



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

2

Том 68 • 2023

Volume 68 • Issue 2 • 2023

Издатель:
ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора
www.crie.ru

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

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

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

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

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

Журнал входит в базу данных SCOPUS и 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» 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)

В соответствии с рекомендациями ВАК (письмо ВАК от 06.12.2022 № 02-1198), Журнал относится к категории K1, как издание, входящее в базы данных SCOPUS и RSCI.

The journal is indexed in the SCOPUS database and is included in the «List of peer-reviewed scientific journals in which the main scientific results of dissertations for the PhD degree and for the degree of Doctor of Science should be published» recommended by the Higher Attestation Commission for the following specialities:

1.5.10 Virology (medical and biological sciences)

3.2.2 Epidemiology (medical and biological sciences)

3.1.22 Infectious diseases (medical and biological sciences)

3.3.6 Pharmacology, clinical pharmacology (medical and biological sciences)

In accordance with the recommendations of the Higher Attestation Commission (letter of the Higher Attestation Commission dated December 06, 2022 No. 02-1198), the Journal belongs to the K1 category, as a journal included in the SCOPUS and RSCI databases.

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, DOAJ, 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
E-mail: vopr.virusol@crie.ru

Начальник редакционно-
издательского отдела:
Осокина Ольга Владимировна
Заведующая редакцией:
Неверова Анна Леонидовна

Редакция не несёт ответственности за
содержание рекламных материалов.

К публикации принимаются только
статьи, подготовленные в соответ-
ствии с правилами для авторов
(см. <https://www.virusjour.crie.ru>).

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

Подписано в печать 30.04.2023.

Формат 60×90^{1/8}.

Тираж 50 экз.

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

© ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2023

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

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

(VOPROSY VIRUSOLOGII)

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

2

Том 68 · 2023

Редакционная коллегия

Главный редактор: **ЛЬВОВ Д.К.** (д.м.н., проф., акад. РАН)

Зам. главного редактора: **Гребенникова Т.В.** (д.б.н., проф.,
член-корр. РАН)

Ответственный секретарь: **Альховский С.В.** (д.б.н., член-корр. РАН)

Научный редактор: **Забережный А.Д.** (д.б.н., проф., член-корр. РАН)

Члены редколлегии:

Белоусова Р.В. (д.в.н., проф.)

Галегов Г.А. (д.б.н., проф.)

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

Гурцевич В.Э. (д.м.н., проф.)

Ершов Ф.И. (д.м.н., проф., акад. РАН)

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

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

Зуев В.А. (д.м.н., проф.)

Иванова О.Е. (д.м.н., проф.)

Карганова Г.Г. (д.б.н., проф.)

Колобухина Л.В. (д.м.н., проф.)

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

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

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

Попова А.Ю. (д.м.н., проф.)

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

Юминова Н.В. (д.б.н., проф.)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Акимкин В.Г. (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

Алипер Т.И. (д.б.н., проф.; Москва, Россия)

Антонов В.А. (д.м.н., проф.; Волгоград, Россия)

Бовин Н.В. (д.х.н., проф.; Москва, Россия)

Борисевич С.В. (д.б.н., проф., акад. РАН; Сергиев Посад, Россия)

Брико Н.И. (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

Васин А.В. (д.б.н.; Санкт-Петербург, Россия)

Глотов А.Г. (д.в.н., проф.; пос. Краснообск, Новосибирская обл., Россия)

Глулов В.В. (д.б.н., проф.; Новосибирск, Россия)

Заседателев А.С. (д.ф.-м.н., проф.; Москва, Россия)

Злобин В.И. (д.м.н., проф., акад. РАН; Иркутск, Россия)

Иванов А.И. (Хабаровск, Россия)

Кузин А.А. (д.м.н.; Санкт-Петербург, Россия)

Кутырев В.В. (д.м.н., проф., акад. РАН; Саратов, Россия)

Леонова Г.Н. (д.м.н., проф.; Владивосток, Россия)

Локтев В.Б. (д.б.н., проф.; Новосибирск, Россия)

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

Макаров В.В. (д.б.н., проф.; Москва, Россия)

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

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

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

Негёсов С.В. (д.б.н., проф., акад. РАН; Новосибирск, Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Чвала И.А. (к.в.н.; Владимир, Россия)

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

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

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

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

Яшкулов К.Б. (к.м.н., Элиста, Россия)

МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

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

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

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

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

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

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

Oxford J. (DSc; London, UK)

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

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

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

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

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

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

Webby R. (PhD; Memphis, USA)

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

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

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

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

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

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

EDITORIAL OFFICE:

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

Head of Editorial Office:
Anna L. Neverova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

The materials that do not meet the requirements of the journal (<https://www.virusjour.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 April 30, 2023.
Print format 60 × 90^{1/8},
Circulation 50 copies.⁸

Produced at the Buki Vedi
Printing House,
115093, 1, 1st Party lane, Moscow,
Russian Federation.
E-mail: info@bukivedi.com.
www.bukivedi.com
© Central Research Institute
for Epidemiology, 2023

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

PROBLEMS OF VIROLOGY

(VOPROSY VIRUSOLOGII)

SCIENTIFIC THEORETICAL JOURNAL ISSUED
ONCE IN TWO MONTHS

Published since 1956

2

Volume 68 · 2023

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

- Пашков Е.А., Момот В.Ю., Пак А.В., Самойликов Р.В., Пашков Г.А., Усатова Г.Н., Кравцова Е.О., Поддубиков А.В., Нагиева Ф.Г., Сидоров А.В., Пашков Е.П., Свитич О.А., Зверев В.В.**
Влияние комплексов мРНК на репродукцию вируса гриппа А
(*Orthomyxoviridae: Alphainfluenzavirus*) *in vivo* 95
- Кузнецова Н.А., Огаркова Д.А., Гушин В.А., Антипьев Н.А., Бакалин В.В., Бургасова О.А., Васильченко Л.А., Дивисенко Е.В., Колобухина Л.В., Кружкова И.С., Никифорова М.А., Одноралов М.А., Самков А.А., Симакова Я.В., Синявин А.Э., Ткачук А.П., Шидловская Е.В., Тюрин И.Н., Злобин В.И., Гинцбург А.Л.**
Оценка динамики выявления жизнеспособного SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) в биологических образцах, полученных от пациентов с COVID-19 в условиях стационара, как одного из показателей инфекционности вируса 105
- Adekola H.A., Ojo D.A., Balogun S.A., Dipeolu M.A., Mohammed M., Adejo D.S., Aliyu R.M., Abdullahi M.A., Madugu N.H.**
Частота выявления IgM-антител к вирусу Зика у беременных женщин в Северной Нигерии 117
- Джекебеков К.К., Асанжанова Н.Н., Нурпейсова А.С., Рыскельдинова Ш.Ж., Абсатова Ж.С., Абай Ж.С., Шаяхметов Е.А., Омуртай А.Д., Молдагулова С.У., Калимолда Э.Ж., Садикалиева С.О., Шораева К.А., Закарья К.Д.**
Выбор эффективного режима инактивации вируса *Pseudopestis avium* (*Paramyxoviridae: Orthoavulovirus: Avian orthoavulovirus 1*) для изготовления вакцины против болезни Ньюкасла. 124
- Мухин А.Н., Алексеев К.П., Южаков А.Г., Селезнева Е.В., Москвина А.С., Верховский О.А., Алипер Т.И.**
Антигенная и иммуногенная активность вирусоподобных частиц на основе рекомбинантных главных капсидных белков вирусов геморрагической болезни кроликов (*Caliciviridae: Lagovirus*) генотипов GI1, GI2 132
- Пчельников А.В., Яцентюк С.П., Красникова М.С.**
Циркуляция вирусов герпеса крупного рогатого скота (*Herpesviridae: Varicellovirus*) и диареи крупного рогатого скота (*Flaviviridae: Pestivirus*) среди диких парнокопытных животных Московской области. 142
- Шиповалов А.В., Кудров Г.А., Карташов М.Ю., Драчкова И.А., Пьянков О.В., Омигов В.В., Таранов О.С., Теплякова Т.В.**
Противовирусная активность водного экстракта базидиального гриба *Inonotus obliquus* в отношении вируса SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Betacoronavirus: Sarbecovirus*) в экспериментах *in vivo* на мышах линии BALB/c 152
- Филатов И.Е., Цибезов В.В., Баландина М.В., Норкина С.Н., Латышев О.Е., Елисеева О.В., Черепушкин С.А., Верховский О.А., Гребенникова Т.В.**
Использование вирусоподобных частиц на основе рекомбинантных вирусных белков VP2/VP6 ротавируса А для оценки гуморального иммунного ответа методом ИФА 161
- НЕКРОЛОГИ**
- Николай Николаевич Носик 172
- ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ**
- Памяти выдающегося вирусолога. Юбилей Михаила Семеновича Балаяна 173

CONTENTS

ORIGINAL RESEARCHES

- Pashkov E.A., Momot V.Yu., Pak A.V., Samoilkov R.V., Pashkov G.A., Usatova G.N., Kravtsova E.O., Poddubikov A.V., Nagieva F.G., Sidorov A.V., Pashkov E.P., Svitich O.A., Zverev V.V.**
Influence of siRNA complexes on the reproduction of influenza A virus
(Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) *in vivo* 95
- Kuznetsova N.A., Ogarkova D.A., Gushchin V.A., Antipyat N.A., Bacalin V.V., Burgasova O.A., Vasilchenko L.A., Divisenko E.V., Kolobukhina L.V., Kruzhkova I.S., Nikiforova M.A., Odnoralov M.A., Samkov A.A., Simakova Ya.V., Siniavin A.E., Tkachuk A.P., Shidlovskaya E.V., Tyurin I.N., Zlobin V.I., Gintsburg A.L.**
Evaluation of the dynamics of detection of viable SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Betacoronavirus: Sarbecovirus*) in biological samples obtained from patients with COVID-19 in a health care setting, as one of the indicators of the infectivity of the virus. 105
- Adekola H.A., Ojo D.A., Balogun S.A., Dipeolu M.A., Mohammed M., Adejo D.S., Aliyu R.M., Abdullahi M.A., Madugu N.H.**
The prevalence of IGM antibodies to Zika virus in pregnant women in Northern Nigeria 117
- Jekebekov K.K., Assanzhanova N.N., Nurpeisova A.S., Ryskeldinova Sh.Zh., Absatova Zh.S., Abay Zh.S., Shayakhmetov Ye.A., Omurtay A.D., Moldagulova S.U., Kalimolda E.Zh., Sadikalieva S.O., Shorayeva K.A., Zakarya K.D.**
Selection of conditions for effective inactivation of *Pseudopestis avium* virus (Paramyxoviridae: *Orthoavulovirus: Avian orthoavulovirus 1*) for the production of a Newcastle disease vaccine. 124
- Mukhin A.N., Alekseev K.P., Yuzhakov A.G., Selezneva E.V., Moskvina A.S., Verkhovsky O.A., Aliper T.I.**
Antigenic and immunogenic activity of virus-like particles based on rabbit hemorrhagic disease virus (Caliciviridae: *Lagovirus*) genotypes GI1 and GI2 recombinant major capsid proteins. 132
- Pchelnikov A.V., Yatsentyuk S.P., Krasnikova M.S.**
Circulation of bovine herpesvirus (Herpesviridae: *Varicellovirus*) and bovine viral diarrhea virus (Flaviviridae: *Pestivirus*) among wild artiodactyls of the Moscow region. 142
- Shipovalov A.V., Kudrov G.A., Kartashov M.Yu., Drachkova I.A., Pyankov O.V., Omigov V.V., Taranov O.S., Teplyakova T.V.**
Antiviral activity of basidial fungus *Inonotus obliquus* aqueous extract against SARS-CoV-2 virus (Coronaviridae: *Betacoronavirus: Sarbecovirus*) *in vivo* in BALB/c mice model. 152
- Filatov I.E., Tsibezov V.V., Balandina M.V., Norkina S.N., Latyshev O.E., Eliseeva O.V., Cherepushkin S.A., Verkhovsky O.A., Grebennikova T.V.**
Virus-like particles based on rotavirus A recombinant VP2/VP6 proteins for assessment the antibody immune response by ELISA 161
- OBITUARY**
- Nikolai Nosik 172
- ANNIVERSARY DATES**
- In memory of an outstanding virologist. Anniversary of M.S. Balayan. 173

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-159>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Влияние комплексов миРНК на репродукцию вируса гриппа А (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) *in vivo*

Пашков Е.А.^{1,2}, Момот В.Ю.¹, Пак А.В.¹, Самойликов Р.В.², Пашков Г.А.¹, Усатова Г.Н.¹, Кравцова Е.О.¹, Поддубиков А.В.², Нагиева Ф.Г.², Сидоров А.В.², Пашков Е.П.¹, Свитич О.А.^{1,2}, Зверев В.В.^{1,2}

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

²ФГБУН «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Минздрава России, 105064, г. Москва, Россия

Введение. Грипп является одной из самых актуальных проблем мирового здравоохранения. Несмотря на широкий спектр противогриппозных препаратов, остро стоит проблема формирования вирусной резистентности, что требует поиска новых возможностей её преодоления. Перспективным решением представляется создание лекарственных препаратов, действие которых основано на ингибировании активности клеточных генов посредством РНК-интерференции.

Цель – оценка профилактического потенциала миРНК, направленных к клеточным генам *FLT4*, *Nup98* и *Nup205 in vivo*, в отношении гриппозной инфекции.

Материалы и методы. В исследовании использован штамм вируса гриппа A/California/7/09 (H₁N₁), мыши BALB/c. Введение миРНК и заражение животных выполняли интраназально. Учёт результатов выполняли посредством молекулярно-генетических и вирусологических методов.

Результаты. Применение комплексов миРНК *Nup98.1* и *Nup205.1* приводило к достоверному снижению вирусной репродукции и вРНК на третьи сутки после заражения. Параллельно с этим выполнялась одно-временная трансфекция двух комплексов миРНК (*Nup98.1* и *Nup205.1*). При использовании данного комплекса также отмечалось достоверное снижение вирусного титра и вРНК по сравнению с контрольными группами.

Выводы. Применение миРНК *in vivo* способно приводить к противовирусному эффекту как при одиночном, так и при одновременном подавлении активности нескольких клеточных генов. Результаты свидетельствуют о том, что использование миРНК, направленных к клеточным генам, чьи продукты экспрессии участвуют в процессе вирусной репродукции, является одним из потенциально перспективных методов профилактики и терапии не только гриппозной, но и других респираторных инфекций.

Ключевые слова: РНК-интерференция; вирус гриппа А; экспрессия генов; миРНК; вирусная РНК; вирусная репродукция; *Nup98*; *Nup205*

Для цитирования: Пашков Е.А., Момот В.Ю., Пак А.В., Самойликов Р.В., Пашков Г.А., Усатова Г.Н., Кравцова Е.О., Поддубиков А.В., Нагиева Ф.Г., Сидоров А.В., Пашков Е.П., Свитич О.А., Зверев В.В. Влияние комплексов миРНК на репродукцию вируса гриппа А (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) *in vivo*. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(2): 95-104. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-159> EDN: <https://elibrary.ru/rheuqd>

Для корреспонденции: Пашков Евгений Алексеевич, младший научный сотрудник ФГБУН «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва, Россия. E-mail: rashckov.j@yandex.ru

Участие авторов: Пашков Е.А., Момот В.Ю., Пак А.В., Самойликов Р.В., Пашков Г.А. – выполнение экспериментов; Пашков Е.А., Усатова Г.Н., Кравцова Е.О. – написание текста, заключение; Поддубиков А.В., Нагиева Ф.Г., Сидоров А.В. – научное редактирование; Пашков Е.П., Свитич О.А., Зверев В.В. – резюме, общая редакция.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке проекта Российской Федерацией в лице Министерства образования и науки России, соглашение № 075-15-2021-676 от 28.07.2021.

Благодарность. Авторы выражают благодарность центру коллективного пользования ФГБУН «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова». Исследование выполнено с использованием научного оборудования центра коллективного пользования ФГБУН «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES, July 23, 2010). Исследование одобрено этическим комитетом ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол № 04-21 от 18.02.2021).

Поступила 16.02.2023
Принята в печать 10.04.2023
Опубликована 30.04.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-159>

Influence of siRNA complexes on the reproduction of influenza A virus (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) *in vivo*

Evgenij A. Pashkov^{1,2}, Viktoriia Yu. Momot¹, Anastasia V. Pak¹, Roman V. Samoiliikov², George A. Pashkov¹, Galina N. Usatova¹, Elena O. Kravtsova¹, Alexander V. Poddubikov², Firaya G. Nagieva², Alexander V. Sidorov², Evgenij P. Pashkov¹, Oxana A. Svitich^{1,2}, Vitaliy V. Zverev^{1,2}

¹Sechenov First Moscow State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 119991, Moscow, Russia;

²I.I. Mechnikov Scientific and Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia

Introduction. Influenza is one of the most pressing global health problems. Despite the wide range of available anti-influenza drugs, the viral drug resistance is an increasing concern and requires the search for new approaches to overcome it. A promising solution is the development of drugs with action that is based on the inhibition of the activity of cellular genes through RNA interference.

Aim. Evaluation *in vivo* of the preventive potential of miRNAs directed to the cellular genes *FLT4*, *Nup98* and *Nup205* against influenza infection.

Materials and methods. The A/California/7/09 strain of influenza virus (H₁N₁) and BALB/c mice were used in the study. The administration of siRNA and experimental infection of animals were performed intranasally. The results of the experiment were analyzed using molecular genetic and virological methods.

Results. The use of siRNA complexes Nup98.1 and Nup205.1 led to a significant decrease in viral reproduction and concentration of viral RNA on the 3rd day after infection. When two siRNA complexes (Nup98.1 and Nup205.1) were administered simultaneously, a significant decrease in viral titer and concentration of viral RNA was also noted compared with the control groups.

Conclusions. The use of siRNAs *in vivo* can lead to an antiviral effect when the activity of single or several cellular genes is suppressed. The results indicate that the use of siRNAs targeting the cellular genes whose expression products are involved in viral reproduction is one of the promising methods for the prevention and treatment of not only influenza, but also other respiratory infections.

Keywords: RNA interference; influenza A virus; gene expression; siRNA; viral RNA; viral reproduction; Nup98; Nup205

For citation: Pashkov E.A., Momot V.Yu., Pak A.V., Samoiliikov R.V., Pashkov G.A., Usatova G.N., Kravtsova E.O., Poddubikov A.V., Nagieva F.G., Sidorov A.V., Pashkov E.P., Svitich O.A., Zverev V.V. Influence of siRNA complexes on the reproduction of influenza A virus (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) *in vivo*. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(2): 95-104 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-159> EDN: <https://elibrary.ru/rheuqd>

For correspondence: Evgeny A. Pashkov, Junior Researcher, I.I. Mechnikov Scientific and Research Institute of Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia. E-mail: pashckov.j@yandex.ru

Information about authors:

Pashkov E.A., <https://orcid.org/0000-0002-5682-4581>

Momot V.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-3476-5485>

Pak A.V., <https://orcid.org/0000-0003-4295-7858>

Samoiliikov R.V., <https://orcid.org/0000-0001-6405-1390>

Pashkov G.A., <https://orcid.org/0000-0003-0392-9969>

Usatova G.N., <https://orcid.org/0000-0002-8955-3570>

Kravtsova E.O., <https://orcid.org/0000-0002-9100-0422>

Poddubikov A.V., <https://orcid.org/0000-0001-8962-4765>

Nagieva F.G., <https://orcid.org/0000-0001-8204-4899>

Sidorov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-3561-8295>

Pashkov E.P., <https://orcid.org/0000-0002-4963-5053>

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

Zverev V.V., <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

Contribution: Pashkov E.A., Momot V.Yu., Pak A.V., Samoilikov R.V., Pashkov G.A. – execution of experiments; Pashkov E.A., Usatova G.N., Kravtsova E.N. – text writing, conclusion; Poddubikov A.V., Nagieva F.G., Sidorov A.V. – scientific editing; Pashkov E.P., Svitich O.A., Zverev V.V. – summary, general edition.

Funding. The research was carried out with the financial support of the project by the Russian Federation represented by the Ministry of Education and Science of Russia, agreement No. 075-15-2021-676 dated July 7, 2021.

Acknowledgments: The authors are grateful to the Center for Collective Use of the I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera. The study was carried out using the scientific equipment of the Center for Collective Use of the I.I. Mechnikov Scientific and Research Institute of Vaccines and Sera.

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

Ethical statement. 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 study was approved by the Ethics Committee of Sechenov University (Minutes No. 04-21 dated February 18, 2021).

Received 16 February 2023

Accepted 10 April 2023

Published 30 April 2023

Введение

Данная статья является продолжением работ по созданию эффективных и безопасных средств терапии вирусных инфекций, начатых в 2019 г. группой ученых Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (НИИ ВС им. И.И. Мечникова, Россия) [1–3].

Одними из наиболее распространённых инфекционных заболеваний верхних дыхательных путей и лёгких являются инфекции, вызванные вирусом гриппа А. Ежегодно от гриппа страдает до 20% мирового населения, а также отмечается до 650 000 случаев летальных исходов [4]. Появление новых вирулентных штаммов способно спровоцировать развитие пандемий, что, в свою очередь, может привести к многомиллионным жертвам, как это было во время пандемий гонконгского и испанского гриппа [5, 6]. Использование вакцинных препаратов в качестве профилактической меры не способно полностью предотвратить заболеваемость среди населения ввиду формирования иммунитета лишь к определённым штаммам вирусов, что снижает эффективность их применения по отношению к новым эмерджентным штаммам. Помимо этого, есть и другие причины, снижающие положительный эффект от применения вакцин: низкий уровень доверия населения к вакцинопрофилактике, антипрививочная пропаганда, а также пациенты, чья вакцинация не представляется возможной по причине определённых противопоказаний [7–9]. Использование иных противогриппозных препаратов несёт профилактический и терапевтический эффект, однако их широкое применение ограничено постоянным появлением резистентных к ним вариантов вирусов и риском развития нежелательных побочных эффектов [10–13].

Исходя из этого, на сегодняшний день существует острая потребность в принципиально новом противовирусном препарате, для которого не будет иметь значения образование новых резистентных штаммов. Разрабатываемые препараты, чей механизм действия основан на явлении РНК-интерференции, могут стать решением проблемы вирусной резистентности.

РНК-интерференция – внутриклеточный процесс, в результате которого происходит деградация матричной РНК (мРНК) посредством молекул малых

интерферирующих РНК (миРНК). В клетках млекопитающих РНК-интерференция может быть запущена как синтетическими миРНК, так и полученными в результате нарезки эндонуклеазой Dicer чужеродной двухцепочечной РНК [14]. РНК-интерференция протекает в несколько этапов: экзогенная мРНК разделяется белком-эндонуклеазой Dicer на короткие (20–25 п.н.) последовательности, которые являются миРНК. Далее миРНК связывается с белковым комплексом RISC (RNA-induced silencing complex). Полученный комплекс миРНК и RISC подвергает целевую мРНК деградации [15].

Ввиду того что миРНК обеспечивают снижение экспрессии любого выбранного гена, в настоящее время они представляют собой класс молекул, имеющих важное медицинское значение. В ряде независимых исследований уже был показан противовирусный эффект в отношении таких заболеваний, как респираторно-синцитиальная вирусная инфекция, ВИЧ-инфекция, гепатит В и С, грипп [16–20]. Был также показан терапевтический эффект от применения препаратов Патисиран (Patisiran) и Гивосиран (Givosiran), применяемых в терапии генетически обусловленных заболеваний – амилоидной полинейропатии и острой печеночной порфирии [21, 22]. Точно также ранее нами было показано, что миРНК, направленные к клеточным генам *FLT4*, *Nup98* и *Nup205*, играющим важную роль в процессах эндоцитоза вируса гриппа и в импорте и экспорте сегментов вирусной РНК (вРНК) в полость ядра, способны ингибировать репродукцию вируса гриппа А в культуре клеток лёгких A549 [1–3]. Для разработки и создания препаратов миРНК, допустимых к применению у людей, необходимо провести оценку противовирусного действия миРНК на животной модели. Дополнительно препараты миРНК не должны обладать выраженным токсическим действием и побочным эффектом на фоне подавления экспрессии генов клетки-хозяина.

Резюмируя вышесказанное, следует отметить, что вирусные респираторные инфекции на сегодняшний день являются одним из наиболее актуальных источников заболеваемости и смертности в мире. Ввиду ограниченного эффекта от применения имеющихся в настоящее время вакцин и противовирусных препаратов особо важной задачей для отечественного здра-

Таблица. Последовательности миРНК, использованные в работе**Table. Sequences of siRNAs used in the study**

миРНК / siRNA	Последовательность / Sequence
FLT4.1	5'-UCACAUAGAAGUAGAUGAGdTdC-3' 5'-CUCAUCUACUUCUAUGUGAdCdC-3'
FLT4.2	5'-UGUGAAUUAGGAUCUUGAGdCdT-3' 5'-CUCAAGAUCUAAUUCACAdTdC-3'
Nup98.1	5'-UUUGUACUGAUGUUAGUGCdTdA-3' 5'-GCACUAAACUACAGUACAAAdGdC-3'
Nup98.2	5'-AUCCAAUUUAGAUUUGUCdAdA-3' 5'-GACAAAUUUUAGAUUUGGAdGdA-3'
Nup205.1	5'-AUCUACAAAUCUUCAGCdTgG-3' 5'-GCUUGAAGAUUUUGUAGAUdCdA
siL2 (неспецифическая миРНК / nonspecific siRNA)	5'-UUUCCGUCaucgucuuCCdTdT-3' 5'-GGAAAGACGAUGACGGAAAdTdT-3'

воохранения становится разработка принципиально новых методов терапии и профилактики респираторных вирусных инфекций. Одним из потенциально перспективных методов терапии гриппозной инфекции является применение миРНК, направленных к клеточным генам, косвенно принимающим участие в вирусной репродукции. Исходя из этого, **целью** работы является оценка профилактического потенциала миРНК, направленных к клеточным генам *FLT4*, *Nup98* и *Nup205 in vivo*, в отношении гриппозной инфекции.

Материалы и методы

миРНК

Подбор миРНК осуществлялся к кодирующим областям мРНК, а конкретно к экзонсодержащим областям, и обуславливался тем, что после сплайсинга экзоны соединяются между собой, образуя зрелую мРНК (промежуточный продукт экспрессии гена). Уже зрелая мРНК подвергается воздействию со стороны миРНК, в результате чего на стадии трансляции не происходит синтеза конечного продукта экспрессии гена – белка.

