постоянно проживающих в Московском регионе. По данным интернет-ресурса GoGov<sup>2</sup>, с момента начала вакцинации в РФ по май 2021 г. в Москве против SARS-CoV-2 был вакцинирован 1 млн 500 тыс. человек, количество людей с активной инфекцией оценивалось в 1 млн 180 тыс. К началу сентября эти цифры увеличились до 3 млн 611 тыс. и 1 млн 568 тыс. соответственно. Таким образом, в период исследования (особенно в его начале) возможность подбора неиммунного контроля была высокой.

У всех обследованных одновременно с забором крови для исследования Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 в сыворотке крови определяли концентрацию антител против того же вируса.

Все переболевшие COVID-19 через 1–1,5 месяца после выздоровления имели антитела класса IgG (среднее значение коэффициента позитивности КП =  $11,5 \pm 1,1$ ), 25 человек сохраняли антитела класса IgM (КП =  $3,3 \pm 0,4$ ). Здоровые лица, обследованные на неиммунный контроль, не имели определяемых уровней специфических АТ ни в одном из проводимых тестов.

Стимуляция цельновирионным инактивированным антигеном SARS-CoV-2 мононуклеарных клеток, выделенных из периферической крови доноров, показала значительно более высокий медианный ответ IFN- $\gamma$  у 40 человек, перенёсших COVID-19, по сравнению с 20 здоровыми донорами крови (172,1 [34,3–575,1] пг/мл

<sup>2</sup>Статистика вакцинации от COVID-19 в Москве. Доступно на: <https://gogov.ru/covid-v-stats/msk#data>

против 15,4 [6,9–25,8] пг/мл;  $p < 0,0001$ ). Не было различий в медианном уровне IFN- $\gamma$  в супернатантах, собранных с нестимулированных мононуклеарных клеток от переболевших COVID-19 и здоровых доноров (2,7 [0,4–11,4] пг/мл против 0,8 [0,0–23,3] пг/мл;  $p < 0,05$ ). Увеличение продукции IFN- $\gamma$  лимфоцитами в присутствии этого антигена у половины пациентов происходила даже интенсивнее, чем теми же лимфоцитами, стимулированными митогеном фитогемагглютинином (107,5 [43,4–261,5] пг/мл).

Используя индекс Юдена [18], подсчитали, что общая чувствительность и специфичность составляли 73% (95% доверительный интервал (ДИ) 58–88%)

и 100% (95% ДИ 100–100%) соответственно при пороговом значении 50 пг/мл.

В нашем исследовании было показано, что при культивировании образцов клеток с цельновирионным инактивированным антигеном SARS-CoV-2 происходит специфическая активация лимфоцитов, выделенных из крови переболевших COVID-19 людей. В табл. 1 и 2 для доноров, у которых было достаточное количество мононуклеарных клеток для стимуляции всеми видами антигенов и митогеном, представлен ответ *in vitro* не только на вирусные частицы SARS-CoV-2, но и на аналогичный антигенный материал, полученный на основе вируса – возбудите-

**Таблица 1. Продукция IFN- $\gamma$  мононуклеарными клетками периферической крови доноров, перенёсших COVID-19**

**Table 1. IFN- $\gamma$  production by peripheral blood mononuclear cells from COVID-19 reconvalescents**

№ донора Donor's ID	Продукция IFN- $\gamma$ , пг/мл IFN- $\gamma$ production, pg/ml				
	спонтанная Spontaneous	стимулированная вирусом SARS-CoV-2 Stimulated by a SARS-CoV-2 virus	$\Delta_1$	стимулированная вирусом денге Stimulated by the dengue virus	$\Delta_2$
1	2,5	27,9	25,4	16,6	14,1
2	7,1	99,2	92,2	20,3	13,2
3	9,3	35,8	26,5	9,7	0,4
4	1,3	27,9	26,6	3,8	2,5
5	5,9	39,5	33,6	10,2	4,3
6	3,0	46,1	43,1	11,2	8,1
7	1,1	96,7	95,6	28,9	27,8
8	7,4	64,1	56,7	26,7	19,3
9	0,0	40,5	40,5	0,0	0,0
10	20,3	75,7	55,4	0,7	0,0
11	29,6	246,8	217,2	35,4	5,8
12	2,7	204,1	201,4	14,9	12,3
13	4,3	86,1	81,8	15,3	11,0
14	4,6	122,2	117,5	22,4	17,8
15	1,3	81,0	79,7	2,8	1,5
16	1,5	255,1	253,6	3,4	1,9
17	1,5	81,1	79,6	2,2	0,7
18	2,0	32,5	30,5	2,2	0,2
19	18,1	359,0	340,9	13,5	0,0
20	14,3	1703,8	1689,5	15,2	1,0
21	1,3	716,3	714,9	8,3	7,0
22	85,3	623,2	537,9	111,0	25,7
23	0,0	198,5	198,5	2,0	2,0
24	0,0	425,9	425,9	22,0	22,0
25	11,9	184,8	172,8	14,5	2,6
26	23	1245,1	1221,9	47,0	23,7
27	0,2	56,5	56,3	1,8	1,6
28	1,5	67,1	65,6	2,5	1,0
29	0,0	230,0	230,0	10,5	10,5
30	0,0	184,5	184,5	15,5	15,5
31	33,8	121,2	87,4	35,7	1,9

**Примечание.**  $\Delta_1$  – разность между спонтанной и SARS-CoV-2-индуцированной продукцией;  $\Delta_2$  – разность между спонтанной и индуцированной вирусом денге продукцией.

**Note.**  $\Delta_1$  – difference between spontaneous and SARS-CoV-2-induced production;  $\Delta_2$  – difference between spontaneous and dengue virus induced production.

ля лихорадки денге.

Из **табл. 1** видно, что для каждого из обследованных людей, перенёвших COVID-19, увеличение продукции IFN- $\gamma$  при стимуляции их мононуклеаров на ИФА-планшете, содержащем цельновирионный антиген SARS-CoV-2, превышает таковую при стимуляции на планшете с антигенами вируса денге в 1,5–40 раз, а само увеличение этого ответа на вирус денге у половины доноров не превышает 5 пг/мл.

Из **табл. 2** видно, что у лиц, не болевших COVID-19, реакция мононуклеаров на антигены SARS-CoV-2 практически такая же низкая, как и на антигены вируса денге.

Медианы ответов IFN- $\gamma$  и межквартильный диапазон на АГ-стимуляцию мононуклеаров людей, перенёвших COVID-19 (группа 1) и не болевших им (группа 2), представлены в **табл. 3**.

Статистическая обработка результатов данного исследования, приведённая в **табл. 3**, показывает, что после стимуляции *in vitro* антигенами SARS-CoV-2, фиксированными в лунках полистиролового планшета, продукция IFN- $\gamma$  мононуклеарными клетками периферической крови доноров, не болевших

COVID-19, значимо ниже, чем у лиц, перенёвших это заболевание. На стимуляцию антигенами вируса денге, не связанными с SARS-CoV-2, и также фиксированными в лунках полистиролового планшета, реакция мононуклеаров в обеих группах была низкой и практически одинаковой.

По данным литературы [19, 20], распознавание антигена клетками памяти и запуск ими синтеза IFN- $\gamma$  свойственны Т-лимфоцитам. В нашем исследовании также было необходимо показать, что запуск реакции активации обеспечивается именно антигенспецифическими Т-лимфоцитами.

Для количественной оценки активации Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) или цитотоксических лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) после их стимуляции антигенами SARS-CoV-2, поместили четырёхкомпонентной смесью флюоресцентно меченных моноклональных антител: CD3-FITC, CD4-PE, CD8-PC7, CD69-PC5 и исследовали на проточном цитометре.

В **табл. 4** представлены результаты иммунофенотипирования SARS-CoV-2-стимулированных лимфоцитов у 25 пациентов, перенёвших COVID-19, и 20 здоровых доноров в виде  $\Delta$  изменения процента лимфо-

**Таблица 2. Продукция IFN- $\gamma$  мононуклеарными клетками периферической крови доноров, не болевших COVID-19**

**Table 2. Production of IFN- $\gamma$  by peripheral blood mononuclear cells of donors who had no history of COVID-19**

№ донора Donor's No.	Продукция IFN- $\gamma$ , пг/мл IFN- $\gamma$ production, pg/ml				
	спонтанная Spontaneous	стимулированная вирусом SARS-CoV-2 Stimulated by a SARS-CoV-2 virus	$\Delta_1$	стимулированная вирусом денге Stimulated by the dengue virus	$\Delta_2$
1	58,3	58,3	0,0	65,9	7,5
2	0,3	6,9	6,6	0,8	0,5
3	2,4	3,0	0,6	3,0	0,6
4	0,0	1,9	1,9	0,0	0,0
5	26,3	26,3	0,0	26,3	0,0
6	2,7	19,5	16,8	19,5	16,8
7	35,1	35,1	0,0	12,4	0,0
8	23,9	26,2	2,3	11,3	0,0
9	0,0	3,2	3,2	1,2	1,2
10	0,0	2,0	2,0	0	0,0
11	0,0	11,1	11,1	0	0,0
12	0,0	7,6	7,6	0	0,0
13	0,0	12,3	12,3	0,0	0,0
14	3,1	15,4	12,4	22,5	19,4
15	0,8	21,8	21,0	23,3	22,5
16	1,4	20,1	18,7	9,9	8,5
17	23,3	25,9	2,6	24,8	1,5
18	0,0	16,4	16,4	0,0	0,0
19	0,0	13,9	13,9	21,6	21,6

**Примечание.**  $\Delta_1$  – разность между спонтанной и SARS-CoV-2-индуцированной продукцией;  $\Delta_2$  – разность между спонтанной и индуцированной вирусом денге продукцией.