Дизайн миРНК осуществляли с помощью ресурса siDirect 2.0¹. Олигорибонуклеотиды («Синтол», Россия) разводили водой до концентрации 100 пмоль/мкл. Далее комплементарные олигонуклеотиды («Синтол», Россия) смешивали, инкубировали в термостате при 60 °С в течение 1 мин, затем охлаждали до комнатной температуры. Готовые РНК-дуплексы хранили при температуре –70 °С. Все работы с готовыми дуплексами проводились с использованием холодового штатива. Последовательности используемых миРНК представлены в **таблице**. Каждый олигорибонуклеотид имеет два дезоксирибонуклеотида на 3'-конце. Это необходимо для минимизации отрицательного влияния

ферментов-экзонуклеаз. В качестве неспецифического контроля использовалась миРНК siL2, специфичная к гену светляковой люциферазы и не влияющая на жизненный цикл клеток A549.

Вирус

В работе использован вирус гриппа A/California/7/09 (H₁N₁), полученный из коллекции вирусов НИИ ВС им. И.И. Мечникова. Культивирование и определение титра вируса проводилось на культуре клеток MDCK.

Культуры клеток

В работе использовались клетки почек кокер-спаниеля MDCK (Институт Пастера, Франция) и клетки мышечных фибробластов L929 (НИИ ВС им. И.И. Мечникова, Россия). Клетки MDCK выращивали в среде MEM («ПанЭко», Россия), содержащей 5% эмбриональной сыворотки коров (ЭСК) Gibco (Fisher Scientific, Новая Зеландия), 40 мкг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия) и 300 мкг/мл L-глутамин («ПанЭко», Россия) при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Клетки L929 выращивали в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 5% ЭСК, 40 мкг/мл гентамицина и 300 мкг/мл L-глутамин при 37 °С в CO₂-инкубаторе.

Мыши

Мышей линии BALB/C – самок с массой тела 17–20 г – получали из питомника «Столбовая» (Московская обл., Россия). Животные содержались в виварии на стандартном рационе со свободным доступом к брикетированному корму и воде. Содержание соответствовало правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник. Маркировка мышей производилась с помощью красителей.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES, July 23, 2010). Исследование одобрено этическим комитетом ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» (протокол № 04-21 от 18.02.2021).

Введение комплексов миРНК мышам с последующим заражением вирусом гриппа A/California/7/09 H₁N₁

Мышей заражали в возрасте от 7 до 9 недель. Рекомендуемое количество вещества миРНК составило 1,5 нмоль/мкл [23]. миРНК вводились мышам интраназально под наркозом по 30 мкл на особь. Введение миРНК осуществлялось без использования носителя. Через 4 ч после интраназального введения миРНК проводилось заражение мышей вирусом гриппа A/California/7/09 H₁N₁ в дозе LD₅₀. Объем введенной вируссодержащей жидкости составил 30 мкл для каждой особи кроме тех, которые были включены в отрицательный контроль.

Получение лёгких мышей

На 3-й день после введения комплексов миРНК и инфицирования вирусом гриппа мышей умерщвляли и в стерильных условиях извлекали лёгкие. После

¹siDirect version 2.0. Highly effective, target specific siRNA online design site. Available from: <https://sirect2.mai.jp>.

промывки в растворе Хенкса проводилась гомогенизация лёгких. Далее гомогенат осветляли от клеточного детрита центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин. Полученный супернатант использовали для определения вирусного титра и изменения количества вРНК.

Выявление вРНК

вРНК выделяли из лёгочного гомогената мышей набором ExtractRNA (Evrogen, Россия). Для постановки реакции обратной транскрипции (ОТ) применяли набор реагентов ОТ-1 («Синтол», Россия). Изменение концентрации вРНК контролировали с помощью количественной ОТ-ПЦР-РВ (полимеразной цепной реакции с ОТ в реальном времени) с набором праймеров и зондов к М-гену вируса гриппа А. Для ПЦР-РВ использовали набор реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии красителя EVA Green и референсного красителя ROX («Синтол», Россия). Рабочая концентрация праймеров и зондов составила 10 и 5 пмоль/мкл соответственно. Реакция ПЦР-РВ проводилась в амплификаторе ДТ-96 («ДНК-технология», Россия). Температурно-временной режим составил 95 °С 5 мин (1 цикл), 62 °С – 40 с, 95 °С – 15 с (40 циклов). Праймеры и зонды («Синтол», Россия) представлены в нашем раннем исследовании [1].

Расчёт экспрессии целевого гена с использованием критерия $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Оценка изменения экспрессии целевого гена проводилась с использованием критерия $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Проводился расчёт разницы трёх повторов пороговых циклов ПЦР (ΔCt) между исследуемыми генами отрицательного контроля и геном домашнего хозяйства *GAPDH*: $\Delta Ct = Ct$ (интересующий ген) – Ct (*GAPDH*).

Аналогичный расчёт ΔCt проводился для клеток, обработанных миРНК. Полученные данные усреднялись.

После определения ΔCt для всех групп исследования полученные с трёх повторов данные ΔCt усреднялись, а затем рассчитывалось значение $\Delta\Delta Ct$ относительно среднего значения ΔCt для клеток, обработанных миРНК:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (обработанный образец)} - \Delta Ct \text{ (отрицательный контроль)}.$$

Для определения критерия $2^{-\Delta\Delta Ct}$ необходимо 2 возвести в полученное значение $\Delta\Delta Ct$ для каждого исследуемого гена [24]. Далее данные $2^{-\Delta\Delta Ct}$ будут представлены в процентах. Расчёт изменения экспрессии проводился относительно изменения экспрессии целевых генов (*FLT4*, *Nup98* и *Nup205*) в неинфицированной культуре клеток, трансфицированной миРНК L2, неспецифичной по отношению к указанным мышным.

Титрование вируса по конечной точке цитопатического действия

Вирусный титр определялся по крайней точке визуального проявления цитопатического эффекта в культуре клеток MDCK. Клетки MDCK сеяли в 96-луноч-

ные планшеты с посевной концентрацией 1×10^4 /см². Через двое суток питательная среда удалялась из лунок, вносили 10-кратные последовательные разведения вирусного материала в поддерживающей среде без трипсина и инкубировали на протяжении четырех суток в CO₂-инкубаторе при 37 °С. На четвертые сутки проводили визуальный учёт результатов титрования под микроскопом на наличие специфического цитопатического эффекта для вируса гриппа (изменение, деформация, открепление мёртвых клеток со дна лунки). Вирусный титр рассчитывался по М.А. Ramakrishnan [25] и выражался как логарифм тканевых цитопатогенных доз (\lg ТЦД₅₀/мл).

Статистическая обработка данных

Статистическую значимость полученных результатов определяли с помощью критерия Манна–Уитни. Разница считалась достоверной при $p \leq 0,01$ и $p \leq 0,05$.

Результаты

Оценка ингибирующего эффекта миРНК на экспрессию целевых генов

Промежуточным продуктом экспрессии гена является мРНК, а конечным – белок [26]. Для оценки подавляющего влияния миРНК на экспрессию генов *FLT4*, *Nup98* и *Nup205* была взята культура L929 и проведена трансфекция миРНК в эту культуру. Продукты экспрессии отобранных генов активно взаимодействуют с вирусом гриппа на разных этапах его репродукции [27–29]. Далее выполнялась проверка способности полученных синтетических миРНК ингибировать экспрессию целевых генов. При трансфекции миРНК *Nup98.1* и *Nup205.1* экспрессия целевых генов в среднем снижалась на 61% на первые сутки и на 44% на вторые сутки относительно неспецифического контроля L2. Снижение экспрессии на 34% на третьи сутки отмечалось при использовании миРНК *Nup98.1* и *Nup205.1* относительно неспецифического контроля L2. В качестве неспецифического контроля было принято изменение экспрессии генов *Nup98* и *Nup205* в неинфицированной культуре клеток, обработанных миРНК L2, направленной к гену светляковой люциферазы. За 100% транскрипции клеточных генов *Nup98* и *Nup205* было принято изменение экспрессии данных генов в неинфицированной культуре клеток, обработанных миРНК L2. Применение миРНК *FLT4.1*, *FLT4.2* и *Nup98.2* не приводило к какому-либо изменению экспрессии относительно неспецифической миРНК L2. Оценка подавления экспрессии генов проводилась с использованием метода $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [30]. На рис. 1 показана эффективность нокдауна мРНК в клетках L929.

Влияние одиночных комплексов миРНК на изменение массы тела после заражения

Одним из критериев эффективности применения противовирусных препаратов является снижение потери массы тела в результате инфекции. После заражения мышей вирусом гриппа А/California/7/09 (H₁N₁) не наблюдалось выраженных различий в по-

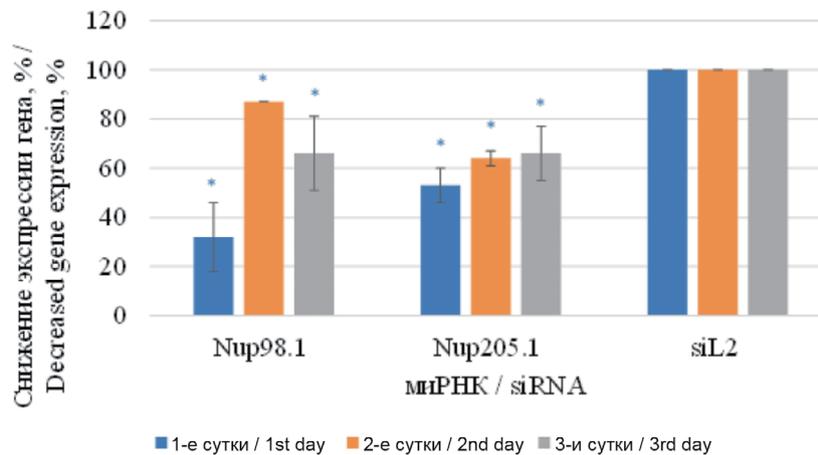


Рис. 1. Влияние миРНК на экспрессию генов *Nup98* и *Nup205*.

По оси абсцисс указаны названия миРНК, направленных к одноимённым генам. По оси ординат показано изменение экспрессии генов *Nup98* и *Nup205* после обработки клеток комплексами миРНК относительно неспецифической миРНК L2 (в %). * $p \leq 0,05$.

Fig. 1. Effect of siRNA on the expression of genes *FLT4*, *Nup98*, and *Nup205*.

The X-axis shows the names of siRNAs targeting the genes of the same name. The Y-axis shows the changes in the expression of the *FLT4*, *Nup98* and *Nup205* genes after treatment of cells with siRNA complexes relative to nonspecific siRNA L2, expressed (in %). * $p \leq 0.05$.

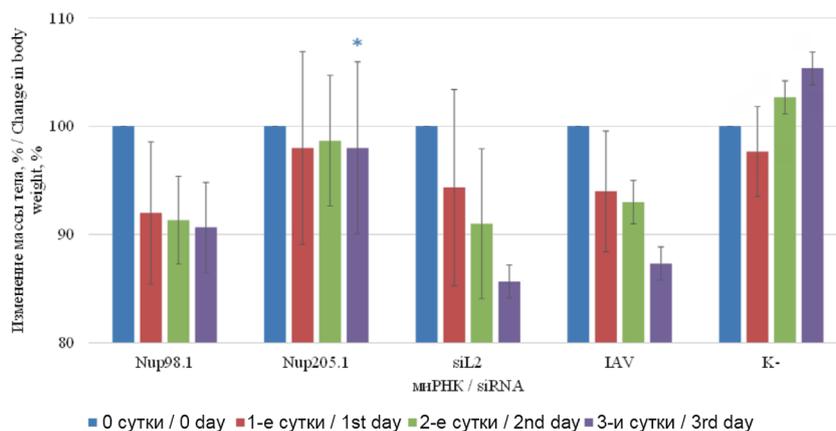


Рис. 2. Влияние комплексов миРНК на изменение массы мышей в течение трёх суток после заражения вирусом гриппа A/California/7/09 (H_1N_1) в динамике.

На оси абсцисс представлены миРНК и их одноимённые целевые клеточные гены. На оси ординат представлено изменение массы тела в (в %). * $p \leq 0,05$.

Fig. 2. The effect of siRNA complexes on dynamic changes of mice body weight during three days after infection with the influenza A/California/7/09 (H_1N_1) virus.

The X-axis shows siRNAs and respective target cellular genes of the same name. The Y-axis shows the changes in body weight, expressed (in %). * $p \leq 0.05$.

тере массы тела между контрольными группами мышей и мышами, обработанными молекулами миРНК. После интраназального введения мышам миРНК Nup205.1 не отмечалось выраженной потери массы, а на третьи сутки после интраназального введения миРНК показатель массы мышей в этих группах был достоверно различим по сравнению с группами неспецифического и вирусного контроля. Полученные данные представлены на **рис. 2**.

Влияние комплексов миРНК на репродукцию вируса гриппа A/California/7/09 (H_1N_1) in vivo

Далее проводилась оценка противовирусного эффекта комплексов миРНК в отношении вируса гриппа A/California/7/09 (H_1N_1). Мышей забивали на третьи сутки после интраназального введения миРНК и зара-

жения, после чего извлекали лёгкие, выделяли из них вирус и проводили его титрование. Было установлено, что при LD_{50} использование всех миРНК приводило к снижению вирусной репродукции. Применение миРНК Nup98.1 приводило к снижению вирусной репродукции на третьи сутки на 2,3 lg ТЦД₅₀/мл по отношению к неспецифическому и вирусному контролю. На 2,1 lg ТЦД₅₀/мл достоверно снижался вирусный титр по отношению к контрольным группам соответственно при использовании миРНК Nup205.1. Полученные данные представлены на **рис. 3**.

Влияние комплексов миРНК на динамику вРНК вируса гриппа A/California/7/09 (H_1N_1) in vivo

Далее было проведено определение изменения вРНК при обработке клеток миРНК. При оценке вли-

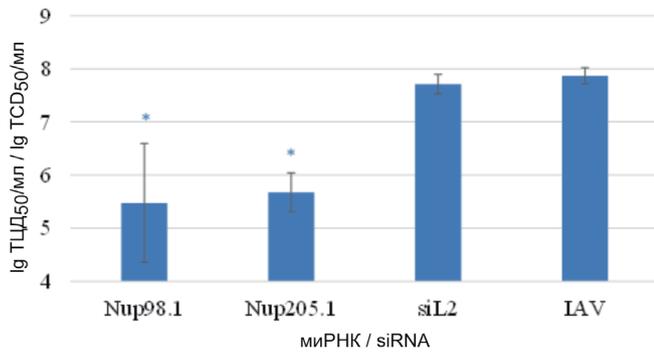


Рис. 3. Влияние подавления генов *Nup98* и *Nup205* посредством миРНК на репродукцию вируса гриппа A/California/7/09 (H₁N₁) на третьи сутки с момента трансфекции при LD₅₀.

По оси абсцисс – названия миРНК. По оси ординат представлен показатель вирусного титра. **p* ≤ 0,05.

Fig. 3. Effect of siRNA suppression of the *Nup98* and *Nup205* genes on the reproduction of influenza A/California/7/09 (H₁N₁) virus on the third day after infection with LD₅₀.

The X-axis shows the name of the siRNA. The Y-axis shows the viral titers. **p* ≤ 0.05.

яния миРНК на изменение количества вРНК при использовании штамма A/California/7/09 (H₁N₁) было установлено, что обработка клеток миРНК Nup98.1 и Nup205.1 приводила к достоверно эффективному снижению вРНК на третьи сутки после заражения клеток по сравнению с неспецифическим и вирусным контролем в 6,6 и 2,9 раза соответственно. Полученные данные представлены на рис. 4.

Влияние пула миРНК на репродукцию вируса гриппа A/California/7/09 (H₁N₁) in vivo

Исходя из полученных результатов, нами были отобраны две миРНК, наиболее эффективно показавшие себя в качестве одиночных противовирусных молекул, – Nup98.1 и Nup205.1 (Nup98/Nup205). Из этих двух миРНК был создан пул, одновременно направленный к одноимённым генам. Далее мы интраназально ввели данный комплекс мышам, после чего заразили их вирусом гриппа A/California/7/09 (H₁N₁). Мышей забивали на третьи сутки, после чего из лёгких выделяли вирус для последующего титрования, а также определяли количество вРНК. При оценке вирусной репродукции было получено, что у мышей, которым интраназально вводился комплекс Nup98.1/Nup205.1 (Nup98/Nup205), вирусный титр был достоверно ниже (на 1,4 lg TCID₅₀/мл) по сравнению с неспецифическим контролем. Полученные данные представлены на рис. 5.

Влияние пула миРНК Nup98.1/Nup205.1 на изменение вРНК на третьи сутки с момента трансфекции при LD₅₀

Наряду с этим было получено, что при снижении вирусного титра также наблюдалась и достоверная разница (в 2 раза) между клетками, обработанными поликомплексом миРНК, и клетками с неспецифическим контролем siL2. Полученные данные представлены на рис. 6.

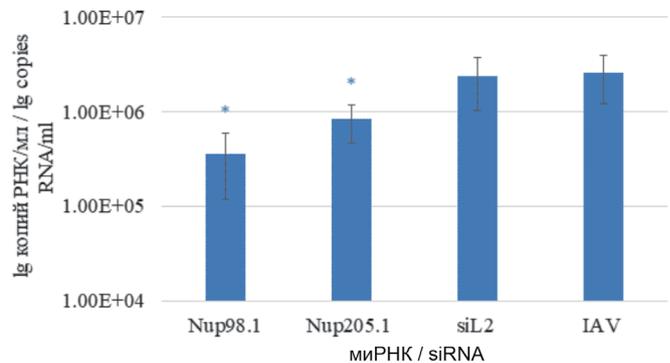


Рис. 4. Влияние подавления генов *Nup98* и *Nup205* посредством миРНК на изменение вРНК на третьи сутки с момента трансфекции при LD₅₀.

По оси абсцисс – названия миРНК. По оси ординат представлено количество вРНК. **p* ≤ 0,05.

Fig. 4. Effect of siRNA suppression of *Nup98* and *Nup205* genes on concentration of viral RNA on the third day after infection with LD₅₀.

The X-axis shows the names of siRNAs. The Y-axis shows the concentration of viral RNA. **p* ≤ 0.05.

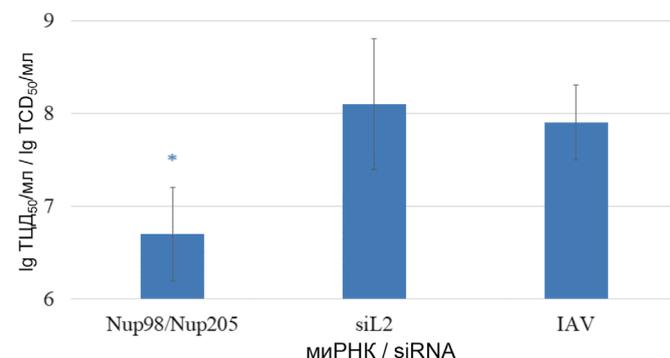


Рис. 5. Влияние пула миРНК Nup98.1/Nup205.1 на репродукцию вируса гриппа A/California/7/09 (H₁N₁) на третьи сутки с момента трансфекции при LD₅₀.

По оси абсцисс – названия миРНК. По оси ординат представлен показатель вирусного титра. **p* ≤ 0,05.

Fig. 5. Effect of the Nup98.1/Nup205.1 siRNA pool on the reproduction of influenza A/California/7/09 (H₁N₁) virus on the third day after infection with LD₅₀.

The X-axis shows the names of the siRNAs. The Y-axis shows the viral titers. **p* ≤ 0.05.

Обсуждение

Данное исследование является частью цикла работ по оценке противовирусной активности миРНК, направленных к клеточным генам, продукты экспрессии которых принимают непосредственное участие в процессе вирусной репродукции. Была проведена серия экспериментов по оценке эффективности подавления экспрессии как одного гена, так и одновременно нескольких клеточных генов с использованием комплексов миРНК, направленных к генам *Nup98* и *Nup205*. В ходе экспериментов были получены данные о том, что как одиночное, так и групповое применение миРНК приводит к достоверному снижению вирусной репродукции. Наиболее эффективный противовирусный эффект наблюдался при использовании миРНК

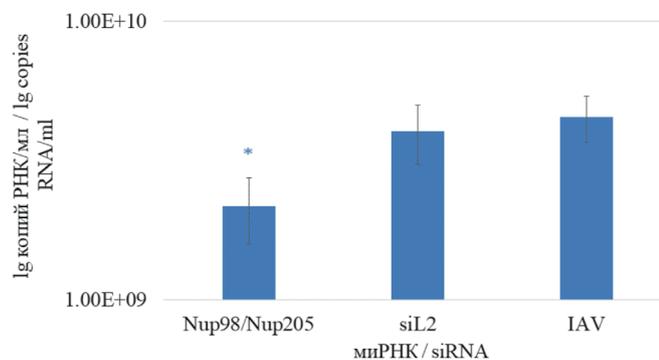


Рис. 6. Влияние подавления генов *Nup98* и *Nup205* посредством миРНК на изменение вРНК на третьи сутки с момента трансфекции при LD₅₀.

По оси абсцисс – названия миРНК. По оси ординат представлено количество вРНК. * $p < 0,05$.

Fig. 6. Effect of siRNA suppression of *Nup98* and *Nup205* genes on concentration of viral RNA on the third day after challenge with LD₅₀.

The X-axis shows the names of siRNAs. The Y-axis shows the concentration of viral RNA. * $p < 0.05$.

Nup98 (подобраны к области 8-го экзона одноимённого гена (позиция экзона – 28 811...28 974)) и *Nup205* (подобраны к области 17-го экзона одноимённого гена (позиция экзона – 30 466...30 565)), направленных к кодирующим областям мРНК. Подбор миРНК к областям экзона обусловлен тем, что после сплайсинга экзоны соединяются между собой, образуя зрелую мРНК (промежуточный продукт экспрессии гена). Далее миРНК подвергает мРНК деградации, в результате чего на стадии трансляции не происходит синтеза белка. Для оценки эффективности комплексов миРНК использовалось два методических подхода: титрование вируса по цитопатическому действию и ОТ-ПЦР-РВ, которые согласовывались между собой. Полученные данные коррелировали друг с другом: при снижении вирусного титра наблюдалось и снижение вРНК.

Параллельно с этим была проведена оценка изменения массы тела заражённых мышей после интраназального введения им миРНК. Было получено, что достоверное нарастание мышинной массы отмечается на третьи сутки после заражения при использовании миРНК *Nup205.1*. При введении мышам поликомплекса миРНК *Nup98.1/Nup205.1* не было достоверной разницы изменения массы тела по сравнению контрольными группами, однако отмечалось достоверное снижение вирусного титра на 1,4 lg ТЦД₅₀/мл. Несмотря на столь небольшое снижение вирусного титра, имеется ряд исследований, в которых показано, что такое снижение вирусной активности повышает выживаемость при заражении животных летальными дозами вируса гриппа [31, 32]. Выраженный противовирусный эффект мог быть также индуцирован и активацией неспецифических факторов врождённого иммунитета, таких как интерфероны или другие провоспалительные эффекторы. Одной из причин активации данного звена иммунитета может быть то, что

при попадании в организм, помимо противовирусного эффекта, миРНК оказывает ещё и иммуномодулирующий эффект, связываясь с Toll-подобными рецепторами 3-го типа, в результате чего происходит активация ряда провоспалительных цитокинов [33, 34].

Важность полученных результатов опосредуется ещё и тем, что мышам миРНК вводились всего один раз за 4 ч до заражения и отсутствовал носитель для осуществления трансфекции. Дополнительно для заражения использовались те дозы вируса, которые, вероятно, выше тех, с которыми человек может встретиться в повседневной жизни.

Заключение

На сегодняшний день особо актуальным является вопрос разработки и создания средств экстренной и эффективной профилактики и терапии респираторных вирусных инфекций. В настоящем исследовании получены данные о том, что применение миРНК, одиночно или комплексно направленных к клеточным генам на модели *in vivo*, способно достоверно приводить к снижению вирусной репродукции, а также к повышению выживаемости лабораторных животных. Дополнительно в данном исследовании получены результаты, показывающие, что блокировка вирусной репродукции на стадии ядерного импорта и экспорта приводит к наиболее эффективному снижению вирусной репродукции. Полученные результаты, показывающие высокую противовирусную эффективность миРНК на модели *in vivo*, а также данные наших прошлых исследований [1–3] позволяют рекомендовать миРНК в качестве основного действующего компонента перспективного прототипа препарата для клинических испытаний. При этом важно понимать, что при дальнейшей оптимизации молекул миРНК, условия трансфекции и подавлении активности клеточных генов, а также использовании в более высоких концентрациях миРНК могут оказаться ещё более мощным ингибитором развития не только гриппозной, но и любой другой респираторной вирусной инфекции. В глобальном масштабе результаты проведённого исследования способствуют разработке принципов быстрого конструирования и наработке специфических и эффективных противовирусных миРНК. Это позволит экстренно реагировать на развитие эпидемий и пандемий, индуцируемых вирусами, относящимися к разным таксономическим группам, а также эффективно противостоять им.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO. World Health Day 2023. Health For All. Available at: <https://www.euro.who.int/ru/media-centre/events/events/2021/10/flu-awareness-campaign-2021>
2. Britannica. 1968 flu pandemic. Global outbreak. Available at: <https://www.britannica.com/event/1968-flu-pandemic>
3. Trilla A., Trilla G., Daer C. The 1918 “Spanish flu” in Spain. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 47(5): 668–73. <https://doi.org/10.1086/590567>
4. Onishchenko G.G., Sizikova T.E., Lebedev V.N., Borisevich S.V. Analysis of promising approaches to COVID-19 vaccine development. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2020; 20(4): 216–27. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-216-227>

5. Glover R.E., Urquhart R., Lukawska J., Blumenthal K.G. Vaccinating against covid-19 in people who report allergies. *BMJ*. 2021; 372: n120. <https://doi.org/10.1136/bmj.n120>.
6. Smith M. Vaccine safety: medical contraindications, myths, and risk communication. *Pediatr. Rev.* 2015; 36(6): 227–38. <https://doi.org/10.1542/pir.36-6-227>
7. Wang J., Wu Y., Ma C., Fiorin G., Wang J., Pinto L.H., et al. Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion channel of influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013; 110(4): 1315–20. <https://doi.org/http://doi.org/10.1073/pnas.1216526110>
8. Hurt A.C., Ernest J., Deng Y.M., Iannello P., Besselaar T.G., Birch C., et al. The emergence and spread of resistant influenza A (H1N1) viruses in Oceania, Southeast Asia and South Asia. *Antiviral. Res.* 2009; (1): 90–3. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.03.003>
9. Leneva I.A., Russell R.J., Boriskin Y.S., Hay A.J. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: Implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. *Antiviral. Res.* 2009; 81(2): 132–40. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.10.009>
10. Han J., Perez J., Schafer A., Cheng H., Peet N., Rong L., et al. Influenza virus: small molecule therapeutics and mechanisms of antiviral resistance. *Curr. Med. Chem.* 2018; 25(38): 5115–27. <https://doi.org/http://doi.org/10.2174/0929867324666170920165926>
11. McManus M.T., Sharp P.A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* 2002; 3(10): 737–47. <https://doi.org/10.1038/nrg908>
12. Fire A.Z. Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell Death Differ.* 2007; 14(12): 1998–2012. <https://doi.org/10.1038/sj.sdd.4402253>
13. van der Ree M.H., van der Meer A.J., van Nuenen A.C., de Bruijne J., Ottosen S., Janssen H.L., et al. Miravirsens dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2016; 43(1): 102–13. <https://doi.org/10.1111/apt.13432>
14. Soriano V., Barreiro P., Benitez L., Peña J.M., de Mendoza C. New antivirals for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2017; 26(7): 843–51. <https://doi.org/101080/13543784.2017.1333105>
15. Qureshi A., Tantray V.G., Kirmani A.R., Ahangar A.G. A review on current status of antiviral siRNA. *Rev. Med. Virology.* 2018; 28(4): 1976. <https://doi.org/10.1002/rmv.1976>
16. Estrin M.A., Hussein I.T.M., Puryear W.B., Kuan A.C., Artim S.C., Runstadler J.A. Host-directed combinatorial RNAi improves inhibition of diverse strains of influenza A virus in human respiratory epithelial cells. *PLoS One.* 2018; 13(5): e0197246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197246>
17. Rupp J.C., Locatelli M., Grieser A., Ramos A., Campbell P.J., Yi H., et al. Host cell copper transporters CTR1 and ATP7A are important for Influenza A virus replication. *Virology.* 2017; 14(1): 11. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0671-7>
18. Adams D. Patisiran, an investigational RNAi therapeutic for patients with hereditary transthyretin-mediated (hATTR) amyloidosis: Results from the phase 3 APOLLO study. *Revue Neurologique.* 2018; 174(S1): S37. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2018.01.085>
19. Zhao L. Therapeutic strategies for acute intermittent porphyria. *Intractable Rare Dis. Res.* 2020; 9(4): 205–16. <https://doi.org/10.5582/irdr.2020.03089>
20. Pashkov E., Korchevaya E., Faizuloev E., Rtishchev A., Cherepovich B., Bystritskaya E., et al. Knockdown of FLT4, Nup98, and Nup205 cellular genes effectively suppresses the reproduction of influenza virus strain A/WSN/1933 (H1N1) in vitro. *Infect. Disord. Drug Targets.* 2022; 22(5): 100–8. <https://doi.org/10.2174/1871526522666220325121403>
21. Пашков Е.А., Корчевая Е.Р., Файзулов Е.Б., Пашков Е.П., Зайцева Т.А., Ртищев А.А. и др. Создание модели изучения противовирусного действия малых интерферирующих РНК in vitro. *Санитарный врач.* 2022; (1): 65–74. <https://doi.org/10.33920/med-08-2201-07> EDN: <https://elibrary.ru/paaeqt>
22. Pashkov E.A., Korotyshcheva M.O., Pak A.V., Faizuloev E.B., Sidorov A.V., Poddubikov A.V., et al. Investigation of the anti-influenza activity of siRNA complexes against the cellular genes FLT4, Nup98, and Nup205 in vitro. *Fine Chem. Technol.* 2022; 17(2): 140–51. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-2-140-151>
23. Tompkins S.M., Lo C.Y., Tumpey T.M., Epstein S.L. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(23): 8682–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402630101>
24. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
25. Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* 2016; 5(2): 85–6. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>
26. Czuppon P., Pfaffelhuber P. Limits of noise for autoregulated gene expression. *J. Math. Biol.* 2018; 77(4): 1153–91. <https://doi.org/10.1007/s00285-018-1248-4>
27. Eierhoff T., Hrinicus E.R., Rescher U., Ludwig S., Ehrhardt C. The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells. *PLoS Pathog.* 2010; 6(9): e1001099. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001099>
28. Shaw M.L., Stertz S. Role of host genes in influenza virus replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2018; 419: 151–89. https://doi.org/10.1007/82_2017_30
29. Watanabe T., Watanabe S., Kawaoka Y. Cellular networks involved in the influenza virus life cycle. *Cell Host Microbe.* 2010; 7(6): 427–39. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.008>
30. TTP. How To Perform The Delta-Delta Ct Method. Available at: <https://toptipbio.com/delta-delta-ct-pcr/>
31. Epstein S.L., Tumpey T.M., Mispilon J.A., Lo C.Y., Cooper L.A., Subbarao K., et al. DNA vaccine expressing conserved influenza virus proteins protective against H5N1 challenge infection in mice. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8(8): 796–801. <http://doi.org/10.3201/eid0805.010476>
32. Liang S., Mozdzanowska K., Palladino G., Gerhard W. Heterosubtypic immunity to influenza type A virus in mice. Effector mechanisms and their longevity. *J. Immunol.* 1994; 152(4): 1653–61.
33. Pak A.V., Pashkov E.A., Abramova N.D., Poddubikov A.V., Nagieva F.G., Bogdanova E.A., et al. Effect of antiviral siRNAs on the production of cytokines in vitro. *Fine Chem. Technol.* 2022; 17(5): 384–93. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-5-384-393>
34. Пашков Е.А., Пак А.В., Абрамова Н.Д., Яковлева И.В., Варганова Н.О., Богданова Е.А. и др. Изучение экспрессии гена IL-1β под действием комплексов мРНК, обладающих противогриппозным действием. *Российский иммунологический журнал.* 2022; 25(4): 485–90. <https://doi.org/10.46235/1028-7221-1202-SEO> EDN: <https://www.elibrary.ru/bbqdhc>

REFERENCES

1. WHO. World Health Day 2023. Health For All. Available at: <https://www.euro.who.int/ru/media-centre/events/events/2021/10/flu-awareness-campaign-2021>
2. Britannica. 1968 flu pandemic. Global outbreak. Available at: <https://www.britannica.com/event/1968-flu-pandemic>
3. Trilla A., Trilla G., Daer C. The 1918 “Spanish flu” in Spain. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 47(5): 668–73. <https://doi.org/10.1086/590567>
4. Onishchenko G.G., Sizikova T.E., Lebedev V.N., Borisevich S.V. Analysis of promising approaches to COVID-19 vaccine development. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2020; 20(4): 216–27. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-4-216-227>
5. Glover R.E., Urquhart R., Lukawska J., Blumenthal K.G. Vaccinating against covid-19 in people who report allergies. *BMJ*. 2021; 372: n120. <https://doi.org/10.1136/bmj.n120>.
6. Smith M. Vaccine safety: medical contraindications, myths, and risk communication. *Pediatr. Rev.* 2015; 36(6): 227–38. <https://doi.org/10.1542/pir.36-6-227>
7. Wang J., Wu Y., Ma C., Fiorin G., Wang J., Pinto L.H., et al. Structure and inhibition of the drug-resistant S31N mutant of the M2 ion channel of influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(4): 1315–20. <https://doi.org/http://doi.org/10.1073/pnas.1216526110>
8. Hurt A.C., Ernest J., Deng Y.M., Iannello P., Besselaar T.G., Birch C., et al. The emergence and spread of resistant influenza A (H1N1) viruses in Oceania, Southeast Asia and South Asia. *Antiviral. Res.* 2009; (1): 90–3. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.03.003>
9. Leneva I.A., Russell R.J., Boriskin Y.S., Hay A.J. Characteristics of arbidol-resistant mutants of influenza virus: Implications for the mechanism of anti-influenza action of arbidol. *Antiviral. Res.* 2009; 81(2): 132–40. <https://doi.org/http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2008.10.009>

10. Han J., Perez J., Schafer A., Cheng H., Peet N., Rong L., et al. Influenza virus: small molecule therapeutics and mechanisms of antiviral resistance. *Curr. Med. Chem.* 2018; 25(38): 5115–27. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170920165926>
11. McManus M.T., Sharp P.A. Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* 2002; 3(10): 737–47. <https://doi.org/10.1038/nrg908>
12. Fire A.Z. Gene silencing by double-stranded RNA. *Cell Death Differ.* 2007; 14(12): 1998–2012. <https://doi.org/http://doi.org/10.1038/sj.sdd.4402253>
13. van der Ree M.H., van der Meer A.J., van Nuenen A.C., de Bruijne J., Ottosen S., Janssen H.L., et al. Miravirsin dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2016; 43(1): 102–13. <https://doi.org/http://doi.org/10.1111/apt.13432>
14. Soriano V., Barreiro P., Benitez L., Peña J.M., de Mendoza C. New antivirals for the treatment of chronic hepatitis B. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2017; 26(7): 843–51. <https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1333105>
15. Qureshi A., Tantray V.G., Kirmani A.R., Ahangar A.G. A review on current status of antiviral siRNA. *Rev. Med. Virology.* 2018; 28(4): 1976. <https://doi.org/10.1002/rmv.1976>
16. Estrin M.A., Hussein I.T.M., Puryear W.B., Kuan A.C., Artim S.C., Runstadler J.A. Host-directed combinatorial RNAi improves inhibition of diverse strains of influenza A virus in human respiratory epithelial cells. *PLoS One.* 2018; 13(5): e0197246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197246>
17. Rupp J.C., Locatelli M., Grieser A., Ramos A., Campbell P.J., Yi H., et al. Host cell copper transporters CTR1 and ATP7A are important for Influenza A virus replication. *Virology.* 2017; 14(1): 11. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0671-7>
18. Adams D. Patisiran, an investigational RNAi therapeutic for patients with hereditary transthyretin-mediated (hATTR) amyloidosis: Results from the phase 3 APOLLO study. *Revue Neurologique.* 2018; 174(S1): S37. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2018.01.085>
19. Zhao L. Therapeutic strategies for acute intermittent porphyria. *Intractable Rare Dis. Res.* 2020; 9(4): 205–16. <https://doi.org/10.5582/irdr.2020.03089>
20. Pashkov E., Korchevaya E., Faizuloev E., Rtishchev A., Cherepovich B., Bystritskaya E., et al. Knockdown of FLT4, Nup98, and Nup205 cellular genes effectively suppresses the reproduction of influenza virus strain A/WSN/1933 (H1N1) in vitro. *Infect. Disord. Drug Targets.* 2022; 22(5): 100–8. <https://doi.org/10.2174/1871526522666220325121403>
21. Pashkov E.A., Korchevaya E.R., Faizuloev E.B., Pashkov E.P., Zaiceva T.A., Rtishchev A.A., et al. Creation of a model for studying the antiviral effect of small interfering RNAs in vitro. *Sanitary Doctor.* 2022; (1): 65–74. <https://doi.org/10.33920/med-08-2201-07> EDN: <https://elibrary.ru/paaeqt> (in Russian)
22. Pashkov E.A., Korotysheva M.O., Pak A.V., Faizuloev E.B., Sidorov A.V., Poddubikov A.V., et al. Investigation of the anti-influenza activity of siRNA complexes against the cellular genes FLT4, Nup98, and Nup205 in vitro. *Fine Chem. Technol.* 2022; 17(2): 140–51. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-2-140-151>
23. Tompkins S.M., Lo C.Y., Tumpey T.M., Epstein S.L. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(23): 8682–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402630101>
24. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25(4): 402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
25. Ramakrishnan M.A. Determination of 50% endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* 2016; 5(2): 85–6. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>
26. Czuppon P., Pfaffelhuber P. Limits of noise for autoregulated gene expression. *J. Math. Biol.* 2018; 77(4): 1153–91. <https://doi.org/10.1007/s00285-018-1248-4>
27. Eierhoff T., Hrincius E.R., Rescher U., Ludwig S., Ehrhardt C. The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells. *PLoS Pathog.* 2010; 6(9): e1001099. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001099>
28. Shaw M.L., Stertz S. Role of host genes in influenza virus replication. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2018; 419: 151–89. https://doi.org/10.1007/82_2017_30
29. Watanabe T., Watanabe S., Kawaoka Y. Cellular networks involved in the influenza virus life cycle. *Cell Host Microbe.* 2010; 7(6): 427–39. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.008>
30. TTP. How To Perform The Delta-Delta Ct Method. Available at: <https://toptipbio.com/delta-delta-ct-pcr/>
31. Epstein S.L., Tumpey T.M., Misplon J.A., Lo C.Y., Cooper L.A., Subbarao K., et al. DNA vaccine expressing conserved influenza virus proteins protective against H5N1 challenge infection in mice. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8(8): 796–801. <https://doi.org/10.3201/eid0805.010476>
32. Liang S., Mozdzanowska K., Palladino G., Gerhard W. Heterosubtypic immunity to influenza type A virus in mice. Effector mechanisms and their longevity. *J. Immunol.* 1994; 152(4): 1653–61.
33. Pak A.V., Pashkov E.A., Abramova N.D., Poddubikov A.V., Nagieva F.G., Bogdanova E.A., et al. Effect of antiviral siRNAs on the production of cytokines in vitro. *Fine Chem. Technol.* 2022; 17(5): 384–93. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2022-17-5-384-393>
34. Pashkov E.A., Pak A.V., Abramova N.D., Yakovleva I.V., Vartanova N.O., Bogdanova E.A., et al. Studying expression of IL-1 β gene under the action of siRNA complexes with anti-influenza effect. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal.* 2022; 25(4): 485–90. <http://doi.org/10.46235/1028-7221-1202-SEO> EDN: <https://www.elibrary.ru/bbqdh> (in Russian)

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-160>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023



Оценка динамики выявления жизнеспособного SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Betacoronavirus: Sarbecovirus*) в биологических образцах, полученных от пациентов с COVID-19 в условиях стационара, как одного из показателей инфекционности вируса

Кузнецова Н.А.^{1, #}, Огаркова Д.А.^{1, #}, Гушин В.А.^{1, #}, Антипят Н.А.², Бакалин В.В.³, Бургасова О.А.³, Васильченко Л.А.¹, Дивисенко Е.В.¹, Колобухина Л.В.¹, Кружкова И.С.¹, Никифорова М.А.¹, Одноралов М.А.², Самков А.А.², Симакова Я.В.¹, Синявин А.Э.¹, Ткачук А.П.¹, Шидловская Е.В.¹, Тюрин И.Н.², Злобин В.И.¹, Гинцбург А.Л.¹

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

²ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы», 125367, г. Москва, Россия;

³ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, г. Москва, Россия

Введение. Изучение механизмов передачи вируса SARS-CoV-2 является основой для выстраивания стратегии противоэпидемических мероприятий в условиях пандемии COVID-19. Понимание того, в какой временной перспективе больной может распространять SARS-CoV-2, так же важно, как и знание самих механизмов передачи вируса. Эта информация необходима для разработки эффективных мер профилактики инфицирования путём разрыва цепочек передачи вируса.

Цель работы – выявление инфекционного вируса SARS-CoV-2 в образцах пациентов в динамике заболевания и определение продолжительности выделения вируса пациентами с различной тяжестью течения COVID-19.

Материалы и методы. У пациентов, включённых в исследование, проводили сбор биоматериала (назофарингеальный мазок) для дальнейшего анализа методом количественной ОТ-ПЦР и вирусологического определения инфекционности для мазка.

Результаты. Нами определены сроки сохранения инфекционности вируса у пациентов, госпитализированных с тяжёлым и среднетяжёлым течением COVID-19. По результатам исследования проведён анализ зависимости между количеством детектируемой РНК SARS-CoV-2 с помощью ОТ-ПЦР и инфекционностью вируса в культуре клеток *in vitro* у больных COVID-19. Медианное время выделения пациентами инфекционного вируса составило 8 дней. Кроме того, проведён сравнительный анализ разных протоколов выявления РНК вируса относительно обнаружения инфекционного вируса.

Заключение. Полученные данные позволяют оценить динамику выявления и вирусную нагрузку SARS-CoV-2 у больных COVID-19, а также значение установленных параметров для последующего распространения вируса и организации профилактических мероприятий.

Ключевые слова: SARS-CoV-2; инфекционность; инфекционный вирус; ЦПЭ; ОТ-ПЦР; тяжесть течения COVID-19; ROC-анализ

Для цитирования: Кузнецова Н.А., Огаркова Д.А., Гушин В.А., Антипят Н.А., Бакалин В.В., Бургасова О.А., Васильченко Л.А., Дивисенко Е.В., Колобухина Л.В., Кружкова И.С., Никифорова М.А., Одноралов М.А., Самков А.А., Симакова Я.В., Синявин А.Э., Ткачук А.П., Шидловская Е.В., Тюрин И.Н., Злобин В.И., Гинцбург А.Л. Оценка динамики выявления жизнеспособного SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Betacoronavirus: Sarbecovirus*) в биологических образцах, полученных от пациентов с COVID-19 в условиях стационара, как одного из показателей инфекционности вируса. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(2): 105-116. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-160> EDN: <https://elibrary.ru/bhkjkr>

Для корреспонденции: Гушин Владимир Алексеевич, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия. E-mail: wowaniada@yandex.ru

[#]Авторы статьи, внесшие равный вклад в подготовку публикации.

Участие авторов: Кузнецова Н.А. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, написание статьи; Огаркова Д.А. – анализ и интерпретация данных, подготовка рисунков, написание статьи; Гушин В.А. – руководство исследованием, концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, написание статьи; Антипят Н.А. – сбор материалов исследований и клинических данных; Бакалин В.В. – сбор материалов исследований и клинических данных; Бургасова О.А. – концепция и дизайн исследования, сбор материалов исследований и клинических данных, анализ и интерпретация данных; Васильченко Л.А. – проведение экспериментов; Дивисенко Е.В. – проведение экспериментов; Колобухина Л.В. – концепция и дизайн исследования, сбор материалов исследований и клинических данных, анализ и интерпретация данных; Кружкова И.С. – сбор материалов исследований и клинических данных; Никифорова М.А. – проведение экспериментов; Одрноралов М.А. – сбор материалов исследований и клинических данных; Самков А.А. – сбор материалов исследований и клинических данных, анализ и интерпретация данных; Симакова Я.В. – анализ и интерпретация данных; Синявин А.Э. – проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, корректировка текста публикации; Ткачук А.П. – обеспечение исследования; Шидловская Е.В. – проведение экспериментов; Тюрин И.Н. – сбор материалов исследований и клинических данных, анализ и интерпретация данных; Злобин В.И. – анализ и интерпретация данных, корректировка текста публикации; Гинцбург А.Л. – утверждение концепции исследования и принятие финального решения о публикации.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета (№ АААА-А20-120113090054-6, №122100500017-9).

Благодарности. Авторы выражают благодарность сотрудникам ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России А. Захаровой и Т. Ремизову за организацию поставки реагентов для исследования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы» (протоколы заседаний № 11а от 16.11.2020 и № 1 от 11.02.2021).

Поступила 25.01.2023

Принята в печать 13.03.2023

Опубликована 30.04.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-160>

Evaluation of the dynamics of detection of viable SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Betacoronavirus: Sarbecovirus*) in biological samples obtained from patients with COVID-19 in a health care setting, as one of the indicators of the infectivity of the virus

Nadezhda A. Kuznetsova^{1, #}, Darya A. Ogarkova^{1, #}, Vladimir A. Gushchin^{1, #}, Natalya A. Antipyat², Valeria V. Bacalin³, Olga A. Burgasova³, Lyudmila A. Vasilchenko¹, Elizaveta V. Divisenko¹, Liudmila V. Kolobukhina¹, Irina S. Kruzhkova¹, Maria A. Nikiforova¹, Mikhail A. Odrnoralov², Alexey A. Samkov², Yana V. Simakova¹, Andrei E. Siniavin¹, Artem P. Tkachuk¹, Elena V. Shidlovskaya¹, Igor N. Tyurin², Vladimir I. Zlobin¹, Alexander L. Gintsburg¹

¹National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia;

²Infectious Clinical Hospital No. 1 of the Department of Health of the Moscow, 125367, Moscow, Russia;

³Peoples' Friendship University of Russia, 117198, Moscow, Russia

Introduction. The study of the mechanisms of transmission of the SARS-CoV-2 virus is the basis for building a strategy for anti-epidemic measures in the context of the COVID-19 pandemic. Understanding in what time frame a patient can spread SARS-CoV-2 is just as important as knowing the transmission mechanisms themselves. This information is necessary to develop effective measures to prevent infection by breaking the chains of transmission of the virus.

The aim of the work – is to identify the infectious SARS-CoV-2 virus in patient samples in the course of the disease and to determine the duration of virus shedding in patients with varying severity of COVID-19.

Materials and methods. In patients included in the study, biomaterial (nasopharyngeal swabs) was subjected to analysis by quantitative RT-PCR and virological determination of infectivity of the virus.

Results. We have determined the timeframe of maintaining the infectivity of the virus in patients hospitalized with severe and moderate COVID-19. Based on the results of the study, we made an analysis of the relationship between the amount of detected SARS-CoV-2 RNA and the infectivity of the virus *in vitro* in patients with COVID-19. The median time of the infectious virus shedding was 8 days. In addition, a comparative analysis of different protocols

[#]These authors contributed equally to this work.

for the detection of the viral RNA in relation to the identification of the infectious virus was carried out.

Conclusion. The obtained data make it possible to assess the dynamics of SARS-CoV-2 detection and viral load in patients with COVID-19 and indicate the significance of these parameters for the subsequent spread of the virus and the organization of preventive measures.

Keywords: SARS-CoV-2; infectivity; RT-PCR; severity of COVID-19; ROC analysis

For citation: Kuznetsova N.A., Ogarkova D.A., Gushchin V.A., Antipyat N.A., Bacalin V.V., Burgasova O.A., Vasilchenko L.A., Divisenko E.V., Kolobukhina L.V., Kruzhkova I.S., Nikiforova M.A., Odnoralov M.A., Samkov A.A., Simakova Ya.V., Siniavin A.E., Tkachuk A.P., Shidlovskaya E.V., Tyurin I.N., Zlobin V.I., Gintsburg A.L. Evaluation of the dynamics of detection of viable SARS-CoV-2 (Coronaviridae: *Betacoronavirus: Sarbecovirus*) in biological samples obtained from patients with COVID-19 in a health care setting, as one of the indicators of the infectivity of the virus. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(2): 105-116. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-160> EDN: <https://elibrary.ru/bhjkjkp>

For correspondence: Vladimir A. Gushchin, PhD (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Population Variability of Pathogenic Microorganisms, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia. E-mail: wowaniada@yandex.ru

Information about the authors:

Kuznetsova N.A., <https://orcid.org/0000-0002-7399-7628>
Ogarkova D.A., <https://orcid.org/0000-0002-1152-4120>
Gushchin V.A., <https://orcid.org/0000-0002-9397-3762>
Antipyat N.A., <https://orcid.org/0000-0001-8578-2838>
Bacalin V.V., <https://orcid.org/0000-0002-0491-9925>
Burgasova O.A., <https://orcid.org/0000-0002-5486-0837>
Vasilchenko L.A., <https://orcid.org/0000-0003-0780-7782>
Divisenko E.V. <https://orcid.org/0009-0000-5470-4917>
Kolobukhina L.V., <https://orcid.org/0000-0001-5775-3343>
Kruzhkova I.S., <https://orcid.org/0000-0002-1983-481X>
Nikiforova M.A., <https://orcid.org/0000-0001-5823-6508>
Odnoralov M.A., <https://orcid.org/0000-0003-0525-6075>
Samkov A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0365-3096>
Simakova Ya.V., <https://orcid.org/0000-0002-5033-6931>
Siniavin A.E., <https://orcid.org/0000-0001-7576-2059>
Tkachuk A.P., <https://orcid.org/0000-0003-3262-4873>
Shidlovskaya E.V., <https://orcid.org/0000-0001-8199-6417>
Tyurin I.N., <https://orcid.org/0000-0002-5696-1586>
Zlobin V.I., <https://orcid.org/0000-0002-0164-5113>
Gintsburg A.L., <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

Contribution: Kuznetsova N.A. – the concept and design of the study, conducting of the experiments, collecting, analyzing and interpreting data, writing an article; Ogarkova D.A. – analysis and interpretation of data, preparation of pictures, writing an article; Gushchin V.A. – study management, study concept and design, data analysis and interpretation, article writing; Antipyat N.A. – collection of research materials and clinical data; Bacalin V.V. – collection of research materials and clinical data; Burgasova O.A. – study concept and design, collection of study materials and clinical data, data analysis and interpretation; Vasilchenko L.A. – conducting of the experiments; Divisenko E.V. – conducting of the experiments; Kolobukhina L.V. – study concept and design, collection of study materials and clinical data, data analysis and interpretation; Kruzhkova I.S. – collection of research materials and clinical data; Nikiforova M.A. – conducting of the experiments; Odnoralov M.A. – collection of research materials and clinical data; Samkov A.A. – collection of research materials and clinical data, analysis and interpretation of data; Simakova Ya.V. – data analysis and interpretation; Siniavin A.E. – conducting of the experiments, analyzing and interpreting data, correcting the text of the publication; Tkachuk A.P. – provision of research; Shidlovskaya E.V. – conducting of the experiments; Tyurin I.N. – collection of research materials and clinical data, analysis and interpretation of data; Zlobin V.I. – analysis and interpretation of data, correction of the text of the publication; Gintsburg A.L. – approval of the research concept and final approval of the article for publication.

Funding. The research was funded by the State budget (grant No. AAAA-A20-120113090054-6, grant No. 122100500017-9).

Acknowledgement. The authors are grateful to the employees of National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya A. Zakharova and T. Remizov for reagents supplying of research.