**Note.**  $\Delta_1$  – difference between spontaneous and SARS-CoV-2-induced production;  $\Delta_2$  – difference between spontaneous and dengue virus induced production.

**Таблица 3. Медианы [ $Q_1$ – $Q_3$ ] продукции IFN- $\gamma$  у людей, перенёвших COVID-19 (группа 1) и не болевших им (группа 2), пг/мл**  
**Table 3. Medians [ $Q_1$ – $Q_3$ ] of IFN- $\gamma$  production in COVID-19 reconvalescents (group 1) and participants who had no history of COVID-19 (group 2), pg/ml**

Варианты стимуляции Stimulation options	Группа 1 (n = 31) Group 1 (n = 31)	Группа 2 (n = 19) Group 1 (n = 19)
Спонтанная продукция Spontaneous modes	2,7 [1,3–11,9]	0,8 [0,0–23,3]
Продукция после стимуляции антигенами SARS-CoV-2 Production after stimulation with SARS-CoV-2 antigens	99,2 [26,5–246,8]	15,4 [6,9–25,8]
$\Delta_1$ – разница между спонтанной и индуцированной SARS-CoV-2 продукцией $\Delta_1$ – the difference between spontaneous and SARS-CoV-2 induced production	92,2* [55,4–230,0]	6,5 [1,9–13,9]
Продукция после стимуляции антигенами вируса денге Production after stimulation by dengue virus antigens	13,5 [2,8–22,0]	9,9 [0,0–22,5]
$\Delta_2$ – разница между спонтанной и индуцированной вирусом денге продукцией $\Delta_2$ – the difference between spontaneous and dengue induced products	4,3 [1,0–14,1]	0,5 [0,0–8,5]

**Примечание.** \*Различие между  $\Delta_1$  в группах 1 и 2 значимо при  $p < 0,001$  по критерию Манна–Уитни.

**Note.** \*The difference between  $\Delta_1$  in groups 1 and 2 is significant at  $p < 0.001$  according to the Mann–Whitney test.

**Таблица 4. Иммунофенотип лимфоцитов, активирующихся в присутствии антигенов SARS-CoV-2, и концентрация IFN- $\gamma$ , секретируемого ими в культуральную жидкость, Me [ $Q_1$ – $Q_3$ ]**

**Table 4. Immunophenotype of lymphocytes activated in the presence of SARS-CoV-2 antigens and the concentration of IFN- $\gamma$  secreted by them into the culture medium, Me [ $Q_1$ – $Q_3$ ]**

Группа Group	$\Delta$ увеличения лимфоцитов, экспрессирующих CD69 (%) $\Delta$ increase in lymphocytes expressing CD69 (%)		$\Delta$ концентрации IFN- $\gamma$ , пг/мл $\Delta$ IFN- $\gamma$ concentration, pg/ml
	среди CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> among CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	среди CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> among CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	
Пациенты, перенёвшие COVID-19 (n = 25) COVID-19 reconvalescents (n = 25)	2,7 [0,6–8,0]*	4,5 [1,5–13,1]*	172,0 [52,7–392,0]*
Здоровые люди (n = 20) Healthy volunteers (n = 20)	0,7 [0,3–1,9]	1,8 [0,8–3,7]	4,1 [1,6–9,8]

**Примечание.** \*Различие между группами значимо при  $p < 0,01$  по критерию Манна–Уитни.

**Note.** \*The difference between the groups is significant at  $p < 0.01$  according to the Mann–Whitney test.

цитов, экспрессирующих маркер ранней активации CD69. Кроме того, приведены результаты измерения продукции IFN- $\gamma$  (в виде  $\Delta$  концентрации, пг/мл) методом ИФА в супернатантах из соответствующих лунок ИФА-планшета.

У 5 из 25 обследованных переболевших людей не повышалась АГ-стимулированная продукция IFN- $\gamma$ . Однако у двух пациентов происходила активация лимфоцитов, которая выражалась увеличением доли CD8<sup>+</sup> Т-клеток, экспрессирующих маркер CD69 на клеточной мембране. У 20 человек, перенёвших COVID-19, в присутствии антигенов SARS-CoV-2 активируются как Т-хелперы, так и Т-цитотоксические лимфоциты, и активация последних выражается большей величиной  $\Delta$ . Кроме того, CD8<sup>+</sup> Т-клетки активировались у 19 человек, а CD4<sup>+</sup> Т-клетки – у 16. Активация обеих субпопуляций происходила у 10 человек.

Для оценки степени участия NK- и NKT-лимфоцитов в продукции IFN- $\gamma$ , стимулированной антигенами SARS-CoV-2, набор флюоресцентно меченных моноклональных антител был несколько изменён: CD3-FITC, CD(16+56)-PE, CD8-PC7, CD69-PC5. С помощью такой комбинации антител в одной и той

же пробе лимфоцитов непосредственно определялось количество активированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток, NK- и NKT-лимфоцитов, а также косвенно (как разница между процентом Т-клеток и CD8<sup>+</sup> Т-клеток) – количество активированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток.

Стимуляция лимфоцитов контрольным антигеном (вируса денге) в парных пробах одних и тех же пациентов (табл. 5) не вызывает активации CD8<sup>+</sup> Т-клеток и в меньшей степени затрагивает NK- и NKT-субпопуляции, чем стимуляция антигенами SARS-CoV-2 (в 4–8 раз). Сопровождающая этот процесс продукция IFN- $\gamma$  существенно ниже при стимуляции контрольным антигеном (примерно в 500 раз) с учётом того, что прирост активированных CD8<sup>+</sup> Т-клеток в пробах, стимулированных антигенами вируса денге, в 10 раз ниже, чем в пробах, стимулированных SARS-CoV-2.

### Обсуждение

В мировой научной литературе представлены работы о возможности применения технологии IGRA для диагностики крови *in vitro*, используемой в клинических лабораториях для измерения IFN- $\gamma$ , высвобождаемого антиген-специфическими Т-клетками после

**Таблица 5. Изменение иммунофенотипа Т- и NK-клеток и продукции IFN-γ при их стимуляции антигенами SARS-CoV-2 или вируса денге в группе пациентов после COVID-19 (индивидуальные данные)**

**Table 5. Changes in the immunophenotype of T- and NK-cells and IFN-γ production during their stimulation with SARS-CoV-2 or dengue virus antigens in the group of COVID-19 reconvalescents (individual data)**

№ пробы Sample No.	Лимфоциты активированы на планшете с антигенами SARS-CoV-2 Lymphocytes are activated on a plate with SARS-CoV-2 antigens					Лимфоциты активированы на планшете с антигенами вируса денге Lymphocytes are activated on a plate with dengue virus antigens				
	Th Δ%	CTL Δ%	NK Δ%	NKT Δ%	IFN-γ, пг/мл pg/ml	Th Δ%	CTL Δ%	NK Δ%	NKT Δ%	IFN-γ, пг/мл pg/ml
1	5,5	7,8	3,4	9,4	30,5	0,0	0,0	3,4	5,9	0,2
2	2,8	3,9	46,8	11,3	79,7	0,8	0,8	9,2	6,3	1,5
3	3,8	7,7	55,3	14,1	37,2	1,0	1,5	14,4	3,7	0,0
4	1,0	5,0	28,2	1,3	49,6	0,0	4,9	21,2	4,2	4,4
5	0,7	7,7	26,1	6,1	64,1	0,4	1,1	13,8	0,0	0,2
6	3,0	9,4	50,5	7,6	82,8	1,6	4,5	38,3	3,0	29,9
7	1,2	5,1	64,7	20,3	340,9	2,1	1,2	30,0	0,0	0,0
8	0,9	4,0	14,4	16,0	102,0	0,3	0,7	0,0	0,0	0,0
9	17,7	18,1	55,4	48,0	1600,4	1,0	0,0	0,3	3,0	0,0
10	13,5	2,1	37,5	28,2	714,9	4,5	0,0	19,4	5,7	7,0
11	8,5	25,2	64,2	39,9	1185,2	0,3	0,0	27,5	3,5	5,4
12	0,7	7,7	36,6	19,8	369,3	0,4	1,1	9,9	3,7	0,0
13	1,2	7,7	45,4	21,3	180,8	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0
Me [Q <sub>1</sub> -Q <sub>3</sub> ]	2,8* [1,0-5,5]	7,7* [5,0-7,8]	45,4* [28,2-55,3]	16* [9,4-21,3]	102* [64,1-369,3]	0,4 [0,3-1,0]	0,8 [0,0-1,2]	13,8 [3,4-21,2]	3,5 [0,0-4,2]	0,2 [0,0-4,4]

**Примечание.** \*Различия между значениями в пробах, стимулированных антигенами SARS-CoV-2, и значениями одноимённых параметров в пробах, стимулированных антигенами вируса денге, значимы при  $p < 0,001$  по критерию Манна-Уитни.

**Note.** \*Differences between values in samples stimulated with SARS-CoV-2 antigens and values of similar parameters in samples stimulated with dengue virus antigens are significant at  $p < 0.001$  according to the Mann-Whitney test.

стимуляции патоген-специфическими пептидами [21–23]. Авторы показывают, что в зависимости от срока обследования после заболевания COVID-19 или выздоровления чувствительность и специфичность теста могут составлять от 81,1% (95% ДИ 74,9–86%) до 90% (95% ДИ 82–95%) и от 90,9% (95% ДИ 74,5–97,6%) до 96% (95% ДИ 86–99%) соответственно.

В современных реалиях чтобы лучше оценить иммунный статус отдельных лиц и групп населения и новые вакцины, необходимы адекватные иммунодиагностические инструменты, которые измеряют клеточный иммунный ответ на SARS-CoV-2. Предложенный нами способ активации лимфоцитов с использованием готовых коммерческих тест-систем показал, что в ходе его реализации происходит АГ-стимуляция, которая специфична с высокой степенью чувствительности – 73% (95% ДИ 58–88%) – и не уступает по своей информативности анализу учёта IFN-γ другим вариантам технологии IGRA.