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

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The study approved by the Ethics Committee of the Infectious Clinical Hospital No. 1 of the Moscow (protocols No. 11 dated November 16, 2020 and No. 1 dated February 11, 2021).

Received 25 January 2023

Accepted 13 March 2023

Published 30 April 2023

Введение

Инфицирование вирусом SARS-CoV-2 вызывает заболевание COVID-19 [1], протекающее как в лёгкой, так и в крайне тяжёлой форме, требующей госпитализации в отделение реанимации и интенсивной терапии [2]. При этом обычно у большей части инфицированных SARS-CoV-2 течение заболевания лёгкое или даже бессимптомное [3]. Понимание механизмов и путей передачи вируса SARS-CoV-2 является чрезвычайно важным для эффективного противодействия пандемии COVID-19 [4]. Предполагается, что риск передачи от бессимптомных больных довольно высокий, достигающий 62% случаев заражений, что может приводить к существенному объёму недиагностированных случаев инфицирования [5]. Вероятно, высока роль больных COVID-19, находящихся в продромальном периоде (за 2–3 дня до клинических проявлений болезни) и являющихся активными источниками инфекции, о чём пишет и ряд зарубежных авторов [6].

Основным механизмом передачи возбудителя COVID-19 от человека к человеку является аэрозольный, реализуемый посредством воздушно-капельного пути [4]. Передача вируса происходит при тесном контакте больного со здоровым. Возбудитель распространяется с мелкими каплями изо рта или носа инфицированного человека при кашле, чихании, разговоре или затруднённом дыхании [7]. Заражение происходит при вдыхании вирусосодержащих частиц или их попадании на слизистые глаз, носа или рта. Возможны и другие механизмы и пути передачи, включая аэрозольный (фомитный), фекально-оральный, гемоконтактный, вертикальный (от матери к ребёнку) и трансмиссивный (от животного к человеку) [8]. Важными факторами, определяющими передачу вируса от одного человека другому, являются количество выделяемого в окружающую среду вируса и продолжительность его выделения. Именно эти факторы оказывают непосредственное влияние на эффективность мер по ограничению распространения заболевания.

На сегодняшний день признанным стандартом диагностики COVID-19 является полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР), позволяющая обнаруживать РНК вируса в различных биологических образцах [9, 10]. Самая высокая вирусная нагрузка, измеренная методом ОТ-ПЦР, наблюдается с момента появления первых симптомов и до 7-го дня болезни, что объясняет более эффективное распространение SARS-CoV-2 по сравнению с другими респираторными инфекциями [11]. По данным различных метаанализов, средняя продолжительность выявления РНК SARS-CoV-2 составляет от 9,3 до 20,0 дня в дыхательных путях и от 14,4 до 20,1 дня в стуле. В случаях длительной протекающей инфекции продолжительность выявления РНК может составлять более 100 дней [11, 12].

Длительность выделения инфекционного вируса является важным фактором передачи возбудителя при инфекции SARS-CoV-2, определяющим стратегию профилактических мероприятий, в том числе изоляции пациентов, с учётом сроков его заразности для

окружающих. На сегодняшний день опубликовано около 30 работ, в которых авторы определяли продолжительность выделения пациентами инфекционного вируса. В одном из последних исследований анализ связи уровня порогового цикла (Ct) с инфекционностью вируса позволил установить диапазон значений Ct от 26,25 до 34,00 (95% доверительный интервал (ДИ)) с медианой 30,5 и средним значением 30,82 для образцов с вирусом [11, 13]. При этом недостаточно изучена связь носительства вируса с тяжестью течения COVID-19, определяемой по критериям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [14]. Не исследован вопрос информативности ПЦР-тестов, нацеленных на различные участки генома вируса SARS-CoV-2 (с учётом различий в копийности геномных фрагментов РНК) в контексте выявления носителей инфекционного вируса.

В связи с этим **целью** настоящего исследования явилось изучение динамики выявления инфекционного SARS-CoV-2 у пациентов с тяжёлым и среднетяжёлым течением COVID-19 с характеристикой информативности вариантов ПЦР-систем, в том числе для оценки риска внутрибольничной передачи возбудителя.

Материалы и методы

Дизайн исследования и отбор пациентов. Набор пациентов с верифицированным диагнозом COVID-19 и сбор биологического материала в динамике заболевания проводили на базе Инфекционной клинической больницы № 1 г. Москвы с 17.11.2020 по 03.02.2021. Проведение исследования было одобрено этическим комитетом ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы» (протоколы заседаний № 11а от 16.11.2020 и № 1 от 11.02.2021). Добровольцы подписывали информированное согласие на забор биологического материала, кроме того, проводился сбор анкетных данных.

В исследование были включены 1072 пациента с диагнозом COVID-19, госпитализированных в стационар в разные сроки от появления первых симптомов заболевания. Критерием включения пациента в исследование являлось наличие положительного результата ПЦР при поступлении в стационар. Результаты ПЦР, на основании которых пациенты были включены в исследование, были получены с использованием различных систем и разными организациями в зависимости от того, куда направлялся мазок пациента перед госпитализацией или непосредственно после неё. Пациентам проводили первичный клинический осмотр, наблюдение в динамике заболевания, давали оценку клиническим, лабораторным показателям, результатам инструментального обследования и в последующем определяли в группы наблюдения согласно критериям тяжести ВОЗ [14]. У пациентов проводили сбор биоматериала для дальнейшего анализа методом количественной ОТ-ПЦР и вирусологическое исследование назофарингеального мазка с использованием пермиссивных для репликации SARS-CoV-2 клеток. В течение всего госпитального

периода биоматериал пациентов получали со следующей периодичностью: мазок из носоглотки исследовали каждые 3 ± 2 дня, венозную кровь отбирали один раз в 5–7 дней в динамике заболевания. Диагностический алгоритм обязательно включал анализ эпидемиологических, клинико-лабораторных и инструментальных данных. В окончательный анализ были включены 584 пациента, у которых количественная ПЦР показала положительный результат для первой точки забора материала и были проведены основные исследования: дана оценка тяжести течения болезни, определена вирусная нагрузка в первый день госпитализации.

Оценка вирусной нагрузки SARS-CoV-2. Исследование образцов носоглоточных мазков проводили с использованием набора реагентов для экстракции и качественного определения РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР «SARS-CoV-2 FRT» производства ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи») согласно инструкции производителя. Относительное количество РНК SARS-CoV-2 определяли с помощью калибровочной прямой. Для её построения при каждой постановке анализа тестировали калибровочные стандарты, которые представляли собой рекомбинантные конструкции, содержащие амплифицируемый фрагмент генома SARS-CoV-2 с известной концентрацией. В связи с тем что сравнение количества фрагментов было относительным, РНК-фрагменты не использовались. Стадия обратной транскрипции контролировалась прохождением ПЦР по внутреннему РНК-контролю, предусмотренному системой.

Определение инфекционного SARS-CoV-2 in vitro. Определение инфекционного вируса SARS-CoV-2 проводили с использованием клеточной линии 293T/ACE2 (со стабильной экспрессией ACE2 (ангиотензинпревращающий фермент 2) рецептора человека) [15]. Клетки культивировали в среде DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium) («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональную бычью сыворотку (HyClone, США), $1 \times$ L-глутамин и $1 \times$ раствор антибиотиков пенициллина/стрептомицина (Gibco, США). Эксперименты выполняли в 96-луночном планшете. Для этого образцы назофарингеальных мазков (в объёме 100 мкл) от больных COVID-19 вносили в планшеты и делали последовательные десятикратные разведения. Планшеты инкубировали в течение 5 дней. Затем производили оценку вирус-индуцированного цитопатического эффекта (ЦПЭ). Также для образцов, где наблюдался ЦПЭ, проводили дополнительное подтверждение методом ОТ-ПЦР.

Тестирование ПЦР-систем, различающихся по детектируемым участкам генома SARS-CoV-2, для оценки возможности выявления установленных по ЦПЭ носителей инфекционного вируса. С целью оценки эффективности различных локусов генома вируса SARS-CoV-2 для выявления в ПЦР выявленных по ЦПЭ носителей инфекционного вируса

провели сравнение локусов ORF1b-nsp14, N-gene, Envelope protein, RdRP и NSP1 (в составе набора реагентов для экстракции и качественного определения РНК коронавируса SARS-CoV-2 методом ОТ-ПЦР «SARS-CoV-2 FRT» производства ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи») генома вируса. Использованные олигонуклеотиды и ссылки на источники литературы представлены в **табл. III**. Для проведения ОТ-ПЦР использовали реакционную смесь, содержащую (на одну реакцию) 5 пмоль каждого праймера, 3 пмоль зонда («Люмипроб», Россия), $2 \times$ буфер для ОТ-ПЦР-РВ и БиоМастер-микс (БиоМастер ОТ-ПЦР-РВ ($2 \times$), «Биолабмикс», Россия). Общий объём одной реакционной смеси составлял 25 мкл. Амплификацию проводили на приборе CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Условия одностадийной RT-qPCR описаны ранее для праймеров, рекомендованных ВОЗ [16] и ЦКЗ (Центр по контролю и профилактике заболеваний США, CDC) [17].

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8, а также посредством среды статистического анализа R (версия 4.0.3) и программного обеспечения RStudio (версия 1.3.1093), IBM SPSS Statistics 26.0. При анализе количественных показателей использовали тест Шапиро–Уилка для сравнения распределений с нормальным. Для большинства групп распределения значимо ($p > 0,05$) отличались от нормального, поэтому для описания центральных тенденций использовались медиана и межквартильный размах. Для определения статистической значимости различий между исследуемыми группами производили расчёт, используя критерий знаковых рангов Уилкоксона (W) для зависимых выборок и критерий Краскелла–Уоллиса или Манна–Уитни для независимых выборок (пояснения в тексте). Различия считали значимыми при $p < 0,05$. Для описания связи количественных признаков использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. При сравнении качественных показателей использовали критерий χ^2 или точный критерий Фишера (пояснения в тексте).

Результаты

Характеристика исследуемой когорты. Исследование проводили на материалах, полученных от пациентов, госпитализированных с COVID-19. Анализировали данные пациентов, у которых был положительный ПЦР-тест на наличие РНК SARS-CoV-2. Характеристики пациентов, включённых в исследование, представлены в **табл. I**. Минимальный срок от начала появления первых клинических симптомов болезни до госпитализации составил 1 день, т.е. госпитализация произошла в день появления симптомов (со слов пациента). Всего известна продолжительность госпитализации для 378 пациентов (64,7%).

Возрастное распределение пациентов имело выработанную полимодальность, включающую два характерных пика в районе 60–65 и 80–85 лет. Подавляющее большинство пациентов было в возрасте

Таблица 1. Характеристика исследуемой когорты пациентов

Table 1. Characteristics of the patient cohort

Исследуемый показатель Characteristics	Min	Max	Me	IQR
День госпитализации от первых симптомов Day of hospitalization from first symptoms	1	76	7	5–8
Срок госпитализации, дней ($n = 378$ (64,7%)) Length of stay, days ($n = 378$ (64,7%))	1	52	9	7–13
Возраст, лет Age, years	18	97	67	58,0–78,5
Мужчины / женщины, n (%) Male / female, n (%)		243 (41,6) / 341 (58,4)		
Тяжесть, n (%) лёгкая / среднетяжёлая / тяжёлая Disease severity, n (%) mild / moderate / severe		3 (0,5) / 347 (59,4) / 234 (40,1)		
Летальный исход ($n = 415$), n (%) Fatal outcome ($n = 415$), n (%)		28 (6,7)		

Примечание. Min – минимальное значение; max – максимальное значение; Me – медиана; IQR – межквартильный размах.

Note. Min – minimum value; max – maximum value; Me – median; IQR – interquartile range.

от 51 до 90 лет (879 (84,1%) пациентов). Доля лиц в возрасте до 30 лет и после 91 года была минимальной и составила по 1,2% ($n = 7$ для обоих возрастных когорт). Доля пациентов 31–40 лет составила 4,8% ($n = 28$), 41–50 лет – 8,7% ($n = 51$), 51–60 лет – 15,8% ($n = 92$), 61–70 лет – 26,7% ($n = 156$), 71–80 лет – 23,3% ($n = 136$), 81–90 лет – 18,3% ($n = 107$), 91 год и старше – 1,2% ($n = 7$).

Характеристика пациентов в зависимости от тяжести течения COVID-19. Оценку тяжести течения заболевания COVID-19 проводили в соответствии с критериями ВОЗ [14] (табл. П2), учитывалась тяжесть при поступлении в больницу. В связи с тем что госпитализированных пациентов с лёгким течением заболевания было всего трое, мы не проводили сравнение с этой группой. Пациенты с положительным результатом ПЦР-анализа, поступившие в тяжёлом состоянии, были статистически значимо старше пациентов, поступивших в среднетяжёлом состоянии ($p < 0,001$).

В группах по тяжести течения заболевания выборки пациентов не отличались по полу ($p = 1,000$). При сравнении времени, прошедшего от начала симптомов заболевания до госпитализации, и продолжительности госпитализации пациентов статистически значимых различий не наблюдали ($p = 0,775$ и $p = 0,142$). Доля летальных исходов составила 3,8% в группе среднетяжёлого течения и 11,0% – в группе тяжёлого течения ($p = 0,021$).

Первый мазок был взят в среднем на 8-е сутки от начала заболевания в каждой из групп тяжести (табл. П2). Медианные значения St в группе тяжелобольных составили 31,75 и в группе среднетяжелых больных – 31,50. Погрешности измерения вирусной нагрузки в ГЭ/мл не позволили выявить статистически значимых различий. Инфекционная активность вируса к моменту первого взятия анализа статистически

значимо не различалась в группах со среднетяжёлым и тяжёлым течением ($p = 0,948$). В группах среднетяжёлых и тяжёлых ПЦР-положительных пациентов вирус был изолирован у 16,4 и 17,1% соответственно.

Медиана второй точки забора материала для лабораторных анализов составила 11 дней от начала симптомов (табл. П2). К 11-му дню было известно 550 из 584 исходно ПЦР-положительных (94,2% от общего числа пациентов), 307 (55,8%) из которых оказались ПЦР-положительными ($p = 0,537$). Статистически значимых различий в уровне вирусной нагрузки у среднетяжёлых и тяжёлых пациентов не выявлено (медианное значение St составило 32,02 (29,01–34,28) и 32,42 (29,96–34,48), $p = 0,316$ (критерий Манна–Уитни). Во втором заборе из 307 постановок изоляции вируса 27 (8,8%) оказались положительными. Статистически значимых различия между группами не выявлены ($p = 0,228$).

Медиана третьей точки исследований составила 13–14 дней от начала симптомов ($p = 0,057$) (табл. П2). По исследуемым показателям (вирусная нагрузка и инфекционность вируса) все группы оказались гомогенными ($p > 0,05$). Результаты ПЦР на третьей точке доступны для 226 человек, при этом 130 (57,5%) из них – ПЦР-положительные. Статистически значимых различий между группами не обнаружено ($p = 0,441$).

Характеристика взаимосвязи между показателями вирусной нагрузки и выявленным по ЦПЭ инфекционным вирусом. Нами была исследована взаимосвязь между выявлением инфекционного вируса и вирусной нагрузкой. В табл. П3 и П4 приведены сравнительные характеристики пациентов в зависимости от успешности выделения вируса. Статистически достоверной разницы между пациентами, выделяющими инфекционный вирус и имеющими только положительный ПЦР-тест, по полу, возрасту и тяжести протекания заболевания обнаружено не было.

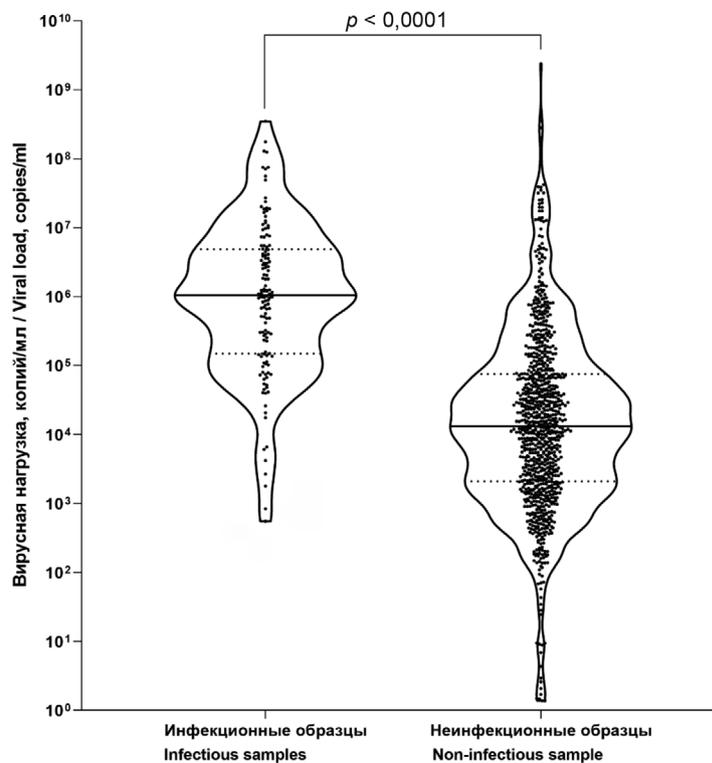


Рис. 1. Вирусная нагрузка в образцах с инфекционным и неинфекционным вирусом. $p < 0,0001$ при расчёте с использованием критерия знаковых рангов Уилкоксона (W); $p < 0,001^*$ при расчёте с использованием критерия Манна–Уитни.

Fig. 1. Viral load in samples with infectious and non-infectious virus. $p < 0.0001$ when calculated using the Wilcoxon signed rank test (W); $p < 0.001^*$ when calculated using the Mann–Whitney test.

Медианное количество дней от начала симптомов до взятия анализа в группе с инфекционным вирусом статистически отличается от такового в группе, в которой вирус не изолировался, и составило 7 и 8 дней соответственно ($p < 0,001^*$). Различия вирусной нагрузки также оказались статистически значимы ($p < 0,001^*$) для показателя Ct и вирусной нагрузки, измеренной в ГЭ/мл. Медиана Ct в группе пациентов, у которых не выделился вирус, составила 32,25, или $1,71 \times 10^4$ ГЭ/мл, а в группе с инфекционным вирусом – 26,14, или $1,09 \times 10^6$ ГЭ/мл (**рис. 1**).

Выявление инфекционного вируса у пациентов в динамике. Для анализа выявления вируса в динамике был взят результат с наибольшей вирусной нагрузкой (из трёх), при котором был получен одновременно положительный результат ПЦР и проведено исследование проб на наличие ЦПЭ. На первой неделе от начала симптомов (0–7 дней) был выявлен инфекционный вирус в образцах, полученных от 29 (22,8%) пациентов, на второй неделе (8–14 дней) – от 37 (10,0%), на третьей и далее (более 14 дней) – только от 4 (4,6%). Были обнаружены статистически значимые отличия при сравнении доли образцов с инфекционным вирусом на 0–7-е сутки от начала симптомов с таковой на 8–14-е сутки и с долей образцов на 14-е сутки и позднее от начала симптомов. При этом статистически значимых различий доли образцов, содержащих инфекционный вирус на второй неделе, по сравнению

с более далеким сроком не было выявлено ($p = 0,113$). Результаты представлены в **табл. 2** и на **рис. 2**.

Различия в долях образцов, содержащих инфекционный вирус, статистически значимы. Апостериорные сравнения проводили с внесением поправки на множественность Бенджамини–Хохберга. $p_{1vs2} < 0,001$ – достоверность различий между первой и второй неделей после появления симптомов, $p_{1vs3} < 0,001$ – достоверность различий между первой неделей и позже 14 дней после появления симптомов, $p_{2vs3} = 0,113$ – достоверность различий между второй неделей и позже 14 дней после появления симптомов; Me – медиана, IQR – межквартильный размах.

Учитывая, что не для всех пациентов известно, в какое время после появления симптомов произошла элиминация вируса, был проведён анализ результатов заражения клеток 293T/ACE2 материалами от больных в динамике. Доля образцов, содержащих инфекционный вирус, с учётом цензурированных данных (наблюдение вплоть до фиксации отсутствия инфекционного вируса) представлена в **табл. 3**.

Проведённый с помощью метода Каплана–Майера анализ показал, что медиана срока сохранения инфекционного вируса в мазках составила 8 дней (95% ДИ 7,77–8,24). Это означает, что у 50% пациентов к 8-му дню можно ожидать элиминацию инфекционного вируса даже при условии наличия положительного результата ПЦР. Кривая элиминации инфекци-

Таблица 2. Доля образцов инфекционного вируса в зависимости от времени после начала симптомов

Table 2. Percentage of samples with infectious virus by time after onset of symptoms

Время от проявления симптомов, сутки Time from onset of symptoms, days	Среднее время от начала симптомов, сутки, Ме (IQR) Mean time from symptom onset, days, Me (IQR)	<i>n</i>	Образцы, содержащие инфекционный вирус, <i>n</i> (%) Samples containing infectious virus, <i>n</i> (%)
0–7	6 (4–7)	127	29 (22,8)
8–14	10 (9–12)	370	37 (10,0)
Более 14 More than 14	16 (15–19)	87	4 (4,6)

Таблица 3. Сохранение инфекционности вируса с учётом цензурирования данных

Table 3. The duration of the infectivity of the virus, censored data

Срок наблюдения от начала симптомов, дней Time from onset of symptoms, days	Сохраняемость инфекционного вируса у ПЦР-положительных пациентов с COVID-19, % Persistence of infectious virus in PCR-positive patients with COVID-19, %
7	71,00
14	11,60
21	2,27

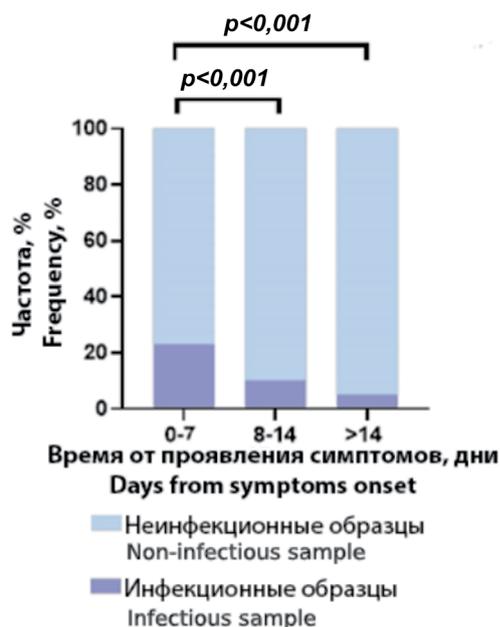


Рис. 2. Доля инфекционного вируса в зависимости от времени после начала развития симптомов.

Fig. 2. The percent of infectious virus depending on the time after the onset of symptoms.

онного вируса показана на рис. 3. Согласно критерию Мантеля–Кокса, не обнаружено статистически значимых различий в скорости снижения выявления инфекционного вируса в зависимости от тяжести течения COVID-19 ($p = 0,529$).

Оценка эффективности протоколов ПЦР для выявления пациентов, в биопробах которых содержится инфекционный вирус. Нами была проведена оценка эффективности различных протоколов выявления РНК вируса SARS-CoV-2 с целью определения

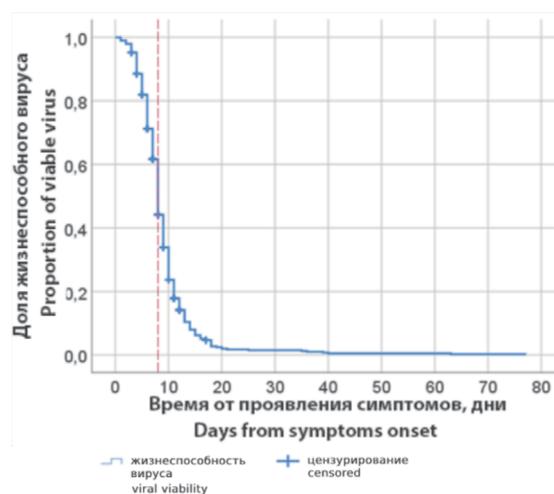


Рис. 3. Анализ сохранения инфекционного вируса в носоглоточном секрете пациентов в зависимости от времени проявления симптомов.

Красной вертикальной линией показано медианное время сохранения вируса (8 дней).

Fig. 3. Analysis of the persistence of an infectious virus in the nasopharyngeal swabs of patients depending on the time of onset of symptoms.

The vertical line shows the median virus persistence time (8 days).

способности тестов к обнаружению носителей инфекционного вируса. Для этого нами были использованы протоколы, ранее предложенные ВОЗ, ЦКЗ, а также разработанный нами тест, согласно инструкции. Комбинации праймеров и зондов приведены в табл. П1. В целом из 571 образца инфекционный вирус был обнаружен в 68, что составляет 11,9% образцов, использованных для сравнительного анализа. По результатам анализа длительности выявления положительных результатов ПЦР сформировалась груп-

Таблица 4. Результаты попарного сравнения длительности выявления РНК вируса с использованием различных протоколов ПЦР ($p < 0,05$ считали статистически достоверным)

Table 4. Results of pairwise comparison of the duration of viral RNA detection using various PCR protocols ($p < 0.05$ was considered statistically significant)

Статистика Уилкоксона (Гехана) Gehan–Wilcoxon test	HKU-ORF1b	HKU-N	E_Sarbeco	N_Sarbeco	RdRp	NSP1
Viral viability	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*
HKU-ORF1b	–	0,649	< 0,001*	0,008*	< 0,001*	0,201
HKU-N		–	< 0,001*	0,002*	0,001*	0,479
E_Sarbeco			–	0,103	< 0,001*	< 0,001*
N_Sarbeco				–	< 0,001*	< 0,001*
RdRp					–	0,005*
NSP1						–

Примечание. * $p < 0,001$ при расчёте с использованием критерия Манна–Уитни.

Note. * $p < 0.001$ when calculated using the Mann–Whitney test.

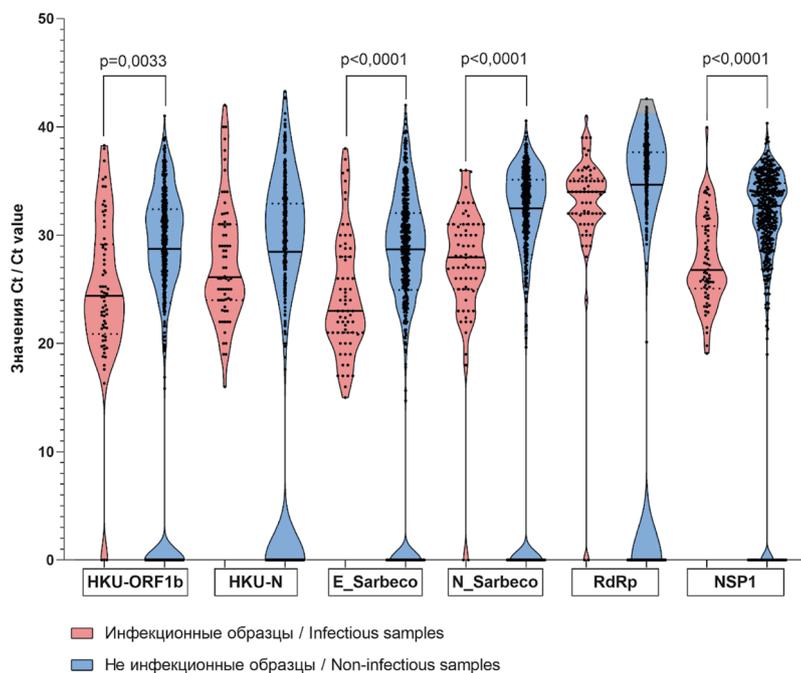


Рис. 4. Сравнение показателя Ct, полученного с использованием разных протоколов идентификации вирусной РНК, для образцов с инфекционным вирусом и отсутствием инфекционного вируса.

Fig. 4. Comparison of the Ct values for different protocols of the viral RNA identification in samples with an infectious and non-infectious virus.

па тестов, статистически неразличимых между собой: HKU-ORF1b, HKU-N и NSP1 ($p < 0,05$ при попарных сравнениях) (табл. 4). Медианное время положительного результата для этих тестов составило 11 дней. Система RdRp показывала отрицательный результат в более ранний срок, медиана составила 9 дней. Системы E_Sarbeco и N_Sarbeco демонстрировали положительные результаты, наиболее длительное время – медианное время – составило 13 и 12 дней соответственно. Основные статистические характеристики тестов, полученные с помощью анализа выживаемости Каплана–Майера, приведены в табл. П5. При этом любой из исследуемых анализов оказывался положительным больше, чем определялась инфекционность вируса ($p < 0,001$ при сравнении длительности положительного результата любой системы с длительностью определения инфекционного вируса).

Сравнение Ct-образцов с инфекционным вирусом и его отсутствием, определенных с использованием упомянутых выше протоколов, показало достоверную разницу для следующих мишеней: HKU-ORF1b ($p = 0,0033$), E_Sarbeco ($p < 0,0001$), N_Sarbeco ($p < 0,0001$), и NSP1 ($p < 0,0001$). Для мишеней HKU-N и RdRp статистически значимой разницы Ct для образцов с инфекционным вирусом и без него выявлено не было. Значение p рассчитано с помощью критерия Манна–Уитни (рис. 4, табл. П6).

ROC-анализ был проведён для показателя Ct для различных тест-систем. Для показателя Ct (nsp1) под кривой AUC составила 0,772 (95% ДИ 0,718–0,826), $p < 0,001$. Точка cut off выбиралась на уровне пересечения специфичности и чувствительности (рис. П1). При признании вируса инфекционным в образцах с Ct выше 29,51 чувствительность составила 73,00%

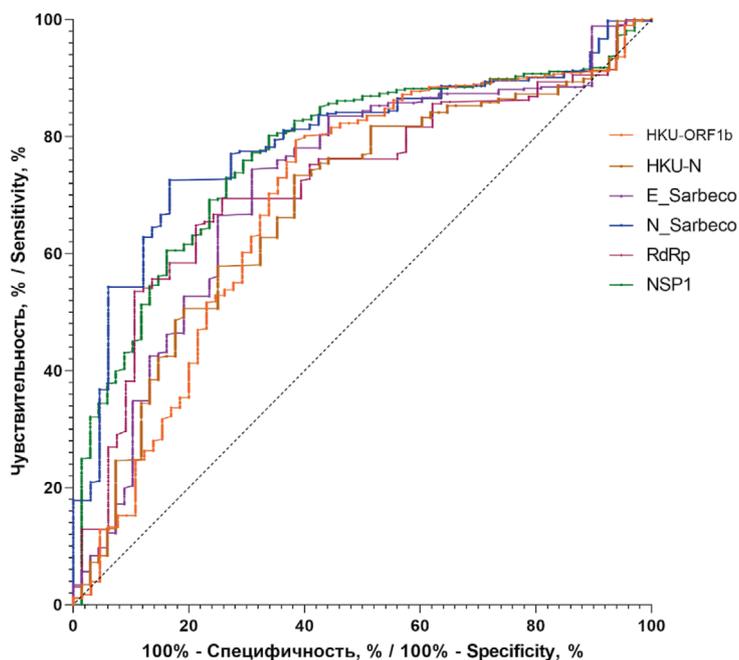


Рис. 5. Кривые ROC-анализа для разных протоколов выявления РНК относительно выявления инфекционного вируса.

Fig. 5. ROC-analysis curves for different RNA detection protocols relative to identification of the infectious virus.

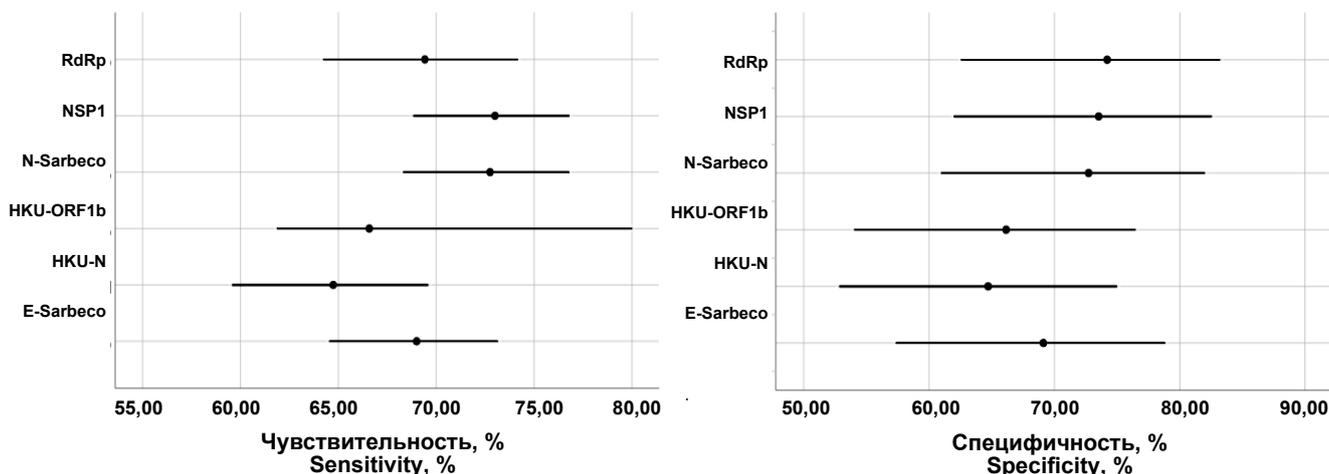


Рис. 6. Сравнение специфичности и чувствительности различных протоколов выявления РНК относительно выявления инфекционного вируса.

Fig. 6. Comparison of the specificity and sensitivity of different RNA detection protocols in relation to the identification of an infectious virus.

(68,83–76,80%), а специфичность – 73,53% (61,99–82,55%). Для сравнения тест-системы с другими были проведены ROC-анализы для каждой из тест-систем, основные характеристики приведены в табл. 4 и на рис. 5. Различия между получившимися кривыми статистически незначимы, так как доверительные интервалы AUC перекрываются во всех случаях: AUC составило 0,682–0,789. Различия между специфичностью и чувствительностью при оптимальном выборе точки cut off (табл. П7) также статистически незначимы (рис. 6), однако системы NSP1 и N-Sarbeco, по-видимому, обладают более высокими показателями точности. Специфичность для всех исследуемых тест-систем составляла 64,71–74,21%, а чувствительность – 64,74–73,00%.

Обсуждение

В условиях стационара риск передачи пациентам и персоналу возбудителей инфекций повышен по причинам скученности, нахождения в закрытых помещениях и т.п. и не исключает присоединения госпитальных инфекций. Известно, что для SARS-CoV-2 внутрибольничное распространение является характерным признаком [18, 19]. В ходе пандемии COVID-19, когда больничные ресурсы используются на пределе возможностей, понимание, как долго больные COVID-19 являются источниками инфекции, является чрезвычайно важным. От этого могут зависеть сроки пребывания пациентов в стационаре, а также масштаб противоэпидемических мероприятий как в лечебном учреждении, так и в амбулаторных условиях.

В нашем исследовании представлены данные о частоте и сроках выявления инфекционного SARS-CoV-2 в когорте пациентов, госпитализированных с тяжёлым и среднетяжёлым течением COVID-19. Полученные данные показывают, что 97% образцов, полученных от пациентов, не содержат инфекционного вируса после 15-го дня с момента появления симптомов, при этом медиана обнаружения инфекционного вируса составила 8 дней. Эти результаты коррелируют с рекомендациями ЦКЗ по изоляции таких пациентов до 10 дней и до 20 в тяжёлых случаях, требующих интенсивной терапии или искусственной вентиляции лёгких [20].

По результатам нашего исследования у пациентов со среднетяжёлым и тяжёлым течением COVID-19 выявление инфекционного вируса в мазках составило 9,8 и 6,8% от всех ПЦР-положительных мазков соответственно. У пациентов с тяжёлым и среднетяжёлым течением заболевания удалось выделить вирус в культуре из образцов, полученных в первую неделю заболевания в 22,8%, во вторую и третью неделю – в 10 и 4,6% случаев заболевания соответственно. У некоторых пациентов с тяжёлым течением инфекционный вирус сохранялся вплоть до 46-го дня. Было показано, что вирусная нагрузка в назофарингеальных мазках, измеренная ОТ-ПЦР, и инфекционность вируса взаимосвязаны. Ранее аналогичный результат, но на существенно меньшей выборке, был получен нами в контексте использования антигенных тестов для выявления носителей инфекционного вируса [21]. Показано, что в мазках с инфекционным вирусом количество РНК вируса SARS-CoV-2 достоверно выше, хотя вирус и выделяется из мазков в широком диапазоне вирусной нагрузки. При стратификации пациентов в зависимости от обнаружения инфекционного вируса без учёта тяжести течения COVID-19 мы отмечали статистически достоверную разницу по уровню вирусной нагрузки в образцах с инфекционным и неинфекционным вирусом Ct 32,25 (29,68–34,74) и 26,14 (23,81–28,86), или $1,71 \times 10^4$ ($2,97 \times 10^3$ – $9,76 \times 10^4$) и $1,09 \times 10^6$ ($2,34 \times 10^5$ – $5,50 \times 10^6$) ГЭ/мл ($p < 0,001^*$, критерий Манна–Уитни). Полученные результаты демонстрируют наибольшую опасность пациентов с эпидемиологической точки зрения в первую неделю после появления симптомов. Эти данные коррелируют с рекомендациями ЦКЗ об использовании масок всеми членами семьи, включая инфицированных, состояние которых не требует госпитализации, в течение двух недель [20].

Мы провели сравнительную оценку эффективности протоколов выявления РНК вируса SARS-CoV-2, предложенных ВОЗ, ЦКЗ, и протокола, описанного нами ранее при обнаружении инфекционного вируса в полученных от пациентов образцах. По результатам анализа того, как долго образцы остаются положительными в ОТ-ПЦР, протоколы HKU-ORF1b, HKU-N и NSP1 статистически не отличались, медианное время положительного результата для этих тестов составило 11 дней. Для RdRp, E_Sarbeco и N_Sarbeco медиана составила 9, 13 и 12 дней соответственно.

Сравнение Ct-образцов с инфекционным вирусом и его отсутствием показало достоверную разницу для следующих мишеней: HKU-ORF1b ($p = 0,0033$), E_Sarbeco ($p < 0,0001$), N_Sarbeco ($p < 0,0001$), и NSP1 ($p < 0,0001$). Для мишеней HKU-N и RdRp статистически значимой разницы выявлено не было. По результатам ROC-анализа различия между получившимися кривыми статистически незначимы. Различия между специфичностью и чувствительностью разных тестов также статистически незначимы, однако системы NSP1 и N-Sarbeco, по-видимому, обладают более высокими показателями точности при выявлении пациентов с инфекционным вирусом на слизистых оболочках носоглотки.

Заключение

Проведённые нами исследования показывают отсутствие достоверной разницы в сроках обнаружения инфекционного вируса SARS-CoV-2 в носоглоточных мазках, полученных от пациентов со среднетяжёлым и тяжёлым течением COVID-19 в изучаемый период (ноябрь 2020 г. – март 2021 г.). В 97% по прошествии 15 дней с момента появления симптомов госпитализированные пациенты демонстрируют отсутствие инфекционного вируса даже при наличии положительного результата ПЦР-теста. Медиана обнаружения инфекционного вируса составила 8 дней с момента появления симптомов. Нами показана корреляция данных выявления инфекционного вируса и вирусной нагрузки. Для выявления носителей инфекционного вируса подходит любой из исследованных нами протоколов ПЦР-анализа.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. Available at: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)
2. Колобухина Л.В., Бурасова О.А., Краева Л.А., Гушин В.А., Бурцева Е.И., Кружкова И.С. и др. Клинико-лабораторный профиль пациентов с COVID-19, госпитализированных в инфекционный стационар г. Москвы в период с мая по июль 2020 года. *Инфекционные болезни*. 2021; 19(2): 5–15. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2021-2-5-15>
3. Killingley B., Mann A.J., Kalinova M., Boyers A., Goonawardane N., Zhou J., et al. Safety, tolerability and viral kinetics during SARS-CoV-2 human challenge in young adults. *Nat. Med.* 2022; 28(5): 1031–41. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01780-9>
4. Salahshoori I., Mobaraki-Asl N., Seyfaee A., Mirzaei Nasirabad N., Dehghan Z., Faraji M., et al. Overview of COVID-19 disease: virology, epidemiology, prevention diagnosis, treatment, and vaccines. *Biologics*. 2021; 1(1): 2–40. <https://doi.org/10.3390/biologics1010002>
5. Verity R., Okell L.C., Dorigatti I., Winskill P., Whittaker C., Imai N., et al. Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2020; 20(6): 669–77. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30243-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30243-7)
6. He X., Lau E.H.Y., Wu P., Deng X., Wang J., Hao X., et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat. Med.* 2020; 26(5): 672–5. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>
7. Meyerowitz E.A., Richterman A., Gandhi R.T., Sax P.E. Transmission of SARS-CoV-2: A review of viral, host, and environmental factors. *Ann. Intern. Med.* 2021; 174(1): 69–79. <https://doi.org/10.7326/m20-5008>
8. WHO. Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions. Available at: <https://www.who.int/news->

- room/commentaries/detail/transmission-of-sars-cov-2-implications-for-infection-prevention-precautions
9. Cheng M.P., Papenburg J., Desjardins M., Kanjilal S., Quach C., Libman M., et al. Diagnostic testing for severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2. *Ann. Intern. Med.* 2020; 172(11): 726–34. <https://doi.org/10.7326/m20-1301>
 10. Shen M., Zhou Y., Ye J., Abdullah Al-Maskri A.A., Kang Y., Zeng S., et al. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *J. Pharm. Anal.* 2020; 10(2): 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.02.010>
 11. Cevik M., Tate M., Lloyd O., Maraolo A.E., Schafers J., Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe.* 2021; 2(1): e13–22. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(20\)30172-5](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(20)30172-5)
 12. Zhang Y., Cen M., Hu M., Du L., Hu W., Kim J.J., et al. Prevalence and persistent shedding of fecal SARS-CoV-2 RNA in patients with COVID-19 infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 2021; 12(4): e00343. <https://doi.org/10.14309/ctg.0000000000000343>
 13. Fontana L.M., Villamagna A.H., Sikka M.K., McGregor J.C. Understanding viral shedding of severe acute respiratory coronavirus virus 2 (SARS-CoV-2): Review of current literature. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2021; 42(6): 659–68. <https://doi.org/10.1017/ice.2020.1273>
 14. WHO. Living guidance for clinical management of COVID-19. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-clinical-2021-2>
 15. Kruglova N., Siniavin A., Gushchin V., Mazurov D. Different neutralization sensitivity of SARS-CoV-2 cell-to-cell and cell-free modes of infection to convalescent sera. *Viruses.* 2021; 13(6): 1133. <https://doi.org/10.3390/v13061133>
 16. HKU Med. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases by RT-PCR. Available at: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/peiris-protocol-16-1-20.pdf?sfvrsn=af1aac73_4
 17. Corman V.M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D.K.W., et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020; 25(3): 2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.3.2000045>
 18. Read J.M., Green C.A., Harrison E.M., Docherty A.B., Funk S., Harrison J., et al. Hospital-acquired SARS-CoV-2 infection in the UK's first COVID-19 pandemic wave. *Lancet.* 2021; 398(10305): 1037–8. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)01786-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)01786-4)
 19. Richterman A., Meyerowitz E.A., Cevik M. Hospital-acquired SARS-CoV-2 infection: lessons for public health. *JAMA.* 2020; 324(21): 2155–6. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.21399>
 20. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Ending Isolation and Precautions for People with COVID-19: Interim Guidance; 2023 Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/duration-isolation.html>
 21. Shidlovskaya E.V., Kuznetsova N.A., Divisenko E.V., Nikiforova M.A., Siniavin A.E., Ogarkova D.A., et al. The value of rapid antigen tests for identifying carriers of viable SARS-CoV-2. *Viruses.* 2021; 13(10): 2012. <https://doi.org/10.3390/v13102012>
 5. Verity R., Okell L.C., Dorigatti I., Winskill P., Whittaker C., Imai N., et al. Estimates of the severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2020; 20(6): 669–77. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(20\)30243-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(20)30243-7)
 6. He X., Lau E.H.Y., Wu P., Deng X., Wang J., Hao X., et al. Temporal dynamics in viral shedding and transmissibility of COVID-19. *Nat. Med.* 2020; 26(5): 672–5. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0869-5>
 7. Meyerowitz E.A., Richterman A., Gandhi R.T., Sax P.E. Transmission of SARS-CoV-2: A review of viral, host, and environmental factors. *Ann. Intern. Med.* 2021; 174(1): 69–79. <https://doi.org/10.7326/m20-5008>
 8. WHO. Transmission of SARS-CoV-2: implications for infection prevention precautions. Available at: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/transmission-of-sars-cov-2-implications-for-infection-prevention-precautions>
 9. Cheng M.P., Papenburg J., Desjardins M., Kanjilal S., Quach C., Libman M., et al. Diagnostic testing for severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2. *Ann. Intern. Med.* 2020; 172(11): 726–34. <https://doi.org/10.7326/m20-1301>
 10. Shen M., Zhou Y., Ye J., Abdullah Al-Maskri A.A., Kang Y., Zeng S., et al. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *J. Pharm. Anal.* 2020; 10(2): 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.02.010>
 11. Cevik M., Tate M., Lloyd O., Maraolo A.E., Schafers J., Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe.* 2021; 2(1): e13–22. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(20\)30172-5](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(20)30172-5)
 12. Zhang Y., Cen M., Hu M., Du L., Hu W., Kim J.J., et al. Prevalence and persistent shedding of fecal SARS-CoV-2 RNA in patients with COVID-19 infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 2021; 12(4): e00343. <https://doi.org/10.14309/ctg.0000000000000343>
 13. Fontana L.M., Villamagna A.H., Sikka M.K., McGregor J.C. Understanding viral shedding of severe acute respiratory coronavirus virus 2 (SARS-CoV-2): Review of current literature. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 2021; 42(6): 659–68. <https://doi.org/10.1017/ice.2020.1273>
 14. WHO. Living guidance for clinical management of COVID-19. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-clinical-2021-2>
 15. Kruglova N., Siniavin A., Gushchin V., Mazurov D. Different neutralization sensitivity of SARS-CoV-2 cell-to-cell and cell-free modes of infection to convalescent sera. *Viruses.* 2021; 13(6): 1133. <https://doi.org/10.3390/v13061133>
 16. HKU Med. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) in suspected human cases by RT-PCR. Available at: https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/peiris-protocol-16-1-20.pdf?sfvrsn=af1aac73_4
 17. Corman V.M., Landt O., Kaiser M., Molenkamp R., Meijer A., Chu D.K.W., et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* 2020; 25(3): 2000045. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2020.25.3.2000045>
 18. Read J.M., Green C.A., Harrison E.M., Docherty A.B., Funk S., Harrison J., et al. Hospital-acquired SARS-CoV-2 infection in the UK's first COVID-19 pandemic wave. *Lancet.* 2021; 398(10305): 1037–8. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(21\)01786-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(21)01786-4)
 19. Richterman A., Meyerowitz E.A., Cevik M. Hospital-acquired SARS-CoV-2 infection: lessons for public health. *JAMA.* 2020; 324(21): 2155–6. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.21399>
 20. CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Ending Isolation and Precautions for People with COVID-19: Interim Guidance; 2023 Available at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/duration-isolation.html>
 21. Shidlovskaya E.V., Kuznetsova N.A., Divisenko E.V., Nikiforova M.A., Siniavin A.E., Ogarkova D.A., et al. The value of rapid antigen tests for identifying carriers of viable SARS-CoV-2. *Viruses.* 2021; 13(10): 2012. <https://doi.org/10.3390/v13102012>

REFERENCES

1. WHO. Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. Available at: [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)
2. Kolobukhina L.V., Burgasova O.A., Kraeva L.A., Gushchin V.A., Burtseva E.I., Kruzhkova I.S., et al. Clinical and laboratory profile of patients with COVID-19 admitted to hospital in Moscow between May and July 2020. *Infektsionnye bolezni.* 2021; 19(2): 5–15. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2021-2-5-15> (in Russian)
3. Killingley B., Mann A.J., Kalinova M., Boyers A., Goonawardane N., Zhou J., et al. Safety, tolerability and viral kinetics during SARS-CoV-2 human challenge in young adults. *Nat. Med.* 2022; 28(5): 1031–41. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01780-9>
4. Salahshoori L., Mobaraki-Asl N., Seyfaee A., Mirzaei Nasirabad N., Dehghan Z., Faraji M., et al. Overview of COVID-19 disease: virology, epidemiology, prevention diagnosis, treatment, and vaccines. *Biologics.* 2021; 1(1): 2–40. <https://doi.org/10.3390/biologics1010002>

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-162>

© AUTHORS, 2023



The prevalence of IGM antibodies to Zika virus in pregnant women in Northern Nigeria

Hafeez Aderinsayo Adekola¹, David Ajiboye Ojo², Saka Adebayo Balogun²,
Morenike Atinuke Dipeolu³, Musa Mohammed⁴, Daniel Stephen Adejo⁵,
Rabi'at Muhammad Aliyu⁶, Mohammed Asara Abdullahi⁷, Nana Hawwa Madugu⁶

¹Department of Microbiology, Olabisi Onabanjo University, Ago Iwoye, Ogun State, Nigeria;

²Department of Microbiology, Federal University of Agriculture, Abeokuta, Ogun State, Nigeria;

³Department of Veterinary Public Health and Reproduction, Federal University of Agriculture, Abeokuta, Ogun State, Nigeria;

⁴Department of Medicine, Ahmadu Bello University, Zaria, Kaduna State, Nigeria;

⁵Department of Obstetrics and Gynaecology, Ahmadu Bello University, Zaria, Kaduna State, Nigeria;

⁶Department of Obstetrics and Gynaecology, Ahmadu Bello University Teaching Hospital, Zaria, Kaduna State, Nigeria;

⁷Department of Internal Medicine, Ahmadu Bello University Teaching Hospital, Zaria, Kaduna State, Nigeria

Introduction. Zika virus (ZIKV) infection during pregnancy can result in severe outcomes for both the pregnant woman and the developing fetus.

The **objective** of this study was to investigate the prevalence of Zika virus infection among pregnant women who sought healthcare services at Ahmadu Bello University Teaching Hospital.

Materials and methods. Serum samples were collected and analyzed using Enzyme Linked Immunoassay and RT-qPCR methods, while a structured questionnaire was used to gather relevant information about the participants.

Results. The results showed that 53 out of the 180 pregnant women tested positive for Anti-Zika IgM antibodies, which represents a 29.4% prevalence rate. Subsequent RT-qPCR analysis found that only 6 out of the 53 positive samples contained Zika virus RNA. Fever and headache were the most commonly reported symptoms related to the infection.

Conclusion. These findings indicate a potential outbreak of Zika fever in Northern Nigeria emphasizing the importance for pregnant women to take precautions to avoid getting infected.

Keywords: *Zika virus infection; Nigeria; examination of pregnant women; MAC-ELISA; RT-qPCR; Anti-Zika IgM antibodies*

For citation: Adekola H.A., Ojo D.A., Balogun S.A., Dipeolu M.A., Mohammed M., Adejo D.S., Aliyu R.M., Abdullahi M.A., Madugu N.H. The prevalence of IgM antibodies to Zika virus in pregnant women in Northern Nigeria. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(2): 117-123. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-162> <https://elibrary.ru/bboxlh>

For correspondence: Hafeez Aderinsayo Adekola, Ph.D., Medical Microbiology and Public Health, University Lecturer, Lecturer II, Department of Microbiology, Olabisi Onabanjo University, Ago Iwoye, Ogun State, Nigeria. E-mail: haderinsayor@gmail.com

Information about the authors:

Adekola H.A., <https://orcid.org/0000-0003-3132-3315>

Ojo D.A., <https://orcid.org/0000-0001-5762-7689>

Balogun S.A., <https://orcid.org/0000-0002-0045-602X>

Dipeolu M.A., <https://orcid.org/0000-0002-8479-6135>

Mohammed M., <https://orcid.org/0000-0001-5240-2130>

Adejo D.S., <https://orcid.org/0000-0003-0246-0767>

Aliyu R.M., <https://orcid.org/0000-0001-5735-9709>

Abdullahi M.A., <https://orcid.org/0000-0003-3820-8264>

Madugu N.H., <https://orcid.org/0000-0002-8832-4215>

Contribution: Adekola H.A., Ojo D.A., Balogun S.A., Dipeolu M.A. – study conception and design; Adekola H.A., Mohammed M., Adejo D.S., Aliyu R.M., Abdullahi M.A. – data collection; Adekola H.A., Ojo D.A., Balogun S.A., Mohammed M., Madugu N.H. – analysis and interpretation of result; Adekola H.A., Ojo D.A., Balogun S.A., Dipeolu M.A. – draft manuscript preparation.