CD69 довольно давно известен как маркер активации Т-лимфоцитов и NK-клеток [24]. Повышение на Т-лимфоцитах экспрессии CD69 и продукции IFN-γ после антигенной стимуляции используется для выявления клеток памяти при многих инфекциях [25, 26].

В случае, когда синтез IFN-γ регистрируется не внутри клетки с известным иммунофенотипом, а вне её (например, методом ELISPOT), возникает вопрос, какая часть IFN-γ происходит из Т-клеток, а какая – из NK-клеток. Ряд исследователей полагает, что NK-клетки могут напрямую распознавать сложный патоген, такой как цитомегаловирус человека (HCMV). Так, воздействие HCMV (штамм ТВ40/Е) на NK-клетки человека индуцировало экспрессию CD69, стимулировало секрецию IFN-γ и увеличивало их цитотоксическую активность в отношении инфицированных HCMV клеток [27]. Другие считают, что при острой инфекции эти механизмы не имеют большого значения [28].

В нашей работе также мог иметь значение тот факт, что специфические Т-клетки определялись в крови людей, переболевших COVID-19. В работе S. Varshetta и соавт. показано, что у пациентов с COVID-19 (особенно с тяжёлой формой) было изменено распределение лимфоцитов периферической крови с увеличением доли зрелых NK- и низким количеством Т-клеток. NK-клетки и CD8<sup>+</sup> Т-клетки, в частности, характеризовались повышенной экспрессией CD69. После выздоровления количество CD8<sup>+</sup> Т-клеток и экспрессия CD69 на них нормализовались [29]. Тем

не менее нельзя было исключить, что, будучи активированы *in vivo*, эти клетки более активно реагируют и *in vitro*.

Оценка степени участия NK- и NKT-лимфоцитов в продукции IFN- $\gamma$ , стимулированной антигенами SARS-CoV-2, в наших исследованиях позволила показать, что вклад NK-лимфоцитов в результирующий эффект АГ-стимулированной продукции IFN- $\gamma$ , вероятно, меньше, чем вклад Т-лимфоцитов. NK-лимфоциты одного и того же пациента активируются в присутствии антигенов как SARS-CoV-2, так и вируса денге, однако степень активации NK-клеток (с повышением экспрессии CD69) в присутствии антигенов вируса денге ниже и не приводит к продукции IFN- $\gamma$  даже на низком уровне, если только не сопровождается активацией CD8<sup>+</sup> Т-клеток.

### Заключение

Таким образом, наши исследования показали, что предложенный способ определения клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2 позволяет различать перенёсших COVID-19 и неинфицированных здоровых доноров крови. Общая чувствительность и специфичность метода не уступают другим аналогичным методам. Следовательно, применение разработанного нами способа определения клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2 является обоснованным и перспективным.

Предлагаемый способ определения клеточного иммунного ответа на SARS-CoV-2 как любой метод имеет суммарную погрешность оценки АГ-стимулированного увеличения экспрессии маркера активации Т-лимфоцитов CD69 или АГ-стимулированной продукции IFN- $\gamma$ , которая складывается из точности дозирования лимфоцитов в лунки планшета, аликвотирования клеток и супернатантов, а также из измерительной погрешности автоматических приборов для цито- и фотометрии. Однако эти ограничения не являются определяющими и устраняются путём применения поверенного оборудования и дублирования клеточных проб.

Предложенный способ имеет следующие преимущества перед зарубежными аналогичными методами, которые делают его пригодным для мониторинга Т-клеточного ответа в популяции:

- является более экономичным, так как не требует дорогостоящего оборудования и может быть реализован с использованием реагентов российских производителей;

- позволяет использовать готовые полистироловые планшеты ИФА-тест-систем, прошедших регистрацию для медицинских целей, с фиксированным антигеном вируса SARS-CoV-2, которые применяются для обнаружения антител соответствующей специфичности, что позволяет дополнительно стандартизировать метод;

- подходит для людей с любым гаплотипом по антигенам главного комплекса гистосовместимости (HLA) и может быть осуществлён в течение трёх суток.

Дальнейшие исследования будут направлены на возможность применения предложенного способа для определения клеточного иммунного ответа на разные эпитопы антигенов SARS-CoV-2 (с использованием ИФА-тест-систем с фиксированными антигенами вируса) с целью изучения формирования поствакцинального иммунного ответа.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Soresina A., Moratto D., Chiarini M., Paolillo C., Baresi G., Foca E., et al. Two X-linked agammaglobulinemia patients develop pneumonia as COVID-19 manifestation but recover. *Pediatr. Allergy Immunol.* 2020; 31(5): 565–9. <https://doi.org/10.1111/pai.13263>
2. Mathew D., Giles J.R., Baxter A.E., Oldridge D.A., Greenplate A.R., Wu J.E., et al. COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science.* 2020; 369(6508): 1209. <https://doi.org/10.1126/science.abc8511>
3. Peng Y., Mentzer A.J., Liu G., Yao X., Yin Z., Dong D., et al. Broad and strong memory CD4(+) and CD8(+) T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat. Immunol.* 2020; 21(11): 1336–45. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0782-6>
4. Ni L., Ye F., Cheng M.L., Feng Y., Deng Y.Q., Zhao H., et al. Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. *Immunity.* 2020; 52(6): 971–7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.023>
5. Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S.I., Mateus J., Dan J.M., Moderbacher C.R., et al. Targets of T Cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell.* 2020; 181(7): 1489–501. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>
6. Braun J., Loyal L., Frensch M., Wendisch D., Georg P., Kurth F., et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature.* 2020; 587(7833): 270–4. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2598-9>
7. Gimenez E., Albert E., Torres I., Remigia M.J., Alcaraz M.J., Galindo M.J., et al. SARS-CoV-2-reactive interferon-gamma-producing CD8+ T cells in patients hospitalized with coronavirus disease. *J. Med. Virol.* 2021; 93(1): 375–82. <https://doi.org/10.1002/jmv.26213>
8. Le Bert N., Tan A.T., Kunasegaran K., Tham C.Y.L., Hafezi M., Chia A., et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature.* 2020; 584(7821): 457–62. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>
9. Peng Y., Mentzer A.J., Liu G., Yao X., Yin Z., Dong D., et al. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat. Immunol.* 2020; 21(11): 1336–45. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0782-6>
10. Thieme C.J., Anft M., Paniskaki K., Blazquez-Navarro A., Doevelaar A., Seibert F.S., et al. Robust T cell response toward spike, membrane, and nucleocapsid SARS-CoV-2 proteins is not associated with recovery in critical COVID-19 Patients. *Cell Rep. Med.* 2020; 1(6): 100092. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100092>
11. Oja A.E., Saris A., Ghandour C.A., Kragten N.A.M., Hogema B.M., Nossent E.J., et al. Divergent SARS-CoV-2-specific T and B cell responses in severe but not mild COVID-19. *bioRxiv.* 2020; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.06.18.159202>
12. Auladell M., Jia X., Hensen L., Chua B., Fox A., Nguyen T.H.O., et al. Recalling the future: immunological memory toward unpredictable influenza viruses. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1400. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01400>
13. Robbiani D.F., Gaebler C., Muecksch F., Lorenzi J.C.C., Wang Z., Cho A., et al. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature.* 2020; 584(7821): 437–42. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2456-9>
14. Folegatti P.M., Ewer K.J., Aley P.K., Angus B., Becker S., Bellij-Rammerstorfer S., et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet.* 2020; 396(10249): 467–78. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31604-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31604-4)

15. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatullin A.I., Schleblyakov 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)
16. Liu J., Li S., Liu J., Liang B., Wang X., Wang H., et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine*. 2020; 55: 102763. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102763>
17. Потеряев Д.А., Аббасова С.Г., Игнаьева П.Е., Стрижакова О.М., Колесник С.В., Хамитов Р.А. Оценка Т-клеточного иммунитета к SARS-CoV-2 у переболевших и вакцинированных против COVID-19 лиц с помощью ELISPOT набора ТиграТест® SARS-CoV-2. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021; 21(3): 178–92. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-178-192>
18. Youden W.J. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 1950; 3(1): 32–5. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(1950\)3:1<32:aid-cn-cr2820030106>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(1950)3:1<32:aid-cn-cr2820030106>3.0.co;2-3)
19. Solano C., Benet I., Clari M.A., Nieto J., de la Cámara R., López J., et al. Enumeration of cytomegalovirus-specific interferon gamma CD8+ and CD4+ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica*. 2008; 93(9): 1434–6. <https://doi.org/10.3324/haematol.12880>
20. de Araújo-Souza P.S., Hanschke S.C.H., Nardy A.F.F.R., Sécca C., Oliveira-Vieira B., Silva K.L., et al. Differential interferon- $\gamma$  production by naive and memory-like CD8 T cells. *J. Leukoc. Biol*. 2020; 108(4): 1329–37. <https://doi.org/10.1002/JLB.2AB0420-646R>
21. Murugesan K., Jagannathan P., Pham T.D., Pandey S., Bonilla H.F., Jacobson K., et al. Interferon- $\gamma$  release assay for accurate detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 T-cell response. *Clin. Infect. Dis*. 2021; 73(9): 3130–2. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1537>
22. Fernández-González M., Agulló V., Padilla S., García J. A., García-Abellán J., Botella Á., et al. Clinical performance of a standardized severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) interferon- $\gamma$  release assay for simple detection of T-cell responses after infection or vaccination. *Clin. Infect. Dis*. 2022; 75(1): e338–46. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab1021>
23. Echeverría G., Guevara Á., Coloma J., Ruiz A.M., Vasquez M.M., Tejera E., et al. Pre-existing T-cell immunity to SARS-CoV-2 in unexposed healthy controls in Ecuador, as detected with a COVID-19 interferon-gamma release assay. *Int. J. Infect. Dis*. 2021; 105: 21–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.02.034>
24. Cibrián D., Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur. J. Immunol*. 2017; 47(6): 946–53. <https://doi.org/10.1002/eji.201646837>
25. Chen Z.Y., Wang L., Gu L., Qu R., Lowrie D.B., Hu Z., et al. Decreased expression of CD69 on T Cells in tuberculosis infection resisters. *Front. Microbiol*. 2020; 11: 1901. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01901>
26. Murata K., Hoshina T., Onoyama S., Tanaka T., Kanno S., Ishimura M., et al. Reduction in the number of Varicella-Zoster virus-specific T-Cells in immunocompromised children with varicella. *Tohoku J. Exp. Med*. 2020; 250(3): 181–90. <https://doi.org/10.1620/tjem.250.181>
27. Muntasell A., Costa-Garcia M., Vera A., Marina-Garcia N., Kirschning C.J., López-Botet M. Priming of NK cell anti-viral effector mechanisms by direct recognition of human cytomegalovirus. *Front. Immunol*. 2013; 4: 40. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00040>
28. Della Chiesa M., De Maria A., Muccio L., Bozzano F., Sivori S., Moretta L. Human NK cells and herpesviruses: mechanisms of recognition, response and adaptation. *Front. Microbiol*. 2019; 10: 2297. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02297>
29. Varchetta S., Mele D., Oliviero B., Mantovani S., Ludovisi S., Cerino A., et al. Unique immunological profile in patients with COVID-19. *Cell. Mol. Immunol*. 2021; 18(3): 604–12. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00557-9>

## REFERENCES

1. Soresina A., Moratto D., Chiarini M., Paolillo C., Baresi G., Foca E., et al. Two X-linked agammaglobulinemia patients develop pneumonia as COVID-19 manifestation but recover. *Pediatr. Allergy Immunol*. 2020; 31(5): 565–9. <https://doi.org/10.1111/pai.13263>
2. Mathew D., Giles J.R., Baxter A.E., Oldridge D.A., Greenplate A.R., Wu J.E., et al. COVID-19 patients reveals distinct immunotypes with therapeutic implications. *Science*. 2020; 369(6508): 1209. <https://doi.org/10.1126/science.abc8511>
3. Peng Y., Mentzer A.J., Liu G., Yao X., Yin Z., Dong D., et al. Broad and strong memory CD4(+) and CD8(+) T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat. Immunol*. 2020; 21(11): 1336–45. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0782-6>
4. Ni L., Ye F., Cheng M.L., Feng Y., Deng Y.Q., Zhao H., et al. Detection of SARS-CoV-2-specific humoral and cellular immunity in COVID-19 convalescent individuals. *Immunity*. 2020; 52(6): 971–7. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.04.023>
5. Grifoni A., Weiskopf D., Ramirez S.I., Mateus J., Dan J.M., Moderbacher C.R., et al. Targets of T Cell responses to SARS-CoV-2 coronavirus in humans with COVID-19 disease and unexposed individuals. *Cell*. 2020; 181(7): 1489–501. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.015>
6. Braun J., Loyal L., Frensch M., Wendisch D., Georg P., Kurth F., et al. SARS-CoV-2-reactive T cells in healthy donors and patients with COVID-19. *Nature*. 2020; 587(7833): 270–4. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2598-9>
7. Gimenez E., Albert E., Torres I., Remigia M.J., Alcaraz M.J., Galindo M.J., et al. SARS-CoV-2-reactive interferon-gamma-producing CD8+ T cells in patients hospitalized with coronavirus disease. *J. Med. Virol*. 2021; 93(1): 375–82. <https://doi.org/10.1002/jmv.26213>
8. Le Bert N., Tan A.T., Kunasegaran K., Tham C.Y.L., Hafezi M., Chia A., et al. SARS-CoV-2-specific T cell immunity in cases of COVID-19 and SARS, and uninfected controls. *Nature*. 2020; 584(7821): 457–62. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2550-z>
9. Peng Y., Mentzer A.J., Liu G., Yao X., Yin Z., Dong D., et al. Broad and strong memory CD4+ and CD8+ T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19. *Nat. Immunol*. 2020; 21(11): 1336–45. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0782-6>
10. Thieme C.J., Anft M., Paniskaki K., Blazquez-Navarro A., Doevelaar A., Seibert F.S., et al. Robust T cell response toward spike, membrane, and nucleocapsid SARS-CoV-2 proteins is not associated with recovery in critical COVID-19 Patients. *Cell Rep. Med*. 2020; 1(6): 100092. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2020.100092>
11. Oja A.E., Saris A., Ghandour C.A., Kragten N.A.M., Hogema B.M., Nossent E.J., et al. Divergent SARS-CoV-2-specific T and B cell responses in severe but not mild COVID-19. *bioRxiv*. 2020; Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.06.18.159202>
12. Auladell M., Jia X., Hensen L., Chua B., Fox A., Nguyen T.H.O., et al. Recalling the future: immunological memory toward unpredictable influenza viruses. *Front. Immunol*. 2019; 10: 1400. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01400>
13. Robbani D.F., Gaebler C., Muecksch F., Lorenzi J.C.C., Wang Z., Cho A., et al. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature*. 2020; 584(7821): 437–42. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2456-9>
14. Folegatti P.M., Ewer K.J., Aley P.K., Angus B., Becker S., Bellij-Rammerstorfer S., et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2020; 396(10249): 467–78. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31604-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31604-4)
15. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatullin A.I., Schleblyakov 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)
16. Liu J., Li S., Liu J., Liang B., Wang X., Wang H., et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine*. 2020; 55: 102763. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102763>

17. Poteryaev D.A., Abbasova S.G., Ignat'eva P.E., Strizhakova O.M., Kolesnik S.V., Khamitov R.A. Assessment of T-cell immunity to SARS-CoV-2 in COVID-19 convalescents and vaccinated subjects, using TigraTest® SARS-CoV-2 ELISPOT kit. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2021; 21(3): 178–92. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-3-178-192> (in Russian)
18. Youden W.J. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 1950; 3(1): 32–5. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(1950\)3:1<32:aid-cncr2820030106>3.0.co;2-3](https://doi.org/10.1002/1097-0142(1950)3:1<32:aid-cncr2820030106>3.0.co;2-3)
19. Solano C., Benet I., Clari M.A., Nieto J., de la Cámara R., López J., et al. Enumeration of cytomegalovirus-specific interferon gamma CD8+ and CD4+ T cells early after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk of active cytomegalovirus infection. *Haematologica*. 2008; 93(9): 1434–6. <https://doi.org/10.3324/haematol.12880>
20. de Araújo-Souza P.S., Hanschke S.C.H., Nardy A.F.F.R., Sécca C., Oliveira-Vieira B., Silva K.L., et al. Differential interferon- $\gamma$  production by naive and memory-like CD8 T cells. *J. Leukoc. Biol*. 2020; 108(4): 1329–37. <https://doi.org/10.1002/JLB.2AB0420-646R>
21. Murugesan K., Jagannathan P., Pham T.D., Pandey S., Bonilla H.F., Jacobson K., et al. Interferon- $\gamma$  release assay for accurate detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 T-cell response. *Clin. Infect. Dis*. 2021; 73(9): 3130–2. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1537>
22. Fernández-González M., Agulló V., Padilla S., García J. A., García-Abellán J., Botella Á., et al. Clinical performance of a standardized severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) interferon- $\gamma$  release assay for simple detection of T-cell responses after infection or vaccination. *Clin. Infect. Dis*. 2022; 75(1): e338–46. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab1021>
23. Echeverría G., Guevara Á., Coloma J., Ruiz A.M., Vasquez M.M., Tejera E., et al. Pre-existing T-cell immunity to SARS-CoV-2 in unexposed healthy controls in Ecuador, as detected with a COVID-19 interferon-gamma release assay. *Int. J. Infect. Dis*. 2021; 105: 21–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.02.034>
24. Cibrián D., Sánchez-Madrid F. CD69: from activation marker to metabolic gatekeeper. *Eur. J. Immunol*. 2017; 47(6): 946–53. <https://doi.org/10.1002/eji.201646837>
25. Chen Z.Y., Wang L., Gu L., Qu R., Lowrie D.B., Hu Z., et al. Decreased expression of CD69 on T Cells in tuberculosis infection resisters. *Front. Microbiol*. 2020; 11: 1901. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01901>
26. Murata K., Hoshina T., Onoyama S., Tanaka T., Kanno S., Ishimura M., et al. Reduction in the number of Varicella-Zoster virus-specific T-Cells in immunocompromised children with varicella. *Tohoku J. Exp. Med*. 2020; 250(3): 181–90. <https://doi.org/10.1620/tjem.250.181>
27. Muntasell A., Costa-Garcia M., Vera A., Marina-Garcia N., Kirschning C.J., López-Botet M. Priming of NK cell anti-viral effector mechanisms by direct recognition of human cytomegalovirus. *Front. Immunol*. 2013; 4: 40. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00040>
28. Della Chiesa M., De Maria A., Muccio L., Bozzano F., Sivori S., Moretta L. Human NK cells and herpesviruses: mechanisms of recognition, response and adaptation. *Front. Microbiol*. 2019; 10: 2297. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02297>
29. Varchetta S., Mele D., Oliviero B., Mantovani S., Ludovisi S., Cerino A., et al. Unique immunological profile in patients with COVID-19. *Cell. Mol. Immunol*. 2021; 18(3): 604–12. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00557-9>

## РЕЦЕНЗИИ



### РЕЦЕНЗИЯ

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

В № 5, 2022 журнала «Вопросы вирусологии» в разделе «Редакционная концепция» была опубликована статья «130 лет вирусологии» (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>).