Funding. None.

Acknowledgement. None.

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

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by The Health Research Ethics Committee of Ahmadu Bello University Teaching Hospital (protocol No. ABUTHZ/HREC/W16/2022).

Received 04 February 2023

Accepted 05 April 2023

Published 30 April 2023

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-162>

Частота выявления IgM-антител к вирусу Зика у беременных женщин в Северной Нигерии

Hafeez Aderinsayo Adekola¹, David Ajiboye Ojo², Saka Adebayo Balogun²,
Morenike Atinuke Dipeolu³, Musa Mohammed⁴, Daniel Stephen Adejo⁵,
Rabi'at Muhammad Aliyu⁶, Mohammed Asara Abdullahi⁷, Nana Hawwa Madugu⁶

¹Кафедра микробиологии, Университет Олабиси Онабанджо, Аго Ивойе, штат Огун, Нигерия;

²Кафедра микробиологии, Федеральный сельскохозяйственный университет, Абеокута, штат Огун, Нигерия;

³Кафедра ветеринарного здравоохранения и репродукции, Федеральный сельскохозяйственный университет, Абеокута, штат Огун, Нигерия;

⁴Кафедра медицины, Университет Ахмаду Белло, Зариа, штат Кадуна, Нигерия;

⁵Кафедра акушерства и гинекологии, Университет Ахмаду Белло, Зариа, штат Кадуна, Нигерия;

⁶Кафедра акушерства и гинекологии, Учебная больница Университета Ахмаду Белло, Зариа, штат Кадуна, Нигерия;

⁷Кафедра внутренних болезней, Учебная больница Университета Ахмаду Белло, Зариа, штат Кадуна, Нигерия

Введение. Заражение вирусом Зика (ZIKV) во время беременности может приводить к тяжелым последствиям как для матери, так и для развивающегося плода.

Целью данного исследования являлось определение распространенности ZIKV-инфекции среди беременных женщин, обратившихся за медицинской помощью в Учебную больницу Университета Ахмаду Белло.

Материалы и методы. Собранные образцы сыворотки крови были протестированы методами иммуноферментного анализа и ОТ-ПЦР, для сбора соответствующей информации об участниках исследования использовалась структурированная анкета.

Результаты. Из 180 обследованных беременных женщин 53 были положительными по анти-ZIKV IgM, частота выявления составила 29,4%. Только 6 из 53 серопозитивных образцов были положительными по РНК ZIKV при последующем тестировании в ОТ-ПЦР. Лихорадка и головная боль были наиболее частыми симптомами, связанными с инфекцией.

Заключение. Полученные данные указывают на возможную вспышку лихорадки Зика в Северной Нигерии, что подчеркивает важность принятия беременными женщинами мер предосторожности во избежание заражения.

Ключевые слова: заражение вирусом Зика; Нигерия; обследование беременных; MAC-ELISA; RT-qPCR; анти-ZIKV IgM антитела

Для цитирования: Adekola H.A., Ojo D.A., Balogun S.A., Dipeolu M.A., Mohammed M., Adejo D.S., Aliyu R.M., Abdullahi M.A., Madugu N.H. Частота выявления IgM-антител к вирусу Зика у беременных женщин в Северной Нигерии. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(2): 117-123. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-162> EDN: <https://www.elibrary.ru/bbox1h>

Для корреспонденции: Hafeez Aderinsayo Adekola, Ph.D., Medical Microbiology and Public Health, University Lecturer, Lecturer II, Department of Microbiology, Olabisi Onabanjo University, Ago Iwoye, Ogun State, Nigeria. E-mail: haderinsayor@gmail.com

Участие авторов: Adekola H.A., Ojo D.A., Balogun S.A., Dipeolu M.A. – концепция и дизайн исследования; Adekola H.A., Mohammed M., Adejo D.S., Aliyu R.M., Abdullahi M.A. – сбор данных; Adekola H.A., Ojo D.A., Balogun S.A., Mohammed M., Madugu N.H. – анализ и интерпретация результатов; Adekola H.A., Ojo D.A., Balogun S.A., Dipeolu M.A. – подготовка рукописи.

Финансирование. Исследование выполнено за счет Государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии потенциальных конфликтов интересов

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Комитетом по этике медицинских исследований Учебной больницы Университета Ахмаду Белло (Протокол № ABUTHZ/HREC/W16/2022).

Поступила 04.02.2023

Принята в печать 05.04.2023

Опубликована 30.04.2023

Introduction

The incidence of Zika virus (ZIKV) infection in pregnant women is a growing global concern. Given the potential serious consequences of ZIKV infection during pregnancy for the developing fetus, measuring the prevalence of ZIKV antibodies among pregnant women is crucial. Nigeria, an African country, has a history of Zika

infection dating back to 1975 [1]. The country's dense population and large number of economically disadvantaged people are said to be a significant facilitator of ZIKV spread [2]. Furthermore, due to the country's high burden of other mosquito-borne illnesses, such as dengue, malaria and numerous others, the clinical diagnosis of ZIKV infection is difficult [3].

ZIKV infection in adults present as conjunctivitis, mild fever, headache, skin rash and diarrhoea [4]. However, in severe cases, arthralgia, Guillain–Barre syndrome and cardiovascular anomalies could occur [4]. ZIKV infection, if contracted during pregnancy, can lead to severe outcomes for both the mother and the unborn child [5]. ZIKV manifestations in neonates often result in congenital microcephaly, optic neuropathy and congenital glaucoma, ventriculomegaly and lissencephaly [6, 7]. ZIKV infection during pregnancy is associated with a range of serious birth defects [7]. The highest risk of these birth defects occurs when a woman contracts ZIKV during the first trimester of pregnancy [6]. However, it should be noted that even if the infection occurs in later stages of pregnancy, there is still a risk of birth defects. Pregnancy infections are a known cause of low birth weight, small-for-gestational-age neonates and premature delivery [7]. Preterm and small-for-gestational-age infants are at a greater risk of morbidity and death in infancy and early childhood, as well as chronic illness, such as cardiovascular disease, later in life [7]. The Center for Disease Control and Prevention recommends that pregnant women avoid traveling to areas where the virus is actively spreading. Those who visit such areas should take precautions to avoid being bitten by mosquitoes. Furthermore, pregnant women residing in, or having visited areas with active ZIKV transmission, should undergo testing the antibodies specific for the virus or virus RNA, even if asymptomatic [6]. ZIKV infection has been linked to decreased birth weight, small-for-gestational-age neonates, and preterm delivery in recent studies. In a case series of 87 newborns with microcephaly and congenital ZIKV infection in Brazil, it was reported that 29% of the newborns were small-for-gestational-age, although no small-gestational-age neonates were detected in a cohort of 54 mothers with confirmed prenatal ZIKV infection [8, 9]. Preterm birth rates ranged from 7–15% in cohorts of pregnant women infected with ZIKV from Brazil and the United States [8–11]. In 2016, the overall frequency in the United States was 9.9% [12].

It is worth noting that the full impact of ZIKV on pregnancy is still unknown, and more research is needed to fully understand the dangers and implications of ZIKV infection during pregnancy [13]. Nevertheless, it is clear that infection with ZIKV during pregnancy can have serious consequences, and expectant mothers must take the necessary precautions to avoid contact with the virus [5]. In order to safeguard fetal health, it is important to measure the prevalence of anti-ZIKV antibodies in pregnant women. Information on the ZIKV prevalence can help health authorities better understand the spread and impact, as well as implement effective prevention and control strategies.

This study aimed to investigate the presence of anti-ZIKV IgM antibodies in the serum of pregnant women attending the Ahmadu Bello University Teaching Hospital.

Materials and methods

Ethical Consideration

The Health Research Ethics Committee of Ahmadu Bello University Teaching Hospital granted ethical approval (ABUTHZ/HREC/W16/2022). All participants

provided informed consent in accordance with the Human Experimentation Standards and the Declaration of Helsinki of 1975, as revised in 2000. This was achieved by having all participants recruited for the study sign an informed consent form.

Study Design

This was a hospital-based cross-sectional study of pregnant women attending Ahmadu Bello University Teaching Hospital in Zaria, North-West Nigeria.

Sample Population and Size

The study involved pregnant women who visited the antenatal units of the hospital and provided their informed consent to participate. Recruitment of participants occurred during their routine hospital visits. The sample size was calculated using Fischer's formula for cross-sectional study design to be 59 but increased to 180, using the prevalence of 4% reported by Mathe et al. (2018) [14].

Data collection

Participants' sociodemographic information (sex, age, educational level, occupation, and residential area) and medical information (gravidae, gestational age, ZIKV infection-related symptoms, history of mosquito bites, and history of arboviral infection) were collected using structured questionnaires. To collect the data, face-to-face interviews were used.

Sample collection

Venous blood was drawn from study participants' antecubital veins by placing a tourniquet on the upper arm and tightening it enough to prevent venous return. The site of blood collection was sterilized with 70% alcohol and dried with sterile gauze. The vein was then punctured with a sterile needle attached to a syringe, and blood was obtained through gentle suction as the tourniquet was gradually removed. The needle was then removed, and 3 mL of blood was gently dispensed into a plain tube. After that, the tube was properly labelled with the participant's identification number. Sera were separated from blood samples by allowing the blood to clot at room temperature before centrifuging it at 2500 rpm for 10 minutes. It was then placed in cryovials and stored at -20°C until laboratory analysis.

Sample analysis

VIRCELL Microbiologists Zika ELISA IgM (catalogue number: M1023) was used to screen the separated serum samples for the presence of anti-ZIKV IgM antibodies. Before use, the reagents were brought to room temperature for an hour. The plates were then removed, and four control wells were determined for the two cut-off controls, positive and negative. The serum dilutions were homogeneously mixed with the controls and samples in the microplate wells, followed by incubation, washing, and the addition of IgM conjugate, substrate, and stop solutions. Within an hour of stopping, the optical densities of the plates were determined using an ELISA plate reader at 450/620 nm. Following the manufacturer's instructions, the mean optical densities of the

cut-off serum were determined first, and the outcome of each of the remaining wells was calculated using the formula below:

(Sample optical density / mean optical density of cut-off serum) × 10 = Antibody Index.

Samples with an index greater than or equal to 11 were considered positive, while samples with an index less than or equal to 9 were considered negative, and samples with an index between 9 and 11 were retested.

Following the screening of serum samples obtained from pregnant women using the anti-ZIKV IgM ELISA procedure, PCR was used to detect Zika virus RNA in seropositive samples using primers targeting the membrane protein gene (forward primer: CCGCTGCCAA-CACAAG; reverse primer: CCACTAACGTTCTTTTG-CAGACAT).

Statistical Analysis

The questionnaire data and laboratory analysis results were entered into Microsoft Excel and analysed with GraphPad Prism 5. Graphs and tables were used to present and compare quantitative variables, and chi-square and p-values were calculated. The statistical significance level was set at P 0.05.

Results

This study included 180 pregnant women who were recruited from the Ahmadu Bello University Teaching

Hospital, located in Zaria, which is situated in the North-West region of Nigeria. The age of participants ranged from 19 to 48 years old, with the majority (34.5%) being under the age of 30. The proportion of urban residents was 71.7% higher than the proportion of rural residents. Despite mostly having a tertiary education, 46.7% of the participants were unemployed. Medical records indicated that singleton pregnancy was common among participants, but the majority were in the second trimester and had given birth to two or more children. Enquiries about mosquito bites revealed that most participants had not been bitten by a mosquito in the past 30 days and the majority had no history of arboviral disease. Headache and fever were the most common symptoms among participants.

Anti-ZIKV immunoglobulin M antibodies (ZIKV IgM) were detected in serum samples obtained from recruited participants using an enzyme-linked immunoassay procedure. Among the 180 analyzed samples, 53 were seropositive, resulting in a prevalence of 29.4% (**table 1**). The age group 31–48 years had the highest seroprevalence (32.6%), while the age group 30 years or less had the lowest seroprevalence (26.6%). The prevalence was 34.1% among urban residents and 17.7% among rural residents. Seroprevalence by Education and Occupation was highest in participants with only primary school education (45.5%) and unemployed (35.7%), as shown in **table 2**.

The seroprevalence was recorded only in those with a singleton pregnancy based on pregnancy information. However, participants in the third trimester (33.3%) and primipara (39.2%) had the highest seroprevalence. The seroprevalence based on mosquito bite history was highest (35.7%) among those who were unaware of mosquito bite in the last 30 days. The seroprevalence of participants based on history of arboviral diseases showed a prevalence of 36.2% in those with a history of arboviral infections and a prevalence of 27.1% in those without a history of arboviral infections (**table 3**).

Table 1. The prevalence of ZIKV IgM seropositivity in the study population

IgM	Samples Количество образцов	%
Positive / Положительные	53	29.4
Negative / Отрицательные	127	70.6
Total / Bcero	180	100

Table 2. Seroprevalence of ZIKV IgM and sociodemographic variables

Variables	No tested (%) (out of a total of 180 examined) Число протестированных (%) (от общего числа, n = 180)	Seropositive (from 180) Число серопозитивных	Prevalence (from 53) Частота выявления	Significance (p-value) Достоверность отличий (значение p)
Age / Возраст				
≤ 30	94 (52%)	25	26.6%	0.5357
≥ 31–48	86 (48%)	28	32.6%	–
Residence / Место проживания				
Rural / Село	51 (28.3%)	9	17.7%	0.1097
Urban / Город	129 (71.7%)	44	34.1%	–
Education / Образование				
None / Отсутствует	6 (3.3%)	1	16.7%	0.8097
Primary / Начальное	11 (6.1%)	5	45.5%	–
Secondary / Среднее	39 (21.7%)	11	28.2%	–
Tertiary / Высшее	124 (68.9%)	36	29.0%	–
Employment Status / Статус занятости				
Employed / Работают	96 (53.3%)	23	24.0%	0.2150
Unemployed / Безработные	84 (46.7%)	30	35.7%	–
Total / Bcero	180 (100%)	53	–	–

Table 3. Seroprevalence of ZIKV IgM and Medical Variables

Variables Характеристики	No tested (%) Число протестированных (%)	Seropositive Число серопозитивных	Prevalence Частота выявления	Significance (<i>p</i> -value) Достоверность отличий (значение <i>p</i>)
Type of Pregnancy / Тип беременности				
Singleton / Одноплодная беременность	170 (94.4%)	53	31.2%	0.38
Twin / Двойня	5 (2.8%)	0	0%	–
Triple / Тройня	1 (0.6%)	0	0%	–
Other / Другое	4 (2.2%)	0	0%	–
Gestational Age / Гестационный возраст				
0–13	30 (16.7%)	5	16.7%	0.4211
14–26	84 (46.7%)	26	31.0%	–
27–40	66 (36.7%)	22	33.3%	–
Parity / Беременность				
Nulliparous / Нерожавшие	16 (8.9%)	3	18.8%	0.3743
Primiparous / Первородящие	51 (28.3%)	20	39.2%	–
Multiparous / Повторнородящие	113 (62.8%)	30	26.5%	–
History of Mosquito Bite / Наличие укусов москитов в анамнезе				
Yes / Да	67 (37.2%)	15	22.4%	0.4446
No / Нет	43 (23.9%)	13	30.2%	–
Unknown / Неизвестно	70 (38.9%)	25	35.7%	–
History of Arboviral Diseases / Наличие арбовирусных заболеваний в анамнезе				
Yes / Да	47 (26.2%)	17	36.2%	0.3875
No / Нет	133 (73.8%)	36	27.1%	–
Total / Всего	180 (100%)	53	–	–

Only six of the fifty-three samples that tested positive for anti-Zika IgM antibody were positive for ZIKV RNA, while the remaining forty-seven samples were negative, according to molecular analysis using RT-qPCR (**table 4**).

Discussion

Given the importance of preventing complications and hazards that arise during pregnancy, maternal and child health remains a public health priority. The current study, which screened pregnant women at Ahmadu Bello University Teaching Hospital, found an overall ZIKV seroprevalence of 29.4% among study participants. This finding was higher than those of Oderinde et al. (2020), who investigated the prevalence of locally undetected acute flavivirus infections in North-East Nigeria, and Sani et al. (2022), who conducted a serological study to detect ZIKV infection among HIV-infected pregnant women in a North-Western State of Nigeria [15, 16]. The prevalence rates of 22 and 4.5% were obtained in both studies, but this variation could be attributed to differences in study location and participants employed in the study.

When examining socio-demographic variables, the highest prevalence of 32.6% was found among participants over 30 years of age. Although this age group can still be referred to as childbearing age, a Puerto Rican study examining risk factors for ZIKV and Chikungunya infections found the highest prevalence in a similar older childbearing age group [17]. Nonetheless, the findings can be attributed to the age skewness of the study participants employed. The participants from urban areas had a higher prevalence of 34.1% than those from rural areas. This study's findings were consistent with those of

Ticona et al. (2021) [18]. Although it is widely assumed that ZIKV infection is more prevalent in rural areas, rapid urbanisation, the presence of urban slums, and economically disadvantaged urban residents may all contribute to an increase in ZIKV infection prevalence. The participants' educational status revealed that those with only a primary education had the highest prevalence of 45.5%. In a seroprevalence study in peninsular Malaysia and Sabah, Khoo et al. (2022) also discovered higher prevalence rates among those with lower education status [19]. The striking similarities could be attributed to a lack of proper orientation and comprehension of the importance of arbovirus vectors in their environment. The unemployed participants were found to have a higher prevalence rate than the employed participants. The study's 35.7% prevalence rate contradicts the findings of Anejo-Okopi (2020) in a Nigerian study of ZIKV among HIV positive and HIV negative pregnant women [20]. This disparity could be attributed to differences in the study populations recruited for both studies.

According to the analysis of study participants' medical information, the prevalence was only recorded among participants with a singleton pregnancy but was highest among participants in their third trimester; this finding is consistent with those of Anejo-Okopi (2020), who observed a similar result among pregnant women in the study. Regardless of the trimester, pathogenesis of the virus is destructive. Primiparous participants had the highest prevalence of 39.2% based on parity. Previous studies, such as Cooper et al. (2019) and Shen et al. (2021), have linked primiparity to an increased risk of microcephalic cases in fetuses [7, 21]. This study al-

Table 4. Seroprevalence of ZIKV IgM and Symptomatic Characteristics

Symptoms Симптомы	No tested Число протести- рованных	Seropositive Число серопо- зитивных	Prevalence Частота выявления	Significance (p-value) Достоверность отличий (значение p)
None / Отсутствовали	36 (20%)	4	11.1%	0.1778
Fever / Лихорадка	30 (16.7%)	14	46.7%	–
Rash / Сыпь	2 (1.1%)	0	0.0%	–
Conjunctivitis / Конъюнктивит	2 (1.1%)	1	50.0%	–
Conjunctivitis + joint pain + headache + muscle pain / Конъюнктивит + боль в суставах + головная боль + мышечная боль	1 (0.6%)	1	100.0%	–
Joint pain / Боль в суставах	11 (6.1%)	4	36.4%	–
Headache / Головная боль	60 (33.3%)	16	26.7%	–
Muscle pain / Мышечная боль	18 (10%)	6	33.3%	–
Fever + joint pain + headache / Лихорадка + боль в суставах + головная боль	1 (0.6%)	0	0.0%	–
Joint pain + headache / Боль в суставах + головная боль	1 (0.6%)	0	0.0%	–
Joint pain + headache + muscle pain / Боль в суставах + головная боль + мышечная боль	2 (1.1%)	0	0.0%	–
Fever + headache / Лихорадка + головная боль	9 (5.0%)	2	22.2%	–
Fever + joint pain / Лихорадка + боль в суставах	2 (1.1%)	1	50.0%	–
Fever + joint + pain + muscle pain / Лихорадка + боль в суставах + боль в мышцах	1 (0.6%)	1	100.0%	–
Fever + headache + muscle pain / Лихорадка + головная боль + мышечная боль	1 (0.6%)	1	100.0%	–
Fever + joint pain + headache / Лихорадка + боль в суставах + головная боль	1 (0.6%)	1	100.0%	–
Fever + joint pain + headache + muscle pain / Лихорадка + боль в суставах + головная боль + мышечная боль	1 (0.6%)	1	100.0%	–
Headache + muscle pain / Головная боль + мышечная боль	1 (0.6%)	0	0.0%	–
Total / Всего	180 (100%)	53	–	–

so inquired about a history of mosquito bites and arboviral infections, both of which are known risk factors for Zika infection. The highest prevalence was found to be 35.7% and 36.2% among those who could not recall any recent mosquito bites and those who had previous arboviral infections, respectively. Despite the fact that most studies do not allow for the option of being unable to recall whether they have been bitten by a mosquito, Shaibu et al. (2021) found higher prevalence rates in pregnant women who were rarely bitten by mosquitoes, which appears to contradict the study’s findings [22]. Although mosquito bites are still the main route of transmission, there are other routes of transmission that support the distribution of infection [22]. Based on history of arboviral infections, Mwayinka et al. (2021), who investigated the seroprevalence and associated risk factors of arboviral infections including Zika in Tanzania, found results similar to those obtained in this study [23]. Antibody Dependent Enhancement (ADE) is a common occurrence in people who have had previous arboviral infections. While fever and headache were the most common symptoms reported by study participants, participants with one or more ZIKV-related symptoms had a higher prevalence rate.

Molecular analysis detected ZIKV RNA in six out of fifty three samples positive for anti-Zika IgM, this equates

to 11.3% sero-molecular prevalence. To the best of our knowledge, this is one of the recent studies to detect ZIKV RNA in Northern Nigeria since Mathe et al. (2016) who recorded a low prevalence from pregnant women in North Central Nigeria.

Conclusion

Infection with ZIKV during pregnancy can have severe implications for both the pregnant woman and the developing fetus. The current study conducted on pregnant women in Nigeria’s northern region found a high prevalence of ZIKV infection, indicating a possible outbreak of the viral infection in the area. Even though the current disease burden in Nigeria is unknown, it is clear that ZIKV infection during pregnancy can have serious consequences, and pregnant women must take precautions to avoid infection.

REFERENCES

- Otu A.A., Udoh U.A., Ita O.I., Hicks J.P., Ukpeh I., Walley J. Prevalence of Zika and malaria in patients with fever in secondary health-care facilities in south-eastern Nigeria. *Trop. Doct.* 2019; 50(1): 22–30. <https://doi.org/10.1177/0049475519872580>
- Iheonu C., Urama N.E. Addressing Poverty Challenges in Nigeria, African Heritage Institution; 2019. Available at: <https://www.africaportal.org/publications/addressing-poverty-challenges-nigeria/>

3. Kura I.S., Ahmad H., Olayemi I.K., Solomon D., Ahmad A.H., Salim H. The status of knowledge, attitude, and practice in relation to major mosquito borne diseases among community of Niger State, Nigeria. *African J. Biomed. Res.* 2022; 25: 339–46. <https://doi.org/10.4314/AJBR.V25I3.9>
4. Hussain A., Ali F., Latiwesh O.B., Hussain S. A comprehensive review of the manifestations and pathogenesis of Zika virus in neonates and adults. *Cureus.* 2018; 10(9): e3290. <https://doi.org/10.7759/cureus.3290>
5. Marbán-Castro E., Goncé A., Fumadó V., Romero-Acevedo L., Bardají A. Zika virus infection in pregnant women and their children: A review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2021; 265: 162–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2021.07.012>
6. CDC. For Pregnant Women. Zika virus. Pregnancy; 2018. Available at: <https://www.cdc.gov/zika/pregnancy/index.html>
7. Cooper H.J., Iwamoto M., Lash M., Connors E.E., Paladini M., Slavinski S., et al. Maternal Zika virus infection: Association with small-for-gestational-age neonates and preterm birth. *Obstet. Gynecol.* 2019; 134(6): 1197–204. <https://doi.org/10.1097/AOG.0000000000003577>
8. Meneses J.D.A., Ishigami A.C., de Mello L.M., de Albuquerque L.L., de Brito C.A.A., Cordeiro M.T., et al. Lessons learned at the epicenter of Brazil's congenital Zika epidemic: Evidence from 87 confirmed cases. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 64(10): 1302–8. <https://doi.org/10.1093/cid/cix166>
9. Nogueira M.L., Nery Júnior N.R.R., Estofoleto C.F., Bernardes Terzian A.C., Guimarães G.F., Zini N., et al. Adverse birth outcomes associated with Zika virus exposure during pregnancy in São José do Rio Preto, Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.* 2018; 24(6): 646–52. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.11.004>
10. Brasil P., Pereira J.P., Raja Gabaglia C., Damasceno L., Wakimoto M., Ribeiro Nogueira R.M., et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro – preliminary report. *Obstet. Gynecol. Surv.* 2016; 71(6): 331–3. <https://doi.org/10.1097/01.ogx.0000483239.08585.8d>
11. Hoën B., Schaub B., Funk A.L., Ardillon V., Boullard M., Cabié A., et al. Pregnancy outcomes after ZIKV infection in French territories in the Americas. *N. Engl. J. Med.* 2018; 378(11): 985–94. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1709481>
12. Martin J.A., Hamilton B.E., Osterman M.J.K., Driscoll A.K., Drake P. Births: final data for 2016. *Natl. Vital Stat. Rep.* 2018; 67: 1–55.
13. Block L.N., Aliota M.T., Friedrich T.C., Schotzko M.L., Mean K.D., Wiepz G.J., et al. Embryotoxic impact of Zika virus in a rhesus macaque in vitro implantation model. *Biol. Reprod.* 2020; 102(4): 806–16. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz236>
14. Mathé P., Egah D.Z., Müller J.A., Shehu N.Y., Obishakin E.T., Shwe D.D., et al. Low Zika virus seroprevalence among pregnant women in North Central Nigeria, 2016. *J. Clin. Virol.* 2018; 105: 35–40. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.05.011>
15. Oderinde B., Mora-Cardenas E., Carletti T., Baba M., Marcello A. Prevalence of locally undetected acute infections of Flaviviruses in North-Eastern Nigeria. *Virus Res.* 2020; 286: 198060. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198060>
16. Sani N.M., Bello F.A., Dalha S., Dalha S., Abbas M.A., Mujahid N.S., et al. Serological detection of Zika Virus infection among HIV infected pregnant women in Dutse, Jigawa State, Nigeria. *Bayero J. Pure Appl. Sci.* 2022; 15: 64–8. <https://doi.org/10.4314/bajopas.v15i1.8>
17. Adams L.E., Sánchez-González L., Rodríguez D.M., Ryff K., Major C., Lorenzi O., et al. Risk factors for infection with chikungunya and Zika viruses in southern Puerto Rico: A community-based cross-sectional seroprevalence survey. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2022; 16(6): e0010416. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010416>
18. Aguilar Ticona J.P., Baig H., Nery N., Doss-Gollin S., Sacramento G.A., Adhikarla H., et al. Risk of sexually transmitted Zika virus in a cohort of economically disadvantaged urban residents. *J. Infect. Dis.* 2021; 224(5): 860–4. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab001>
19. Khoo H.Y., Lee H.Y., Khor C.S., Tan K.K., bin Hassan M.R., Wong C.M., et al. Seroprevalence of Zika virus among forest fringe communities in peninsular Malaysia and Sabah: General population-based study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2022; 107(3): 560–8. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.21-0988>
20. Anejo-Okopi J., Gotom D.Y., Chiehiura N.A., Okojokwu J.O., Amanyi D.O., Egbere J.O., et al. The seroprevalence of Zika virus infection among HIV positive and HIV negative pregnant women in Jos, Nigeria. *Hosts and Viruses.* 2020; 7(6): 129–136. <https://doi.org/10.17582/journal.hv/2020/7.6.129.136>
21. Shen S., Xiao W., Zhang L., Lu J., Funk A., He J., et al. Prevalence of congenital microcephaly and its risk factors in an area at risk of Zika outbreaks. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2021; 21(1): 214. <https://doi.org/10.1186/s12884-021-03705-9>
22. Shaibu J.O., Okwuraiwe A.P., Jakkari A., Dennis A., Akinyemi K.O., Li J., et al. Sero-molecular prevalence of Zika virus among pregnant women attending some public hospitals in Lagos State, Nigeria. *Eur. J. Med. Heal. Sci.* 2021; 3(5): 77–82. <https://doi.org/10.24018/ejmed.2021.3.5.1075>
23. Mwanyika G.O., Sindato C., Rugarabamu S., Rumisha S.F., Karimuribo E.D., Misinzo G., et al. Seroprevalence and associated risk factors of chikungunya, dengue, and Zika in eight districts in Tanzania. *Int. J. Infect. Dis.* 2021; 111: 271–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.08.040>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-163>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023



Выбор эффективного режима инактивации вируса *Pseudopestis avium* (Paramyxoviridae: Orthoavulovirus: Avian orthoavulovirus 1) для изготовления вакцины против болезни Ньюкасла

Джекебеков К.К., Асанжанова Н.Н., Нурпейсова А.С., Рыскельдинова Ш.Ж., Абсатова Ж.С., Абай Ж.С., Шаяхметов Е.А., Омуртай А.Д., Молдагулова С.У., Калимолда Э.Ж., Садикалиева С.О., Шораева К.А., Закарья К.Д.

Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, 080409, пгт. Гвардейский, Жамбылская обл., Казахстан

Введение. Болезнь Ньюкасла (БН) относится к категории особо опасных. Её основным источником является инфицированная и переболевшая птица. Всего через сутки после инфицирования начинается выделение возбудителя, а после выздоровления вирус сохраняется в организме ещё на протяжении 2–4 месяцев. Сложность окончательного устранения возбудителя болезни заключается в его способности к длительному сохранению во внешней среде и возможности постоянной циркуляции в одном комплексе между различными половозрастными группами птиц. Основным элементом защиты птиц от БН является иммунопрофилактика, основанная на применении вакцин, которые содержат инактивированный штамм вируса БН (ВБН). **Цель** – оптимизация параметров инактивации актуального штамма Н ВБН формальдегидом в конечных концентрациях 0,01, 0,025, 0,05 и 0,1% при температурных условиях 20 ± 2 и $37 \pm 0,5$ °С.

Материалы и методы. В работе использовали вирусосодержащую суспензию штамма Н ВБН с исходной биологической активностью $10,75 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, выращенного культивированием в 10-суточных развивающихся куриных эмбрионах.

Результаты. После введения испытуемых инактивированных суспензий ВБН при разных температурных режимах и концентрациях инактиванта у привитых птиц на 16-е сутки в сыворотках крови обнаружение антител к ВБН в среднегеометрических титрах составило не ниже 1 : 63 в реакции торможения гемагглютинации, что дает возможность считать исследуемые инактивированные суспензии антигенно активными.

Заключение. Установлены оптимальные параметры режима инактивации (конечная концентрация, температура и время инактивации) штамма Н ВБН. Процесс инактивации в условиях температуры $37 \pm 0,5$ °С с концентрациями инактиванта 0,01, 0,025, 0,05, 0,1% длится до 72, 22, 18, 12 ч соответственно. Процесс инактивации в условиях при температуре 20 ± 2 °С с концентрациями инактиванта 0,05, 0,1% длится до 22 и 18 ч соответственно.

Ключевые слова: болезнь Ньюкасла; штамм; инактивация; формальдегид; температура

Для цитирования: Джекебеков К.К., Асанжанова Н.Н., Нурпейсова А.С., Рыскельдинова Ш.Ж., Абсатова Ж.С., Абай Ж.С., Шаяхметов Е.А., Омуртай А.Д., Молдагулова С.У., Калимолда Э.Ж., Садикалиева С.О., Шораева К.А., Закарья К.Д. Выбор эффективного режима инактивации вируса *Pseudopestis avium* (Paramyxoviridae: Orthoavulovirus: Avian orthoavulovirus 1) для изготовления вакцины против болезни Ньюкасла. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(2): 124–131. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-163> <https://elibrary.ru/ijfbfc>

Для корреспонденции: Абай Жандос Сайлаубекулы, магистр биол. наук, младший научный сотрудник, Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности» Министерства здравоохранения Республики Казахстан, 080409, пгт. Гвардейский, Жамбылская обл., Казахстан. E-mail: abai.zhandos15@gmail.com

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

Финансирование. Исследование выполнено за счет финансирования по проекту «Разработка, внедрение инактивированной вакцины против болезни Ньюкасла и инактивированной ассоциированной вакцины против болезни Ньюкасла и гриппа птиц» КН МОН РК.

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 комиссией по биологической этике Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (протокол № 1 от 20.01.2021).

Поступила 04.02.2023

Принята в печать 04.04.2023

Опубликована 30.04.2023

Selection of conditions for effective inactivation of *Pseudopestis avium* virus (Paramyxoviridae: *Orthoavulovirus: Avian orthoavulovirus 1*) for the production of a Newcastle disease vaccine

Kuanish K. Jekebekov, Nurika N. Assanzhanova, Ainur S. Nurpeisova, Sholpan Zh. Ryskeldinova, Zharkinay S. Absatova, Zhandos S. Abay, Yeraly A. Shayakhmetov, Alisher D. Omurtay, Sabina U. Moldagulova, Elina Zh. Kalimolda, Sandugash O. Sadikalieva, Kamshat A. Shorayeva, Kunsulu D. Zakarya

Research Institute for Biological Safety Problems, 080409, Gvardeisky urban-type settlement, Zhambyl Region, Kazakhstan

Introduction. Newcastle disease (ND) is classified as especially dangerous pathogen. Its primary source is an infected or recovered bird. The virus shedding begins just in a day after infection, and virus remains in the body for another 2-4 months after the recovery. The complexity of the final elimination of the causative agent of the disease lies in its ability for long-term preservation in the external environment and the possibility of constant circulation in one complex between groups of birds of different sex and age. Therefore, the main element of protecting birds from ND is immunoprophylaxis that is based on vaccines containing an inactivated ND virus (NDV).

The aim of the work – is to optimize the parameters of inactivation of the NDV actual strain H with formaldehyde at final concentrations of 0.01, 0.025, 0.05, and 0.1% under temperature conditions of 20 ± 2 and 37 ± 0.5 °C.

Materials and methods. We used a virus-containing suspension of the NDV strain H with an initial biological activity of $10.75 \lg \text{EID}_{50}/\text{cm}^3$ grown by cultivation in 10-day-old developing chick embryos.

Results. On the 16th day after the administration of the tested suspensions of NDV inactivated at different temperatures and concentrations of the inactivant, the geometric mean titers of antibodies to NDV in sera of vaccinated birds were at least 1 : 63 in the hemagglutination inhibition reaction, indicating that the studied inactivated suspensions were antigenically active.

Conclusion. The optimal parameters of the inactivation mode (final concentration, temperature and time of inactivation) of the NDV strain H were established. The inactivation process at 37 ± 0.5 °C with inactivant concentrations of 0.01, 0.025, 0.05, and 0.1% lasts up to 72, 22, 18, and 12 hours, respectively. The inactivation process at 20 ± 2 °C with inactivant concentrations of 0.05 and 0.1% lasts up to 22 and 18 hours, respectively.

Keywords: Newcastle disease virus; strain; inactivation; formaldehyde; temperature

For citation: Jekebekov K.K., Assanzhanova N.N., Nurpeisova A.S., Ryskeldinova Sh.Zh., Absatova Zh.S., Abay Zh.S., Shayakhmetov Ye.A., Omurtay A.D., Moldagulova S.U., Kalimolda E.Zh., Sadikalieva S.O., Shorayeva K.A., Zakarya K.D. Selection of conditions for effective inactivation of *Pseudopestis avium* virus (Paramyxoviridae: *Orthoavulovirus: Avian orthoavulovirus 1*) for the production of a Newcastle disease vaccine. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(2): 124-131 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-163> <https://elibrary.ru/ljfbfc>

For correspondence: Zhandos S. Abay, Master (Biol.), Junior Researcher, Research Institute for Biological Safety Problems, 080409, Gvardeisky urban-type settlement, Zhambyl Region, Kazakhstan.
E-mail: abai.zhandos15@gmail.com

Information about the authors:

Jekebekov K.K., <https://orcid.org/0000-0002-7801-6198>
Assanzhanova N.N., <https://orcid.org/0000-0001-7267-3931>
Nurpeisova A.S., <https://orcid.org/0000-0002-7039-5621>
Ryskeldinova Sh.Zh., <https://orcid.org/0000-0002-9578-5140>
Absatova Zh.S., <https://orcid.org/0000-0003-0510-5496>
Abay Zh.S., <https://orcid.org/0000-0003-1822-1437>
Shayakhmetov Ye.A., <https://orcid.org/0000-0002-4486-3188>
Omurtay A.D., <https://orcid.org/0000-0002-9331-5161>
Moldagulova S.U., <https://orcid.org/0000-0002-8353-1629>
Kalimolda E.Zh., <https://orcid.org/0000-0003-4376-7992>
Sadikalieva S.O., <https://orcid.org/0000-0003-4953-3628>
Shorayeva K.A., <https://orcid.org/0000-0001-8777-8453>
Zakarya K.D., <https://orcid.org/0000-0003-2186-7706>

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

Funding: The research was funded by the project "Development, implementation of an inactivated vaccine against Newcastle disease and an inactivated associated vaccine against Newcastle disease and avian influenza" of the CS MES RK.

Conflict of interest. The authors declare that there is 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 Commission on Biological Ethics of the Research Institute for Biological Safety Problems (protocol No. 1 dated January 20, 2021).

Received 04 February 2023

Accepted 04 April 2023

Published 30 April 2023

Введение

Болезнь Ньюкасла (БН, лат. *Pseudopestis avium*) – инфекционное заболевание, поражающее многие виды диких и домашних птиц, вирионы которого представляют собой оболочечный вирус диаметром около 200–300 нм. Геном вируса представлен несегментированной одноцепочечной отрицательной РНК, кодирующей шесть основных генов вируса: нуклеокапсид (N), матричный белок (M), фосфопротеин (P), гибридный белок (F), гемагглютинин-нейраминидазный белок (HN) и большой полимеразный белок (L) [1].

БН является эндемическим заболеванием во многих странах мира, в том числе Республике Казахстан, и легко распространяется различными путями. В Российской Федерации за 2022 г. было зафиксировано 8 вспышек БН на территории Забайкальского края, Владимирской и Ростовской областей.

В Республике Казахстан в последние годы болезнь регистрировалась в Зерендинском, Буландынском и Целиноградском районах Акмолинской области, а также в Кызылжарском, Жамбылском, Мамлютинском районах Северо-Казахстанской области [2, 3]. Болезнь относится к категории особо опасных, для купирования неблагоприятного эпизоотического очага всё поголовье больной и подозреваемой в заболевании и заражении птицы подвергается ликвидации путём сжигания. Такие меры свидетельствуют о высокой вредоносности болезни с серьёзным экономическим ущербом [2–4].

Основным источником инфекции БН является инфицированная и переболевшая птица, которая способна выделять вирус при дыхании, через снесённые яйца и все выделения организма. Всего через сутки после инфицирования начинается выделение возбудителя, а после выздоровления вирус сохраняется в организме ещё на протяжении 2–4 месяцев. Чаще всего БН проявляется в виде эпизоотии, имеет определённую периодичность и склонность к летне-осеннему сезону. Устойчивость вируса БН (ВБН) к действию физических и химических факторов зависит от наличия белка и рН среды [5–7]. Вирус устойчив при рН в диапазоне 2,0–10,0, в высушенных органах при температуре 17–18 °С сохраняется до 2 лет, в птичниках в зимнее время – до 140 дней, летом – до 7 дней. Эта сезонность, в свою очередь, связана с активизацией хозяйственной деятельности и увеличением поголовья птицы в это время. Однако в промышленных хозяйствах могут формироваться стационарные очаги заболевания, связанные с гигиеническими недостатками в текущей си-

стеме выращивания, с которыми трудно бороться [8].

Сложность окончательного устранения возбудителя болезни заключается в его способности к длительному сохранению во внешней среде и возможности постоянной циркуляции в одном комплексе между различными половозрастными группами птиц [8, 9].

Во многих странах основным элементом защиты птиц от БН является иммунопрофилактика, основанная на применении вакцин, которые содержат инактивированный штамм ВБН. К этой группе относятся вакцины Nobilis Paramyxo P201, Colombovac PMV (Голландия), Paramixovacol (Румыния), Salmovir (Польша), Hpraviar (Испания) [2–4].

На введение инактивированных вакцин против БН у птицы вырабатывается однородный продолжительный иммунитет. При этом введение инактивированного антигена не вызывает иммунодепрессии, отсутствует репликация вирусов, т.е. исключаются основные факторы негативного влияния вакцинации на организм [10–12].

Согласно данным литературы, для инактивации ВБН в мире используются различные химические соединения, среди которых наибольшее распространение нашли формальдегид, бета-пропиолактон (БПЛ) и димер этиленмина (ДЭИ) [8–11]. Инактивирующее действие этих препаратов нацелено на генетический материал возбудителей [13–21].

Однако БПЛ в связи с высокой стоимостью экономически не выгоден в масштабном производстве вакцины [13, 14]. Использование ДЭИ требует строгого соблюдения температурно-временного режима инактивации вируса, и его сбой могут привести к неполной инактивации, в связи с чем минимально рекомендуемое время с применением ДЭИ составляет около 30 ч. В целях сокращения времени инактивации при использовании ДЭИ повышение концентрации инактиванта и температуры реакционной среды заметно ускоряет процесс инактивации вируса. Но это в свою очередь может привести к снижению иммуногенной активности вакцинного препарата [14, 21].

Формальдегид в качестве инактиванта в сравнении с БПЛ отличается доступной себестоимостью, а в сравнении с ДЭИ может инактивировать вирус с сохранением доменов, связанных с проникновением вируса, и, более того, не влияет на антигенность вируса [19–21].

При использовании формальдегида в качестве инактиванта необходимо соблюдать температурно-временной режим. Данные литературы свидетельствуют

о том, что определение эффективной концентрации инактиванта и времени инаktivации остаётся одним из актуальных вопросов в производстве эффективных вакцин против БН [14].

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования является оптимизация параметров инаktivации актуального штамма Н ВБН формальдегидом в конечных концентрациях 0,01, 0,025, 0,05 и 0,1% при условиях температуры 20 ± 2 и $37 \pm 0,5$ °С.

Материалы и методы

Для исследования в работе использовали вирусосодержащую суспензию (ВСС) штамма Н ВБН с исходной биологической активностью $10,75 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, выращенного культивированием в 10-суточных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ).

Инаktivацию вируса проводили с использованием химического соединения формальдегида в различных конечных концентрациях (0,01, 0,025, 0,05 и 0,1%) при температурах 20 ± 2 и $37 \pm 0,5$ °С в течение 72 ч. Параллельно в качестве сравнительного исследования без добавления формальдегида проводили тепловую инаktivацию вирусосодержащего материала при температурах 20 ± 2 и $37 \pm 0,5$ °С в течение 72 ч, что являлось контролем.

Для изучения кинетики инаktivации вируса проводили периодический отбор проб в течение 72 ч через каждые 4, 6 и 12 ч. Для нейтрализации формальдегида в ВСС добавляли 25% раствор тиосульфата натрия.

Полноту инаktivации проверяли методом трех последовательных пассажей на 10-суточных РКЭ при введении по 0,2 мл обработанной формальдегидом ВСС, а затем в следующих двух пассажах неразведённой аллантоисной жидкости из предыдущего пассажа.

Антигенную активность инаktivированной суспензии проверяли в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Иммунизация птиц проводилась с использованием полностью инаktivированной вирусной суспензии ВБН. У однократно привитых цыплят через 16 суток после иммунизации инаktivированной суспензией отбирали кровь и определяли уровень накопления антител в РТГА.

Авирулентность инаktivированной суспензии проверяли на 30-суточных цыплятах живой массой не ниже 100 г из хозяйств, благополучных по острым инфекционным заболеваниям птиц. Иммунизацию цыплят осуществляли внутримышечным введением инаktivированной суспензии объемом 2,5 мл в область груди. За привитой птицей вели ежедневное клиническое наблюдение с учётом возможных патологий общего и местного характера, напоминающих признаки БН. В случае отсутствия признаков болезни вирус считали инаktivированным.

Биологическую активность вирусного материала определяли титрованием на 10-суточных РКЭ по общепринятой методике. Титр вируса рассчитывали по методу Рида–Менча выраженным в $\lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$. Эмбрионы инкубировали при температуре 37 °С в течение 72 ч. В аллантоисной жидкости после каждого

пассажа определяли наличие гемагглютининов с помощью микрометода реакции гемагглютинации (РГА) с использованием 1% взвеси эритроцитов петуха [22].

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием пакета программ GraphPad Prism 8. Полученные данные подвергали статистическому анализу с использованием критерия Стьюдента, считая их достоверными при $p < 0,05$ [23].

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 комиссией по биологической этике Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (протокол № 1 от 20.01.2021).

Результаты

Одной из главных проблем получения высокоэффективных инаktivированных вакцин является выбор наиболее оптимального способа инаktivации вируса, обеспечивающего необратимое повреждение его репликативного механизма при полном сохранении исходной антигенной структуры.

Для проверки эффективности инаktivированного воздействия формальдегида в отношении штамма ВБН устанавливали параметры инаktivации вируса. Результаты исследований кинетики инаktivации ВБН в разной конечной концентрации формальдегида при температурном режиме инаktivации $37 \pm 0,5$ °С оценивали по кривым инаktivации, представленным на **рис. 1**.

По данным **рис. 1** видно, что скорость инаktivации вируса была пропорциональна концентрации препарата в вирусосодержащей жидкости и времени его воздействия при использовании в качестве инаktivанта формальдегида в конечных концентрациях 0,01, 0,025, 0,05 и 0,1%. Полная потеря инфекционной активности ВБН при инаktivации формальдегидом в конечных концентрациях 0,01, 0,025, 0,05 и 0,1% при температуре $37 \pm 0,5$ °С наступает на 72, 22, 18 и 12-й час соответственно.

Эффективность инаktivированного воздействия формальдегида в вышеуказанных концентрациях с продолжительностью инаktivации 72 ч при температуре 20 ± 2 °С и рН реакционной среды 7,2–7,4 представлена на **рис. 2**.

Согласно исследованиям (**рис. 2**), полная потеря инфекционной активности ВБН при инаktivации формальдегидом в конечных концентрациях 0,01, 0,025, 0,05 и 0,1% при температуре 20 ± 2 °С наступает на 72, 60, 22 и 22-й час соответственно.

Результаты исследований термоинаktivации (сравнительный контроль), представленные на **рис. 1** и **2**, свидетельствуют о том, что ВБН снижает свою инфекционную активность при нагревании до $37 \pm 0,5$ °С в течение 72 ч на $4,05 \pm 0,16 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, а при температуре 20 ± 2 °С – только на $1,05 \pm 0,16 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{см}^3$.

В **табл. 1** представлены результаты определения антигенной активности в РГА после инаktivации формальдегидом при разных температурных режимах и концентрациях инаktivанта в сравнении с контролем.

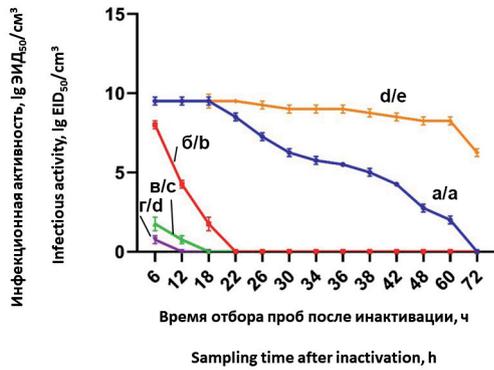


Рис. 1. Кинетика инаktivации вируса болезни Ньюкасла в конечной концентрации формальдегида 0,01% (а), 0,025% (б), 0,05% (в) и 0,1% (г) и сравнительного контроля (д) без добавления формальдегида (тепловая инаktivация вирусосодержащего материала) при температурном режиме инаktivации $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

Fig. 1. Kinetics of NDV inactivation at a final formaldehyde concentration of 0.01% (a), 0.025% (b), 0.05% (c) and 0.1% (d) and control (e) without addition formaldehyde (thermal inactivation of virus-containing material) at an inactivation temperature regime of $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$.

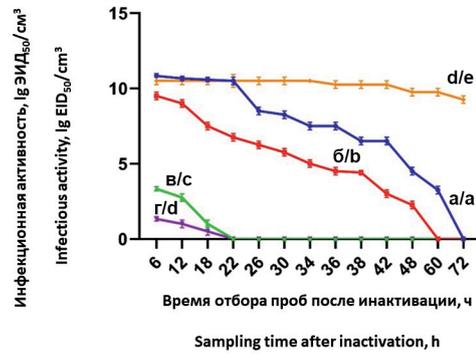


Рис. 2. Кинетика инаktivации вируса болезни Ньюкасла в конечной концентрации формальдегида 0,01% (а), 0,025% (б), 0,05% (в) и 0,1% (г) и сравнительного контроля (д), без добавления формальдегида (тепловая инаktivация вирусосодержащего материала) при температурном режиме инаktivации $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Fig. 2. Kinetics of NDV inactivation at a final formaldehyde concentration of 0.01% (a), 0.025% (b), 0.05% (c) and 0.1% (d) and control (e) without addition formaldehyde (thermal inactivation of virus-containing material) at an inactivation temperature regime of $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Таблица 1. Антигенная активность в реакции гемагглютинации после инаktivации формальдегидом при разных температурных режимах и концентрациях инаktivанта в сравнении с контролем

Table 1. Antigenic activity in RHA after formaldehyde inactivation at different temperatures and concentrations of the inactivant in comparison to the control

Продолжительность инаktivации, ч Duration of inactivation, h	Концентрация инаktivанта и температурный режим Inactivant concentrations and temperature conditions								Контроль Control	
	0,01%		0,025%		0,05%		0,1%		37 ± 0,5 °C	20 ± 2 °C
	37 ± 0,5 °C	20 ± 2 °C	37 ± 0,5 °C	20 ± 2 °C	37 ± 0,5 °C	20 ± 2 °C	37 ± 0,5 °C	20 ± 2 °C		
6	1 : 1024	1 : 1024	1 : 1024	1 : 1024	1 : 1024	1 : 1024	1 : 512	1 : 1024	1 : 1024	1 : 1024
12	1 : 1024	1 : 1024	1 : 512	1 : 1024	1 : 512	1 : 512	1 : 512	1 : 512	1 : 1024	1 : 1024
18	1 : 1024	1 : 1024	1 : 512	1 : 1024	1 : 512	1 : 512	1 : 512	1 : 512	1 : 1024	1 : 1024
22	1 : 512	1 : 1024	1 : 512	1 : 1024	1 : 512	1 : 512	1 : 256	1 : 512	1 : 1024	1 : 1024
26	1 : 512	1 : 1024	1 : 512	1 : 1024	1 : 256	1 : 512	1 : 256	1 : 512	1 : 1024	1 : 1024
30	1 : 512	1 : 1024	1 : 256	1 : 1024	1 : 256	1 : 512	1 : 256	1 : 512	1 : 1024	1 : 1024
34	1 : 512	1 : 1024	1 : 256	1 : 512	1 : 256	1 : 256	1 : 256	1 : 256	1 : 1024	1 : 1024
36	1 : 512	1 : 512	1 : 256	1 : 512	1 : 256	1 : 256	1 : 256	1 : 256	1 : 1024	1 : 1024
38	1 : 512	1 : 512	1 : 128	1 : 512	1 : 64	1 : 256	1 : 256	1 : 256	1 : 1024	1 : 1024
42	1 : 512	1 : 512	1 : 128	1 : 512	1 : 64	1 : 128	1 : 64	1 : 128	1 : 512	1 : 1024
48	1 : 512	1 : 256	1 : 128	1 : 128	1 : 64	1 : 128	1 : 64	1 : 64	1 : 512	1 : 1024
60	1 : 256	1 : 256	1 : 128	1 : 128	1 : 64	1 : 64	1 : 64	1 : 64	1 : 512	1 : 1024
72	1 : 256	1 : 256	1 : 64	1 : 128	1 : 64	1 : 64	1 : 32	1 : 64	1 : 512	1 : 1024

Также в целях определения антигенной активности инаktivированной суспензии ВБН у однократно привитых цыплят через 16 суток после иммунизации инаktivированной суспензией отбирали сыворотку крови и определяли уровень накопления антител в РТГА. Результаты представлены в табл. 2.