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

В редакцию поступили следующие рецензии и отзывы на статью.

### Рецензия 1

Статья представляет собой обзор достижений вирусологии за 130 лет со времени открытия вирусов с акцентом на выдающихся работах советских и российских вирусологов. Начинается статья историей открытия вирусов, которое принадлежит нашей стране, великому отечественному учёному Д.И. Ивановскому, опубликовавшему в 1892 г. работу «О двух болезнях табака» и сделавшему доклад в Императорской Академии наук.

Далее описывается начальный этап развития вирусологии в конце XIX в. и начале XX в., ознаменовавшийся открытием вируса ящура Ф. Лёффлером и вируса жёлтой лихорадки У. Ридом.

Следующий раздел обзора посвящён фундаментальным сведениям о развитии концепции новых и возвращающихся инфекций и формировании различных групп вирусов во взаимодействии с элементами экосистемы в историческом аспекте.

Отдельные разделы работы описывают роль в патологии человека и животных таких опасных вирусов, как вирусы оспы, парентеральных гепатитов В и С, гриппа и ОРВИ, ВИЧ, вирусов, поражающих домашних животных, арбовирусов. Приводятся основные достижения в изучении этих вирусов и имена отечественных учёных, внёсших весомый вклад в открытие, исследования и разработку методов диагностики, профилактики и лечения вызываемых ими заболеваний.

Специальные разделы посвящены вакцинам и противовирусным препаратам, значению руководств по вирусологии, созданных российскими вирусологами, роли Института вирусологии имени Д.И. Ивановского в развитии отечественной и мировой вирусологии, выдающимся представителям российской вирусологической школы.

В канун годовщины открытия Д.И. Ивановским вирусов публикация данного обзора представляется не только актуальной, но и совершенно необходимой. Важность данной работы возрастает ещё и с учётом продолжающейся в мире тяжёлой пандемии, вызванной коронавирусом SARS-CoV-2, поразившей более 600 млн и убившей около 6,5 млн жителей всех континентов.

Оригинальность работы заключается в том, что автору удалось в сжатой форме нарисовать широкую картину открытия, исследований и достижений в борьбе с наиболее опасными вирусными инфекциями в XIX, XX и XXI вв.

Научное и практическое значение обзора состоит в том, что представленные систематизированные данные по результатам исследований в наиболее важных направлениях вирусологии дают правильные ориентиры для планирования новых работ с целью познания неизученного и разработки методов борьбы с грядущими атаками вирусов на человечество.

*В.И. Злобин,*  
главный научный сотрудник ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, заслуженный деятель науки Российской Федерации, д.м.н., профессор, академик РАН (Москва)

### Рецензия 2

Статья представляет актуальную научную и практическую значимость в области становления и развития отечественной вирусологии.

Статья имеет оригинальный характер. Новизна полученных данных основывается на исторических моментах становления и развития вирусологии как науки в России.

Материалы содержат научное описание становления и развития вирусологии, особенно в XX в., а методом исследования выбран аналитический.

Впервые в отечественной литературе представлены материалы, посвящённые развитию общей и частной вирусологии, роли отечественной науки в её развитии. Особо подчеркивается роль наших учёных в открытии многих вирусов.

Подведён итог этапов развития вирусологии в России. Отражены наиболее важные прикладные работы, посвящённые общей и частной вирусологии.

*С.В. Борисевич,*  
начальник ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, д.б.н., профессор, академик РАН (Сергиев Посад, Московская область)

### Рецензия 3

В статье отражена всеобъемлющая история вирусологии как науки, где главной линией является доказательство неоспоримого лидерства отечественных учёных в этой области. Необходимо отметить, что рукопись имеет не только научную, но и историческую значимость: представленные данные носят уникальный эн-

циклопедический характер. Огромной заслугой авторов является детальное хронологическое описание этапов становления и развития вирусологии как науки в России и мире, но с акцентом на наиболее значимых достижениях в столь длительный 130-летний период борьбы человечества с вирусными инфекционными заболеваниями.

Представленный в работе научно-исторический материал с подробным описанием теоретических подходов и инновационных методов исследования в изучении эволюции вирусов, их молекулярно-генетических свойств с описанием уникальных примеров создания новых вакцин и противовирусных препаратов доказательно иллюстрирует значимость вирусологии в области как выявления новых инфекций, так и обеспечения постоянного контроля и предупреждения последствий грядущих эпидемий и пандемий, угрожающих биобезопасности населения и окружающей среды. В обзоре уникальным образом в полной мере отражён весь значимый вклад, сделанный вирусологами из более чем 30 стран мира; представлены заслуги известнейших исследователей, работавших на всех континентах.

*Ю.В. Лобзин,*  
президент ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России,  
заслуженный деятель науки РФ,  
д.м.н., профессор, академик РАН (Санкт-Петербург)

#### Рецензия 4

Данная работа является обзорной и посвящена одной из самых значимых дат в современной микробиологии – 130-летию с момента открытия выдающимся отечественным ученым Д.И. Ивановским нового вида патогенов – вирусов, что послужило началом создания новой науки – вирусологии.

В статье подробно и интересно описаны основные вехи развития вирусологии и выдающиеся достижения отечественных вирусологов, обсуждаются перспективные направления дальнейшего развития этого раздела науки.

Особый акцент сделан на исследованиях арбовирусов, которые, по мнению авторов, внесли исключительный вклад в развитие вирусологии. Они способствовали формированию системного экологического подхода, основанного на концепции популяционных взаимодействий между видами вирусов, членистоногих переносчиков и позвоночных хозяев и окружающей средой. Была разработана теоретическая база проведения мониторинга в различных экосистемах с использованием методов молекулярной экологии. Отмечено появление в первой четверти XXI в. новых зооантропонозных коронавирусов, обладающих эпидемическим и пандемическим потенциалом.

Достаточно подробно изложена история создания Института вирусологии имени Д.И. Ивановского и его роль в развитии отечественной и мировой вирусологии.

Список литературы состоит из 193 источников и в полной мере подтверждает все тезисы, изложенные в обзоре.

Статья имеет несомненную научную значимость и будет интересна и полезна широкому кругу читателей.

*В.В. Кутырев,*  
директор ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора России,  
д.м.н., профессор, академик РАН (Саратов)

В Редакцию поступили отзывы:

Глубокоуважаемый Дмитрий Константинович! Искренне признателен за присланный материал. Это системная публикация, которая характеризует все этапы развития специальности «вирусология». Данная статья крайне важна для широкого круга читателей и будет весьма полезна для профессиональной и образовательной деятельности.

С искренним уважением,

председатель Президиума Всероссийского  
научно-практического общества эпидемиологов,  
микробиологов и паразитологов,  
директор ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора России,  
академик РАН  
*В.Г. Акимкин*

Глубокоуважаемый Дмитрий Константинович, большое спасибо за великолепный научный обзор, исключительно важный в современной ситуации системных попыток ревизии вклада российских исследователей в мировую науку. Лично для меня принципиально важной является уникальность ситуации в отечественной вирусологии, когда именно под Вашим началом за последние десятилетия эволюционная экология вирусов стала концептуально-методологической моделью развития всей современной экологии жизни.

С искренней признательностью и самыми добрыми пожеланиями,

Главный научный сотрудник Северного государственного  
медицинского университета (Архангельск),  
академик РАН  
*П.И. Сидоров*

Dear Dmitry,

I greatly appreciate your thinking of me by sending this wonderful review or your (and others') wonderful works. Each group around the world worked in their own interest area and, together, painted the entire global picture. I still think we have only "scratched the surface" and wish I could live long enough to see it all.

Congratulations to you and your great co-workers and predecessors for testing and analyzing those millions of insects and wild vertebrates, for traveling thousands of miles to get to isolated areas, for putting your lives at risk, for annoying administrators, and for working with international collaborators to move science forward in the best interests of everyone everywhere.

With hearty best wishes and warm regards,  
Charlie.

(Перевод с англ.: *«Дорогой Дмитрий, я очень признателен за то, что ты думаешь обо мне, посылая этот великолепный обзор и свои работы (и других). Каждая группа по всему миру работает в своей области интересов и вместе рисует цельную глобальную картину. Я до сих пор думаю, что мы только «поскребли по поверхности» и хотел бы прожить достаточно долго, чтобы увидеть её полностью.*

*Мои поздравления тебе, твоим великим коллегам и предшественникам за тестирование и анализ милли-*

*онов насекомых и диких животных, за тысячемильные путешествия для достижения отдалённых районов, за подвержение себя опасности, за раздражающую административную работу и за работу с зарубежными коллегами с целью продвижения науки вперёд в интересах каждого, где бы он ни находился.*

*С самыми сердечными и тёплыми пожеланиями, Чарли»)*

*Charlie Calisher,*  
Professor emeritus of microbiology  
at the College of Veterinary Medicine & Biomedical  
Sciences  
at Colorado State University (USA)

Dear Dmitry,

I thoroughly enjoyed reading this comprehensive survey, especially of course the arbovirology part. The contribution if Russian scientists are, of course, impressive. Some of my fondest memories are visits to your country beginning in 1965, the 100<sup>th</sup> anniversary of the Ivanovsky. Thank you for your friendship over the years!

Reading the history reminded me of the mystery of the introduction of WNV into the US and the coincident Volgograd outbreaks in 1999.

I hope you don't mind my sharing this with Charlie Calisher and Bob Tesh, who will enjoy it I am sure.

Wishing you the very best for the holidays,

Tom.

*(Перевод с англ.: «Дорогой Дмитрий, я с большим удовольствием прочитал этот всеобъемлющий обзор, особенно, конечно, его арбовирусологическую часть. Вклад российских вирусологов, конечно, впечатляющий. Одним из моих самых тёплых воспоминаний является визит в вашу страну в начале 1965 г. на столетие Ивановского. Благодарю тебя за нашу дружбу все эти годы.*

*Чтение этого исторического обзора напомнило мне о загадке интродукции вируса Западного Нила в США одновременно со вспышкой в Волгограде в 1999 г.*

*Надеюсь, ты не будешь против, если я поделюсь этими материалами с Чарли Калишером и Бобом Тешем, которые, я уверен, получают от этого большое удовольствие.*

*Желаю тебе самых лучших наступающих праздников, Том»).*

*Thomas P. Monath, MD, FASTMH,*  
Managing Partner & Chief Scientific Officer,  
Crozet BioPharma LLC (USA)

Dear Dimitry,

Thank you very much! I will read it with great interest. I cannot think of anyone who has the breadth of historical knowledge that you have.

So, 30 years ago we had that magnificent meeting that you organized in St Petersburg – one of the most enjoyable I can remember. And the visit to the Hermitage with a senior

curator who had just returned from London, and who was a friend of yours and who took us to see the treasures!

I hope you have an enjoyable and peaceful Christmas season, and a fruitful and healthy year in 2023.

With very warm regards,

John.

*(Перевод с англ.: «Дорогой Дмитрий, огромное спасибо! Я прочту с большим интересом. Я не знаю никого, кто имел бы столь широкие исторические познания, как ты.*

*Так, 30 лет назад мы провели великолепную встречу, которую ты организовал в Санкт-Петербурге, – одно из моих самых приятных воспоминаний. И наш визит в Эрмитаж со старшим куратором, который только что возвратился из Лондона и провёл и показал нам сокровища!*

*Я надеюсь, ты проведёшь приятные и спокойные рождественские праздники, а 2023-й год принесёт плодотворную работу и здоровье.*

*С самыми тёплыми пожеланиями, Джон»).*

*John S. Mackenzie,*  
Emeritus Professor,  
Curtin University (Australia)

Dear Dmitry, Many thanks for the Ivanovsky text and Season's Greetings from Helsinki.

Antti.

*(Перевод с англ.: «Дорогой Дмитрий, большое спасибо за этот текст об Ивановском и мои поздравления с рождественскими праздниками из Хельсинки. Анти»).*

*Antti Vaherii,*  
Professor, University of Helsinki (Finland)

Dear Dmitry, Wow, this a very cool and nice article! I will distribute this here. Thanks for sending! Happy holidays!

Jens.

*(Перевод с англ.: «Дорогой Дмитрий, вау, это очень крутая и прекрасная статья! Я распространю её здесь. Благодарю за то, что прислал. Хороших праздников! Йенс»).*

*Jens Kuhn,*  
National Institute of Allergy and Infectious Diseases  
(NIH/NIAID),  
Division of Clinical Research (DCR),  
Integrated Research Facility at Fort Detrick (IRF-Frederick)

Авторы статьи выражают сердечную признательность всем коллегам, приславшим высокопрофессиональные аналитические материалы и отзывы и поздравляют с наступающими рождественскими и новогодними праздниками.

*Академик РАН Д.К. Львов,*  
член-корр. РАН С.В. Альховский,  
член-корр. РАН О.П. Жирнов

## Список статей, опубликованных в журнале «Вопросы вирусологии» в 2022 г

### РЕДАКЦИОННАЯ КОНЦЕПЦИЯ

Львов Д.К., Альховский С.В., Жирнов О.П. 130 лет вирусологии. 5, 357-384

### ОБЗОРЫ

Бахрушина Е.О., Михел И.Б., Кондратьева В.М., Демина Н.Б., Гребенникова Т.В. *In situ* гели как современный способ интраназальной доставки вакцин. 5, 395-402

Bahadoram S., Keikhaei B., Bahadoram M., Mahmoudian-Sani M.-R., Hassanzadeh S., Saeedi-Boroujeni A., Alikhani K. Бромгексин как потенциальный препарат против COVID-19: от гипотезы к клиническим исследованиям. 2, 126-132

Власова Н.Н., Верховский О.А., Алипер Т.И., Капустина О.В., Алексеев К.П., Южаков А.Г., Гулюкин М.И., Гулюкин А.М. Проблемы специфической профилактики африканской чумы свиней.\* 3, 206-216

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. 1, 18-26

Демин М.В., Тихомиров Д.С., Туполева Т.А., Филатов Ф.П. Устойчивость к противовирусным препаратам у вирусов человека из подсемейства *Betaherpesvirinae*. 5, 385-394

Догадов Д.И., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Энтеральные вирусные гепатиты у обезьян. 3, 173-184

Елаков А.Л. Антирабические вакцины, применяемые в Российской Федерации, и перспективы их совершенствования. 2, 107-114

Ершов Ф.И., Наровлянский А.Н. Проблемы применения интерферонов при новой коронавирусной инфекции COVID-19 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*). 2, 115-125

Новиков Д.В., Мелентьев Д.А. Энтеровирусные (*Picornaviridae: Enterovirus*) (неполио) вакцины. 3, 185-192

Ожмегова Е.Н., Бобкова М.Р. Лекарственная устойчивость ВИЧ: прежние и современные тенденции. 3, 193-205

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

Пашков Е.А., Пак А.В., Пашков Е.П., Быков А.С., Буданова Е.В., Поддубиков А.В., Свитич О.А., Зверев В.В. Перспектива применения препаратов на основе явления РНК-интерференции против ВИЧ-инфекции. 4, 278-289

Соломай Т.В., Семенов Т.А. Эпштейн-Барр вирусная инфекция – глобальная эпидемиологическая проблема. 4, 265-277

Челяева Т.С., Ерохов Д.В., Андриевская И.Ю., Жердева П.Е., Тихонова Н.Т. Обзор генетического разнообразия вируса эпидемического паротита (*Paramyxoviridae: Orthorubulavirus: Mumps orthorubulavirus*). 2, 95-106

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Абитаев Р.Т., Кондибаева Ж.Б., Аманова Ж.Т., Саметова Ж.Ж., Усембай А.К., Булатов Е.А. Определение оптимальной иммунизирующей дозы гетерологической вакцины вируса оспы коз (*Poxviridae: Chordopoxvirinae: Capripoxvirus*) против узелкового дерматита. 4, 304-309

Биятлова 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. 5, 414-422

Бляхер М.С., Фёдорова И.М., Тульская Е.А., Капустин И.В., Котелева С.И., Рамазанова З.К., Одинцов Е.Е., Сандалова С.В., Новикова Л.И. Определение специфического Т-клеточного иммунитета к антигенам вируса SARS-CoV-2 у людей, переболевших COVID-19. 6, 527-537

Бумбали С., Балде Т.А.Л., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Найденова Е.В., Валутите Д.Э., Щемелев А.Н., Зуева Е.Б., Эсауленко Е.В., Тололян Арег А. Распространенность маркеров вирусного гепатита В среди доноров крови в Гвинейской Республике.\* 1, 59-68

Великжанина Е.И., Сашина Т.А., Морозова О.В., Епифанова Н.В., Новикова Н.А. Вариабельность генов неструктурных белков ротавируса А (*Reoviridae: Rotavirus: Rotavirus A*) генотипа G9P[8] в период доминирования на территории Нижнего Новгорода (центральная часть России) (2011–2020).\* 6, 475-486

Глотов А.Г., Нефедченко А.В., Южаков А.Г., Котенева С.В., Глотова Т.И., Комина А.К., Красников Н.Ю. Генетический полиморфизм сибирских изолятов коронавируса крупного рогатого скота (*Coronaviridae: Betacoronavirus: Betacoronavirus-1*). 6, 465-474

Гурцевич В.Э., Лубенская А.К., Сенюта Н.Б., Душенькина Т.Е., Смирнова К.В. Вирус Эпштейн-Барр (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*) у калмыков и славян, проживающих на территории России: типы вируса, варианты онкогена LMP1 и злокачественные опухоли.\* 3, 246-257

Демин М.В., Тихомиров Д.С., Бидерман Б.В., Дроков М.Ю., Сударинов А.Б., Туполева Т.А., Филатов Ф.П. Мутации в гене *UL97* цитомегаловируса (*Herpesvirales: Herpesviridae: Cytomegalovirus: Human betaherpesvirus 5*), ассоциированные с устойчивостью к ганцикловиру, у реципиентов аллогенных стволовых гемопоэтических клеток. 1, 37-47

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

Карташов М.Ю., Гладышева А.В., Найденова Е.В., Захаров К.С., Швалов А.Н., Кривошеина Е.И., Сеничкина А.М., Ба М.Б., Терновой В.А., Бумбали С., Локтев В.Б. Молекулярно-генетическая характеристика многокомпонентного флавиподобного вируса *Kindia tick virus* (*Flaviviridae*), обнаруженного в иксодовых клещах на территории Гвинейской Республики.\* 6, 487-495

Карташов М.Ю., Свиринов К.А., Кривошеина Е.И., Чуб Е.В., Терновой В.А., Кочнева Г.В. Распространенность и молекулярно-генетическая характеристика вирусных парентеральных гепатитов В, С и D у ВИЧ-позитивных лиц в Новосибирской области. 5, 423-438

Киселева Н.П., Федорова М.Д., Заикина А.Э., Елкина Н.В., Голдобина Е.Е., Елкин Д.С., Абрамов П.М., Павлова Л.С., Винокурова С.В. Идентификация регуляторных некодирующих РНК вируса папилломы человека типа 16 (*Papillomaviridae: Alphapapillomavirus: Human papillomavirus 16*) в опухолях шейки матки.\* 3, 217-226

- Коноплева М.В., Фельдшерова А.А., Эльзорт Д.А., Туполева Т.А., Кохановская Н.А., Панкратова В.Н., Семенов Т.А., Суслев А.П.** Иммуноферментная идентификация escape-мутантов S143L и G145R вируса гепатита В (Hepadnaviridae: *Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*). \* 1, 48-58
- Костинов М.П., Журавлев П.И., Локтионова М.Н., Шмитько А.Д., Полищук В.Б., Татаринчик А.А., Смирнова О.А., Фурсов И.С.** Сопоставление напряженности гуморального иммунитета к кори с заболеваемостью в различных возрастных группах из числа медицинских работников г. Москвы. 1, 27-36
- 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., Святич О.А., Зверев В.В., Файзулов Е.Б.** Сравнительное изучение Ухань-подобного и Омикрон-подобного вариантов SARS-CoV-2 в экспериментальных животных моделях. 5, 439-449
- Лобанова В.А., Царькова К.Н., Богомолова О.А., Матвеева И.Н., Ключкина В.И.** Тест-система на основе конкурентного иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусу бешенства животных (Rhabdoviridae: *Lyssavirus*). 4, 331-340
- Мазлум А., Иголкин А.С., Шотин А.Р., Зиняков Н.Г., Власова Н.Н., Аронова Е.В., Пузанкова О.С., Гаерилова В.Л., Шевченко И.В.** Анализ полногеномной последовательности изолята вируса африканской чумы свиней (Asfarviridae: *Asfivirus: African swine fever virus*), выделенного от дикого кабана (*Sus scrofa*) на границе Российской Федерации и Монголии. \* 2, 153-164
- Масалова О.В., Леснова Е.И., Андреев С.М., Шершакова Н.Н., Козлов В.В., Пермьякова К.Ю., Демидова Н.А., Валеев-Эллистон В.Т., Турецкий Е.А., Иванов А.В., Николаева Т.Н., Хаитов М.Р., Пронин А.В., Куц А.А.** Адьювантное действие дисперсного фуллерена C<sub>60</sub> на иммунный ответ против конструкций, имитирующих аминокислотные и нуклеотидные последовательности неструктурного белка NS5B вируса гепатита С. 6, 516-526
- Морозова О.В., Новикова Н.А., Епифанова Н.В., Новиков Д.В., Мохонов В.В., Сашина Т.А., Зайцева Н.Н.** Выявление SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) у детей с острой кишечной инфекцией в Нижнем Новгороде за период 2020–2021 гг. 1, 69-76
- Николаева Л.И., Беляевцев А.Н., Шевченко Н.Г., Стучинская М.Д., Самохвалов Е.И., Дедова А.В., Сапронов Г.В., Шастина Н.С., Куприянов В.В.** Анализ иммунореактивности отдельных В-клеточных эпителиев антигена NS4a вируса гепатита С (Flaviviridae: *Hepacivirus: Hepatitis C virus*). 3, 237-245
- Носик Д.Н., Калнина Л.Б., Лобач О.А., Чатаева М.С., Бережная Е.В., Бочкова М.С., Киселева И.А., Селимова Л.М., Носик Н.Н.** Противовирусная и вирулицидная активность дезоксирибонуклеата натрия и его комплекса с железом в отношении вирусов разных царств и семейств. 6, 506-515
- Ожмегова Е.Н., Савочкина Т.Е., Прилипов А.Г., Тихомиров Е.Е., Ларичев В.Ф., Сайфуллин М.А., Гребенникова Т.В.** Молекулярно-эпидемиологический анализ геновариантов SARS-CoV-2 на территории Москвы и Московской области. 6, 496-505
- Оспельникова Т.П., Левицкая Д.С., Колодяжная Л.В., Шитова А.Д., Осипцев В.Н., Арифиллина Л.Р., Крюкова Н.О., Пахомов Д.В., Хромова Е.А., Баранова И.А., Чучалин А.Г., Костинов М.П., Святич О.А.** Биологическая активность интерферонов при новой коронавирусной инфекции COVID-19. \* 2, 142-152
- Парамонова Н.М., Челур 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 хомячков (*Mesocricetus auratus*) при инфекции вируса SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*). 5, 403-413
- Поволяева О.С., Чадаева А.А., Луницин А.В., Юрков С.Г.** Штаммы диплоидных клеток лёгкого летучей мыши *Pipistrellus pipistrellus* и их перmissивность к орбивирусам (Reoviridae: *Orbivirus*) – возбудителям трансмиссивных болезней животных. 3, 227-236
- Сайфуллин М.А., Зверева Н.Н., Карань Л.С., Григорьева Я.Е., Акиншина Ю.А., Ларичев В.Ф., Шамшева О.В., Базарова М.В., Сметанина С.В.** Сравнительная характеристика завозных случаев классической и геморрагической форм лихорадки денге в 2009–2019 гг. \* 4, 322-330
- Шамсутдинова О.А., Булгин Д.В., Карал-оглы Д.Д., Лаврентьева И.Н., Клоц И.Н.** Сравнительный анализ остаточной нейровирулентности вакцинного и низкоаттенуированного штаммов вируса краснухи (Matonaviridae: *Rubivirus: Rubella virus*) в эксперименте на обезьянах вида макак резус (*Macaca mulatta*). \* 2, 133-141
- Шотин А.Р., Мазлум А., Иголкин А.С., Шевченко И.В., Елсукова А.А., Аронова Е.В., Власова Н.Н.** Альтернативные подходы к диагностике африканской чумы свиней на территории Российской Федерации в 2017–2021 гг. 4, 290-303
- Щемелев А.Н., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Найденова Е.В., Зуева Е.Б., Валутите Д.Э., Чурина М.А., Виролайнен П.А., Тололян Арз А.** Генетическое разнообразие вируса иммунодефицита человека ВИЧ-1 в Калининградской области. \* 4, 310-321

## В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

- Аманова Ж.Т., Саметова Ж.Ж., Булатов Е.А.** Адаптация вируса оспы овец (Poxviridae: *Chordopoxvirinae: Sheep pox virus*) к линии клеток почки африканской зелёной мартышки и оценка его иммунобиологических свойств. 5, 450-458
- Кривошеина Е.И., Карташов М.Ю., Найденова Е.В., Ушкаленко Н.Д., Пьянков С.А., Терновой В.А., Локтев В.Б.** Разработка способа выявления специфических антител к белку Е вируса жёлтой лихорадки (Flaviviridae: *Flavivirus*) методом иммуноферментного анализа. 4, 341-350

## ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

- К 90-летию профессора Георгия Артемьевича Галегова. 1, 87-88
- К юбилею академика Виталия Васильевича Зверева. 2, 165-166

## ИНФОРМАЦИЯ

Выборы в РАН. 3, 258

## РЕЦЕНЗИИ

Материалы, поступившие в редакцию в связи с публикацией в разделе «Редакционная концепция» в № 5, 2022 журнала «Вопросы вирусологии» статьи «130 лет вирусологии» (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>). 6, 538-540

## Index of articles published in the journal «Problems of Virology» in 2022

### EDITORIAL CONCEPT

Lvov D. K., Alkhovsky S. V., Zhirnov O. P. 130<sup>th</sup> anniversary of virology. 5, 357-384

### REVIEWS

Bahadoram S., Keikhaei B., Bahadoram M., Mahmoudian-Sani M.-R., Hassanzadeh S., Saeedi-Boroujeni A., Alikhani K. Bromhexine is a potential drug for COVID-19: From hypothesis to clinical trials. 2, 126-132

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. 5, 395-402

Chekhyayeva T.S., Erokhov D.V., Andrievskaya I.Yu., Zherdeva P.E., Tikhonova N.T. Genetic diversity of the mumps viruses (Paramyxoviridae: *Orthorubulavirus: Mumps orthorubulavirus*): an overview. 2, 95-106

Demin M.V., Tikhomirov D.S., Tupoleva T.A., Filatov F.P. Resistance to antiviral drugs in human viruses from the subfamily *Betaherpesvirinae*. 5, 385-394

Dogadov D.I., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I. Enteral viral hepatitis in monkeys. 3, 173-184

Elakov A.L. Anti-rabies vaccines applied in the Russian Federation and perspectives for their improvement. 2, 107-114

Ershov F.I., Narovlyansky A.N. The problem of the use of interferons in the novel coronavirus disease COVID-19 (Coronaviridae: *Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*). 2, 115-125

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. 1, 18-26

Novikov D.V., Melentev D.A. Enteroviral (Picornaviridae: *Enterovirus*) (nonpolio) vaccines. 3, 185-192

Ozhmegova E.N., Bobkova M.R. HIV drug resistance: past and current trends. 3, 193-205

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

Pashkov E.A., Pak A.V., Pashkov E.P., Bykov A.S., Budanova E.V., Poddubikov A.V., Svitich O.A., Zverev V.V. The prospects for the use of drugs based on the phenomenon of RNA interference against HIV infection. 4, 278-289

Vlasova N.N., Verkhovskiy O.A., Aliper T.I., Kapustina O.V., Alekseev K.P., Yuzhakov A.G., Gulukin M.I., Gulukin A.M. Problems of specific prevention of African swine fever.\* 3, 206-216

Solomay T.V., Semenenko T.A. Epstein-Barr viral infection is a global epidemiological problem. 4, 265-277

### ORIGINAL RESEARCHES

Abitaev R.T., Kondibaeva Zh.B., Amanova Zh.T., Sametova Zh.Zh., Ussembay A.K., Bulatov Ye.A. Determination of the optimal immunizing dose of heterologous goat pox virus vaccine (Poxviridae: *Chordopoxvirinae: Capripoxvirus*) against lumpy skin disease. 4, 304-309

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. 5, 414-422

Blyakher M.S., Fedorova I.M., Tulskeya E.A., Kapustin I.V., Koteleva S.I., Ramazanova Z.K., Odintsov E.E., Sandalova S.V., Novikova L.I. Assessment of specific T-cell immunity to SARS-CoV-2 virus antigens in COVID-19 convalescents. 6, 527-537

Boubaly S., Balde T.A.L., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Naidenova E.V., Valutite D.E., Shchemelev A.N., Zueva E.B., Esaulenko E.V., Totolian Areg A. Prevalence of viral hepatitis B markers among blood donors in the Republic of Guinea.\* 1, 59-68

Demin M.V., Tikhomirov D.S., Biderman B.V., Drovkov M.Yu., Sudarikov A. B., Tupoleva T.A., Filatov F.P. Mutations in the UL97 gene of cytomegalovirus (Herpesvirales: Herpesviridae: *Cytomegalovirus: Human betaherpesvirus 5*) associated with ganciclovir resistance in recipients of allogeneic hematopoietic stem cells. 1, 37-47

Glotov A.G., Nefedchenko A.V., Yuzhakov A.G., Koteneva S.V., Glotova T.I., Komina K.A., Krasnikov N.Y. Genetic polymorphism of Siberian bovine coronavirus isolates (Coronaviridae: *Betacoronavirus: Betacoronavirus-1*). 6, 465-474

Gurtsevitch V.E., Lubenskaya A.K., Senyuta N.B., Dushenkina T.E., Smirnova K.V. Epstein-Barr virus (Herpesviridae: *Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gamma-herpesvirus 4*) in Kalmyks and Slavs living in Russia: virus types, LMP1 oncogene variants, and malignancies\*. 3, 246-257

Kartashov M.Yu., Gladysheva A.V., Naidenova E.V., Zakharov K.S., Krivosheina E.I., Shvalov A.N., Senichkina A.M., Bah M.B., Ternovoi V.A., Boubaly S., Loktev V.B. Molecular and genetic characteristics of the multicomponent flavi-like Kindia tick virus (Flaviviridae) found in ixodid ticks on the territory of the Republic of Guinea.\* 6, 487-495

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. 5, 423-438

Kisseljova N.P., Fedorova M.D., Zaikina A.E., Elkina N.V., Goldobina E.E., Elkin D.S., Abramov P.M., Pavlova L.S., Vinokurova S.V. Identification regulatory noncoding RNAs of human papilloma virus type 16 (Papillomaviridae: *Alpha-papillomavirus: Human papillomavirus*) in cervical tumors.\* 3, 217-226

Konopleva M.V., Feldsherova A.A., Elgort D.A., Tupoleva T.A., Kokhanovskaya N.A., Pankratova V.N., Semenenko T.A., Suslov A.P. Identification by enzyme immunoassay of escape mutants S143L and G145R of hepatitis B virus (Hepadnaviridae: *Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*).\* 1, 48-58

Kostinov M.P., Zhuravlev P.I., Loktionova M.N., Shmitko A.D., Polishchuk V.B., Tatarinchik A.A., Smirnova O.A., Fursov I.S. Comparison of measles incidence in different age groups with the intensity of specific humoral immunity in healthcare workers in Moscow. 1, 27-36

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. 5, 439-449

Lobanova V.A., Tsarkova K.N., Bogomolova O.A., Matveeva I.N., Klyukina V.I. Competitive ELISA test system for the detection of antibodies to the rabies virus in animals (Rhabdoviridae: *Lyssavirus*). 4, 331-340

- Masalova O.V., Lesnova E.I., Andreev S.M., Shershakova N.N., Kozlov V.V., Permyakova K.Yu., Demidova N.A., Valuev-Elliston V.T., Turetskiy E.A., Ivanov A.V., Nikolaeva T.N., Khaitov M.R., Pronin A.V., Kushch A.A.** Adjuvant effect of dispersed fullerene C<sub>60</sub> on the immune response to constructs harboring amino acid and nucleotide sequences of hepatitis C virus nonstructural NS5B protein. 6, 516-526
- Mazloum Ali, Igolkin A.S., Shotin A.R., Zinyakov N.G., Vlasova N.N., Aronova E.V., Puzankova O.S., Gavrilova V.L., Shevchenko I.V.** Analysis of the whole-genome sequence of an ASF virus (Asfarviridae: *Asfivirus: African swine fever virus*) isolated from a wild boar (*Sus scrofa*) at the border between the Russian Federation and Mongolia.\* 2, 153-164
- Morozova O.V., Novikova N.A., Epifanova N.V., Novikov D.V., Mokhonov V.V., Sashina T.A., Zaytseva N.N.** Detection SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Coronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) in children with acute intestinal infection in Nizhny Novgorod during 2020–2021. 1, 69-76
- Nikolaeva L.I., Belyavtsev A.N., Shevchenko N.G., Stuchinskaya M.D., Samokhvalov E.I., Dedova A.V., Saponov G.V., Shastina N.S., Kuprianov V.V.** The analysis of immunoreactivity of individual B-cell epitopes of hepatitis C virus (Flaviviridae: *Hepacivirus: Hepatitis C virus*) NS4a antigen. 3, 237-245
- Nosik D.N., Kalina L.B., Lobach O.A., Chataeva M.S., Berezhnaya E.V., Bochkova M.S., Kiseleva I.A., Selimova L.M., Nosik N.N.** Antiviral and virucidal activity of sodium deoxyribonucleate and its complex with iron against viruses of different kingdoms and families. 6, 506-515
- Ospelnikova T.P., Levitskaya D.S., Kolodyazhnaya L.V., Shitova A.D., Osipov V.N., Arifullina L.R., Kryukova N.O., Pakhomov D.V., Khromova E.A., Baranova I.A., Chuchalin A.G., Kostinov M.P., Svitich O.A.** Biological activity of interferons in the novel coronavirus infection COVID-19.\* 2, 142-152
- Ozhmegova E.N., Savochkina T.E., Prilipov A.G., Tikhomirov E.E., Larichev V.F., Sayfullin M.A., Grebennikova T.V.** Molecular epidemiological analysis of SARS-CoV-2 genovariants in Moscow and Moscow region. 6, 496-505
- 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*). 5, 403-413
- Povolyaeva O.S., Chadaeva A.A., Lunicyn A.V., Yurkov S.G.** Common bat's (*Pipistrellus pipistrellus*) lung diploid cell strains and their permissivity to orbiviruses (Reoviridae: *Orbivirus*) — pathogens of vector-borne animal diseases. 3, 227-236
- Sayfullin M.A., Zvereva N.N., Karan L.S., Grigoreva Ya.E., Akinshina Yu.A., Larichev V.F., Shamsheva O.V., Bazarova M.V., Smetanina S.V.** Characteristics of imported cases of Dengue fever and hemorrhagic Dengue fever in 2009–2019.\* 4, 322-330
- Shamsutdinova O.A., Bulgin D.V., Karal-ogly D.D., Lavrentieva I.N., Klots I.N.** Comparative analysis of residual neurovirulence of vaccine and low attenuated rubella virus (Matonaviridae: *Rubivirus: Rubella virus*) strains in the experiment on the macaque rhesus (*Macaca mulatta*) monkeys.\* 2, 133-141
- Shchemelev A.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Naidenova E.V., Zueva E.B., Valutite D.E., Churina M.A., Virolainen P.A., Totolian Areg A.** Genetic diversity of the human immunodeficiency virus (HIV-1) in the Kaliningrad region.\* 4, 310-321
- Shotin A.R., Mazloum A., Igolkin A.S., Shevchenko I.V., El-sukova A.A., Aronova E.V., Vlasova N.N.** Alternative approaches to the diagnosis of African swine fever in the Russian Federation in 2017–2021. 4, 290-303
- Velikzhanina E.I., Sanina T.A., Morozova O.V., Epifanova N.V., Novikova N.A.** Variability of genes encoding nonstructural proteins of rotavirus A (Reoviridae: *Rotavirus: Rotavirus A*) genotype G9P[8] during the period of dominance in the territory of Nizhny Novgorod (central part of Russia) (2011–2020).\* 6, 475-486
- Zhugunissov K.D., Mambetaliyev M.A., Azanbekova M.A., Kenzhebaeva M.K., Kilibayev S.S., Tuyskanova M.S., Dzhapasheva A.S., Omurtay A.D., Tabys Sh.T.** Isolation of a new strain M-2020 of the camelpox virus (Poxviridae: *Orthopoxvirus: Camelpox virus*) in Republic of Kazakhstan and study of its reproduction in various biological systems.\* 1, 77-86

## TO HELP THE VIROLOGIST

- Amanova Zh.T., Sametova Zh.Zh., Bulatov Ye.A.** Adaptation of the sheep pox virus (Poxviridae: *Chordopoxvirinae: Sheep pox virus*) to African green monkey kidney cell line and evaluation of its immunobiological properties. 5, 450-458
- Krivosheina E.I., Kartashov M.Yu., Naidenova E.V., Ushkalenko N.D., Pyankov S.A., Ternovoi V.A., Loktev V.B.** Development of a method for detection of specific antibodies to protein E yellow fever virus (Flaviviridae: *Flavivirus*) by enzyme immune assay method. 4, 341-350

## ANNIVERSARY DATES

- To the 90th birth anniversary of professor Georgy A. Galegov. 1, 87-88
- To the anniversary of Vitaly Vasilyevich Zverev, Full Member of Russian Academy of Sciences. 2, 165-166

## INFORMATION

RAS elections. 3, 258

## BOOK REVIEW

Materials received by the editorial office in response to the publication of the article «130th anniversary of virology» in the section «Editorial concept» in No. 5, 2022 of the journal «Problems of Virology» (Lvov D.K., Alkhovskiy S.V., Zhirnov O.P. 130<sup>th</sup> anniversary of virology. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(5): 357-384. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-140>). 6, 538-540

Problems  
of Virology

Voprosy  
Virusologii