Данные, представленные в табл. 2, показывают, что после введения испытуемых инаktivированных суспензий ВБН при разных температурных режимах и концентрациях инаktivанта у привитых птиц на 16-

е сутки в сыворотках крови обнаружение антител к ВБН в среднегеометрических титрах (СГТ) составило не ниже 1 : 63 в РТГА, что дает возможность считать исследуемые инаktivированные суспензии антигенно активными [8].

Авирулентность инаktivированных вирусосодержащих суспензий проверяли на 10-суточных РКЭ трехкратным пассированием материала с последующей постановкой РГА. В результате в РГА не выявлена гемагглютинация ВБН, и поэтому исследуе-

Таблица 2. Уровень накопления антител в реакции торможения гемагглютинации у однократно привитых цыплят через 16 суток после иммунизации инактивированной суспензией**Table 2. The level of accumulation of antibodies in hemagglutination inhibition assay (HIA) in single-vaccinated chickens on day 16th after immunization with inactivated suspension**

Продолжительность инаktivации, ч Duration of inactivation, h	Концентрация инаktivанта и температурный режим Inactivant concentrations and temperature conditions							
	0,01%		0,025%		0,05%		0,1%	
	37 ± 0,5 °C	20 ± 2 °C	37 ± 0,5 °C	20 ± 2 °C	37 ± 0,5 °C	20 ± 2 °C	37 ± 0,5 °C	20 ± 2 °C
12	–	–	–	–	–	–	179,59	–
18	–	–	–	–	201,59	–	160	–
22	–	–	100,79	–	179,59	129,9	142,54	139,3
60	–	–	89,79	113,13	126,99	98,49	113,14	105,6
72	71,27	113,13	89,79	97,52	71,27	80	63	80

Таблица 3. Результаты определения безвредности/ареактогенности инаktivированных суспензий вируса болезни Ньюкасла после трехкратного пассажа**Table 3. The results of assessment of the safety/reactogenicity of inactivated NDV suspensions after the triple administration**

Суспензия Suspension	Выживаемость, дни наблюдения Survival, observation days										Местная реакция Local reaction	Тканевая реакция на месте введения Tissue reaction at the injection site
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Инаktivированная суспензия ВБН-1 Inactivated suspension NDV-1	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	---	---
Инаktivированная суспензия ВБН-2 Inactivated suspension NDV-2	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	---	---
Инаktivированная суспензия ВБН-3 Inactivated suspension NDV-3	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	---	---

Примечание. Числитель – количество павших птиц; знаменатель – общее количество птиц; «+» – реакция незначительная (единичное дискретное разрастание волокнистой соединительной ткани белого цвета диаметром 2,0–2,5 мм); «–» – отсутствие реакции.

Notes. Numerator is the number of dead birds; denominator is the total number of birds; + reaction is insignificant (single discrete growth of fibrous connective tissue of white color, with a diameter of 2.0–2.5 mm; – no reaction.

мые образцы являются ареактогенными для 10-суточных РКЭ.

По результатам контроля безвредности/реактогенности и авирулентности испытуемых инаktivированных суспензий ВБН после трехкратного пассажа в течение 10 суток после введения у привитых птиц каждой группы не отмечалось клинических признаков заболевания (депрессия, потеря чувствительности, синюшность видимых слизистых оболочек, гребня и серёжек и др.), а также гибели птиц. На месте введения испытуемого материала не отмечалось признаков воспаления. У некоторых птиц наблюдалась местная реакция в виде припухлости, которая полностью рассосалась в течение 3–5 дней после введения испытуемого образца (табл. 3).

Данные, представленные в табл. 3, показывают, что введение испытуемых инаktivированных суспензий ВБН не вызывает гибель 30-суточных цыплят, подопытные птицы весь срок наблюдения оставались клинически здоровыми и живыми без местной и тканевой реакции на месте введения испытуемого образца.

Обсуждение

Анализ данных отечественной и зарубежной литературы показывает, что формальдегид является одним из широко используемых инаktivантов для по-

давления инфекционной активности вирусов [24, 25]. Он инаktivирует вирусы благодаря высокой реакционной способности в отношении белков и нуклеиновых кислот. При взаимодействии с нуклеиновой кислотой формальдегид вступает в реакцию с аминогруппами пуриновых и пиримидиновых оснований, а также нарушает водородные связи, обеспечивающие вторичную структуру компонента вируса. Формальдегид на определенных этапах воздействия разрушает источник инфекционности вирусов – нуклеиновую кислоту – и сохраняет при этом его антигенный фонд, белковую оболочку [26, 27].

Следовательно, скорость инаktivации нуклеиновой кислоты будет зависеть от скорости проникновения вещества через белковую оболочку вирусной частицы. Поэтому при реакции формальдегида с вирусом скорость инаktivации снижается с увеличением длительности обработки [28].

Эффективность инаktivировующего воздействия формальдегида по отношению к ВБН в разных концентрациях инаktivанта с продолжительностью инаktivации 72 ч при разном температурном режиме показало, что при использовании 0,01, 0,025, 0,05 и 0,1% формальдегида полная потеря инфекционной активности вируса при температуре реакционной среды 37 ± 0,5 °C

происходит до 72, 22, 18 и 12 ч соответственно с сохранением антигенной активности 1 : 512 в РГА и СГТ не ниже 1 : 63 в РТГА. Процесс инактивации в условиях температуры 20 ± 2 °С с 0,01 и 0,025% раствором формальдегида длится до 72 ч, тогда как повышение концентрации инактиванта до 0,05 и 0,1% снижало время самого процесса инактивации до 22 ч. Эта тенденция прямой зависимости снижения инфекционной активности от концентрации инактиванта наблюдалась в аналогичных исследованиях [29], где формальдегид в конечной концентрации 0,05 и 0,1% при температуре 20 ± 2 °С инактивирует ВБН в течение 42 и 30 ч соответственно. Повышение температуры до $37 \pm 0,5$ °С при указанных концентрациях укорачивает продолжительность инактивации до 32 и 24 ч соответственно.

Полученные данные показывают, что с увеличением концентрации формальдегида до 0,1%, а также повышением температуры инактивации до $37 \pm 0,5$ °С устанавливаются оптимальные параметры процесса инактивации ВБН.

Контрольные исследования без воздействия формальдегида при температуре $37 \pm 0,5$ °С показали, что в течение 72 ч не происходит полной инактивации вируса, снижение инфекционной активности ВБН было только на $4,05 \text{ Ig ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, а при комнатной температуре (20 ± 2 °С) – на $1,05 \text{ Ig ЭИД}_{50}/\text{см}^3$, антигенная активность составила от 512 до 1024, что подтверждается данными других авторов [29, 30].

Анализируя потерю инфекционной активности с сохранением антигенной активности ВБН штамма Н, при изучаемых условиях инактивации формальдегидом для дальнейших исследований по конструированию вакцинных препаратов наиболее эффективными являются его рабочие концентрации 0,05 и 0,1% с температурой реакционной среды $37 \pm 0,5$ °С, при которых продолжительность инактивации составляет 18 и 12 ч соответственно. Аналогичные результаты были получены китайскими учёными J. Zhao и соавт. при разработке инактивированной бивалентной вакцины против БН и гриппа птиц H_9N_2 [31].

Заключение

Таким образом, в результате проведения исследований по оптимизации параметров инактивации ВБН было установлено, что наиболее эффективными для инактивации ВБН являются рабочие концентрации формальдегида 0,05 и 0,1% с температурой реакционной среды $37 \pm 0,5$ °С, при которых продолжительность инактивации составляет 18 и 12 ч соответственно.

ЛИТЕРАТУРА

- Lamb R., Parks G. *Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 1449–96.
- Болезнь Ньюкасла; 2020. Available at: <https://eldala.kz/novosti/zerno/2446-padezh-domashnej-pticy-v-akmolinskoj-oblasti-mozhet-byt-svyazan-s-boleznyu-nyukasla>
- Карантин из-за вспышки болезни Ньюкасла; 2018. Available at: <https://inbusiness.kz/ru/last/v-odnom-iz-sel-sko-vveden-karantin-iz-za-vspyshki-bolezni-n>
- Болезнь Ньюкасла зафиксирована в Казахстане; 2019. Available at: <https://kaztag.kz/ru/news/bolezni-nyukasla-zafiksirovana-v-kazakhstan>
- Singh R.K., Dhama K., Chakraborty S., Tiwari R., Natesan S., Khandia R., et al. Nipah virus: epidemiology, pathology, immunobiology and advances in diagnosis, vaccine designing and control strategies – a comprehensive review. *Vet. Q.* 2019; 39(1): 26–55. <https://doi.org/10.1080/01652176.2019.1580827>
- Diel D.G., da Silva L.H., Liu H., Wang Z., Miller P.J., Afonso C.L. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infect. Genet. Evol.* 2012; 12(8): 1770–9. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.012>
- Kapczynski D.R., Afonso C.L., Miller P.J. Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Dev. Comp. Immunol.* 2013; 41(3): 447–53. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.012>
- Alexander D.J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev. Sci. Tech.* 2000; 19(2): 443–62. <https://doi.org/10.20506/rst.19.2.1231>
- Bello M.B., Yusoff K., Ideris A., Hair-Bejo M., Peeters B.P.H., Omar A.R. Diagnostic and vaccination approaches for Newcastle disease virus in poultry: the current and emerging perspectives. *Biomed. Res. Int.* 2018; 2018: 7278459. <https://doi.org/10.1155/2018/7278459>
- Манукян В.А., Джавадов Э.Д., Лаптев Г.Ю., Никонов И.Н., Новикова Н.И., Ильина Л.А. Применение ферментативного пробиотика в кормлении цыплят-бройлеров. *Птица и птицепродукты*. 2013; (5): 022–4. EDN: <https://www.elibrary.ru/renzsh>
- Bell J.A., Sundberg J.P., Ghim S.J., Newsome J., Jenson A.B., Schlegel R. A formalin-inactivated vaccine protects against mucosal papillomavirus infection: a canine model. *Pathobiology*. 1994; 62(4): 194–8. <https://doi.org/10.1159/000163910>
- Mahmoud N.K., El-Deeb A.H., Emar M.M., Abd El-Khalack M.A., Hussein H.A. Genotypes II and VIII-based inactivated Newcastle disease vaccine reduces virus shedding. *Virusdisease*. 2019; 30(3): 453–61. <https://doi.org/10.1007/s13337-019-00537-2>
- Dimitrov K.M., Afonso C.L., Yu Q., Miller P.J. Newcastle disease vaccines – A solved problem or a continuous challenge? *Vet. Microbiol.* 2017; 206: 126–36. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.019>
- Dellue I., Verzele D., Madder A., Nauwynck H.J. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. *Expert. Rev. Vaccines*. 2012; 11(6): 695–719. <https://doi.org/10.1586/erv.12.38>
- Metz B., Kersten G.F., Hoogerhout P., Brugghe H.F., Timmermans H.A., de Jong A., et al. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(8): 6235–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310752200>
- Fraenkel-Conrat H., Mecham D.K. The reaction of formaldehyde with proteins; demonstration of intermolecular cross-linking by means of osmotic pressure measurements. *J. Biol. Chem.* 1949; 177(1): 477–86.
- Kuykendall J.R., Bogdanffy M.S. Efficiency of DNA-histone crosslinking induced by saturated and unsaturated aldehydes in vitro. *Mutat. Res.* 1992; 283(2): 131–6. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(92\)90145-8](https://doi.org/10.1016/0165-7992(92)90145-8)
- Permana P.A., Snapka R.M. Aldehyde-induced protein-DNA crosslinks disrupt specific stages of SV40 DNA replication. *Carcinogenesis*. 1994; 15(5): 1031–6. <https://doi.org/10.1093/carcin/15.5.1031>
- Perrin P., Morgeaux S. Inactivation of DNA by beta-propiolactone. *Biologicals*. 1995; 23(3): 207–11. <https://doi.org/10.1006/biol.1995.0034>
- Uittenbogaard J.P., Zomer B., Hoogerhout P., Metz B. Reactions of beta-propiolactone with nucleobase analogues, nucleosides, and peptides: implications for the inactivation of viruses. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(42): 36198–214. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.279232>
- Aljumaili O.A., Bello M.B., Yeap S.K., Omar A.R., Ideris A. Protective efficacy of inactivated Newcastle disease virus vaccines prepared in two different oil-based adjuvants. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 2020; 87(1): e1–e7. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v87i1.1865>
- King D.J. Evaluation of different methods of inactivation of Newcastle disease virus and avian influenza virus in egg fluids and serum. *Avian. Dis.* 1991; 35(3): 505–14.
- Ашмарин И.П., Васильев Н.Н., Амбросов В.А. *Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов*. Ленинград; 1971.
- Garnier R., Rousselin X., Rosenberg N. Formaldehyde toxicity – A review. *Inst. Nat. Rechi. Stcur.* 1989; 134: 63–85.

25. Gard S., Lycke E. Inactivation of poliovirus by formaldehyde; analysis of inactivation curves. *Arch. Gesamte. Virusforsch.* 1957; 7(5): 471–82. <https://doi.org/10.1007/BF01241963>
26. Gard S. Theoretical considerations in the inactivation of viruses by chemical means. *Ann. NY Acad. Sci.* 1960; 83(4): 638–48. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1960.tb40934.x>
27. Легконогих И.П. Влияние инактиваторов на компонентный состав и свойства вируса ящура: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Владимир; 1984.
28. Михалишина З.Я., Михалишин В.В., Шубин Л.Н. Иммуногенность противоящурных вакцин, концентрированных сорбцией и замораживанием. В кн.: *Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии: тезисы докладов научной конференции ВНИИЯ.* Владимир; 1983: 66–7.
29. Eladaway S.F., El-Bagoury G.F., El-Habbaa A.S., El Mahdy S.S. Evaluation of formaldehyde and binary ethylenimine inactivated Newcastle Disease Virus Vaccine from new isolate compared with imported NDV vaccine. *Benha Vet. Med. J.* 2020; 38(2): 41–6. <http://dx.doi.org/10.21608/bvmj.2020.21635.1148>
30. Jagt H.J., Bekkers M.L., van Bommel S.A., van der Marel P., Schriener C.C. The influence of the inactivating agent on the antigen content of inactivated Newcastle disease vaccines assessed by the in vitro potency test. *Biologicals.* 2010; 38(1): 128–34. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.07.006>
31. Zhao J., Yang H., Xu H., Ma Z., Zhang G. Efficacy of an inactivated bivalent vaccine against the prevalent strains of Newcastle disease and H9N2 avian influenza. *Virol. J.* 2017; 14(1): 56. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0723-7>
13. Dimitrov K.M., Afonso C.L., Yu Q., Miller P.J. Newcastle disease vaccines – A solved problem or a continuous challenge? *Vet. Microbiol.* 2017; 206: 126–36. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.019>
14. Delrue I., Verzele D., Maddier A., Nauwynck H.J. Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges. *Expert. Rev. Vaccines.* 2012; 11(6): 695–719. <https://doi.org/10.1586/erv.12.38>
15. Metz B., Kersten G.F., Hoogerhout P., Brugghe H.F., Timmermans H.A., de Jong A., et al. Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(8): 6235–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310752200>
16. Fraenkel-Conrat H., Mechem D.K. The reaction of formaldehyde with proteins; demonstration of intermolecular cross-linking by means of osmotic pressure measurements. *J. Biol. Chem.* 1949; 177(1): 477–86.
17. Kuykendall J.R., Bogdanffy M.S. Efficiency of DNA-histone cross-linking induced by saturated and unsaturated aldehydes in vitro. *Mutat. Res.* 1992; 283(2): 131–6. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(92\)90145-8](https://doi.org/10.1016/0165-7992(92)90145-8)
18. Permana P.A., Snapka R.M. Aldehyde-induced protein-DNA crosslinks disrupt specific stages of SV40 DNA replication. *Carcinogenesis.* 1994; 15(5): 1031–6. <https://doi.org/10.1093/carcin/15.5.1031>
19. Perrin P., Morgeaux S. Inactivation of DNA by beta-propiolactone. *Biologicals.* 1995; 23(3): 207–11. <https://doi.org/10.1006/biol.1995.0034>
20. Uittenbogaard J.P., Zomer B., Hoogerhout P., Metz B. Reactions of beta-propiolactone with nucleobase analogues, nucleosides, and peptides: implications for the inactivation of viruses. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(42): 36198–214. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.279232>
21. Aljumaili O.A., Bello M.B., Yeap S.K., Omar A.R., Ideris A. Protective efficacy of inactivated Newcastle disease virus vaccines prepared in two different oil-based adjuvants. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 2020; 87(1): e1–e7. <https://doi.org/10.4102/ojvr.v87i1.1865>
22. King D.J. Evaluation of different methods of inactivation of Newcastle disease virus and avian influenza virus in egg fluids and serum. *Avian. Dis.* 1991; 35(3): 505–14.
23. Ashmarin I.P., Vasil'ev N.N., Ambrosov V.A. *Fast Methods of Statistical Processing and Planning of Experiments [Быстрые методы статистической обработки и планирование экспериментов]*. Leningrad; 1971. (in Russian)
24. Garnier R., Rousselin X., Rosenberg N. Formaldehyde toxicity – A review. *Inst. Nat. Rech. Stcur.* 1989; 134: 63–85.
25. Gard S., Lycke E. Inactivation of poliovirus by formaldehyde; analysis of inactivation curves. *Arch. Gesamte. Virusforsch.* 1957; 7(5): 471–82. <https://doi.org/10.1007/BF01241963>
26. Gard S. Theoretical considerations in the inactivation of viruses by chemical means. *Ann. NY Acad. Sci.* 1960; 83(4): 638–48. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1960.tb40934.x>
27. Legkonogikh I.P. *Influence of inactivants on the component composition and properties of the foot and mouth disease virus*: Diss. Vladimir, 1984. (in Russian)
28. Mikhailishina Z.Ya., Mikhailishin V.V., Shubin L.N. Immunogenicity of FMD vaccines concentrated by sorption and freezing. In: *Actual Problems of Veterinary Virology: Abstracts of the Scientific Conference of the VNIYa [Актуальные проблемы ветеринарной вирусологии: тезисы докладов научной конференции ВНИИЯ]*. Vladimir; 1983: 66–7. (in Russian)
29. Eladaway S.F., El-Bagoury G.F., El-Habbaa A.S., El Mahdy S.S. Evaluation of formaldehyde and binary ethylenimine inactivated Newcastle Disease Virus Vaccine from new isolate compared with imported NDV vaccine. *Benha Vet. Med. J.* 2020; 38(2): 41–6. <http://dx.doi.org/10.21608/bvmj.2020.21635.1148>
30. Jagt H.J., Bekkers M.L., van Bommel S.A., van der Marel P., Schriener C.C. The influence of the inactivating agent on the antigen content of inactivated Newcastle disease vaccines assessed by the in vitro potency test. *Biologicals.* 2010; 38(1): 128–34. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.07.006>
31. Zhao J., Yang H., Xu H., Ma Z., Zhang G. Efficacy of an inactivated bivalent vaccine against the prevalent strains of Newcastle disease and H9N2 avian influenza. *Virol. J.* 2017; 14(1): 56. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0723-7>

REFERENCES

1. Lamb R., Parks G. *Paramyxoviridae: The Viruses and Their Replication*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007: 1449–96.
2. Newcastle disease; 2020. Available at: <https://eldala.kz/novosti/zerno/2446-padezh-domashnej-pticy-v-akmolinskoj-oblasti-mozhet-byt-svyazan-s-boleznyu-nyukasla> (in Russian)
3. Quarantine due to the Newcastle disease outbreak; 2018. Available at: <https://inbusiness.kz/ru/last/v-odnom-iz-sel-sko-vveden-karantin-iz-za-vspysyki-bolezni-n> (in Russian)
4. Newcastle disease has been recorded in Kazakhstan; 2019. Available at: <https://kaztag.kz/ru/news/bolezni-nyukasla-zafiksirovana-v-kazakhstan> (in Russian)
5. Singh R.K., Dhama K., Chakraborty S., Tiwari R., Natesan S., Khandia R., et al. Nipah virus: epidemiology, pathology, immunobiology and advances in diagnosis, vaccine designing and control strategies – a comprehensive review. *Vet. Q.* 2019; 39(1): 26–55. <https://doi.org/10.1080/01652176.2019.1580827>
6. Diel D.G., da Silva L.H., Liu H., Wang Z., Miller P.J., Afonso C.L. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infect. Genet. Evol.* 2012; 12(8): 1770–9. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.07.012>
7. Kapczynski D.R., Afonso C.L., Miller P.J. Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Dev. Comp. Immunol.* 2013; 41(3): 447–53. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.04.012>
8. Alexander D.J. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev. Sci. Tech.* 2000; 19(2): 443–62. <https://doi.org/10.20506/rst.19.2.1231>
9. Bello M.B., Yusoff K., Ideris A., Hair-Bejo M., Peeters B.P.H., Omar A.R. Diagnostic and vaccination approaches for Newcastle disease virus in poultry: the current and emerging perspectives. *Biomed. Res. Int.* 2018; 2018: 7278459. <https://doi.org/10.1155/2018/7278459>
10. Manukyan V.A., Dzhavadov E.D., Laptev G.Yu., Nikonov I.N., Novikova N.I., Il'ina L.A. The use of an enzymatic probiotic in feeding broiler chickens. *Ptitsa i ptitseproduktu.* 2013; (5): 22–4. EDN: <https://www.elibrary.ru/renzsh> (in Russian)
11. Bell J.A., Sundberg J.P., Ghim S.J., Newsome J., Jenson A.B., Schlegel R. A formalin-inactivated vaccine protects against mucosal papillomavirus infection: a canine model. *Pathobiology.* 1994; 62(4): 194–8. <https://doi.org/10.1159/000163910>
12. Mahmoud N.K., El-Deeb A.H., Emara M.M., Abd El-Khaleck M.A., Hussein H.A. Genotypes II and VIII-based inactivated Newcastle disease vaccine reduces virus shedding. *Virusdisease.* 2019; 30(3): 453–61. <https://doi.org/10.1007/s13337-019-00537-2>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-164>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023



Антигенная и иммуногенная активность вирусоподобных частиц на основе рекомбинантных главных капсидных белков вирусов геморрагической болезни кроликов (Caliciviridae: *Lagovirus*) геногрупп G11, G12

Мухин А.Н.¹, Алексеев К.П.¹, Южаков А.Г.², Селезнева Е.В.¹, Москвина А.С.³, Верховский О.А.³, Алипер Т.И.¹

¹ООО «Ветбиохим», 105120, г. Москва, Россия;

²ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук», 109428, г. Москва, Россия;

³АНО «Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных», 123098, г. Москва, Россия

Введение. Вирусная геморрагическая болезнь кроликов (ГБК) – остро протекающее высококонтагиозное заболевание, возбудителями которого являются патогенные лаговирuсы геногрупп G11 и G12. Антитела к главному капсидному белку (Vp60) вируса ГБК являются протективными.

Цель работы – оценка антигенной и иммуногенной активности вирусоподобных частиц (ВпЧ) на основе рекомбинантных главных капсидных белков вируса ГБК геногрупп G11 и G12 (recVP60-G11 и recVP60-G12).

Материалы и методы. Полученные в бакуловирусной системе экспрессии recVP60-G11 и recVP60-G12 исследовали методом электронной микроскопии и вводили клинически здоровым кроликам в возрасте 1,5–3 месяца в дозе 50 мкг. На 21-й день после иммунизации кроликов заражали вирулентными штаммами вируса ГБК «Воронежский-87» и «Тула» в дозе 10^3 ЛД₅₀, а сыворотки крови исследовали в ИФА на наличие антител к вирусу ГБК.

Результаты. В культуре клеток Hi-5 получены recVP60-G11 и recVP60-G12, обладающие гемагглютинирующей активностью и формирующие ВпЧ размером 30–40 нм. На 21-е сутки после введения ВпЧ у кроликов выявляли специфические антитела к вирусу ГБК с титром 1 : 200–1 : 800. Иммуногенная активность ВпЧ recVP60-G11 составила 90 и 40%, а ВпЧ recVP60-G12 – 30 и 100% после контрольного заражения вирусом ГБК 1-го и 2-го генотипа соответственно при 100% иммуногенности их смеси.

Обсуждение. ВпЧ из recVP60-G11 и recVP60-G12 обладают гемагглютинирующей, антигенной и иммуногенной активностью, что свидетельствует о возможности их использования в качестве компонентов препаратов для специфической профилактики ВГБК у кроликов. Результаты контрольного заражения показали необходимость наличия в составе вакцины антигена обоих генотипов вируса ГБК.

Заключение. RecVP60-G11 и recVP60-G12 образуют ВпЧ, обладающие гемагглютинирующей и антигенной активностью, и защищают животных при контрольном заражении вирулентными штаммами вируса ГБК генотипов G11 и G12 на уровне 90–100%.

Ключевые слова: ВГБК; VP60; вирусоподобные частицы; рекомбинантные белки; иммунный ответ; иммуногенность; защита

Для цитирования: Мухин А.Н., Алексеев К.П., Южаков А.Г., Селезнева Е.В., Москвина А.С., Верховский О.А., Алипер Т.И. Антигенная и иммуногенная активность вирусоподобных частиц на основе рекомбинантных главных капсидных белков вирусов геморрагической болезни кроликов (Caliciviridae: *Lagovirus*) геногрупп G11, G12. *Вопросы вирусологии.* 2023; 68(2): 132-141. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-164> EDN: <https://elibrary.ru/rswvjz>

Для корреспонденции: Мухин Алексей Николаевич, канд. биол. наук, главный научный сотрудник ООО «Ветбиохим», 109316, г. Москва, Россия. E-mail: amuhin@yahoo.com

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

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии потенциальных конфликтов 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 ООО «Ветбиохим» (протокол № 1 от 13.11.2020).

Поступила 06.02.2023

Принята в печать 04.04.2023

Опубликована 30.04.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-164>

Antigenic and immunogenic activity of virus-like particles based on rabbit hemorrhagic disease virus (Caliciviridae: *Lagovirus*) genotypes GI1 and GI2 recombinant major capsid proteins

Alexey N. Mukhin¹, Konstantin P. Alekseev¹, Anton G. Yuzhakov², Ekaterina V. Selezneva¹, Anna S. Moskvina³, Oleg A. Verkhovskiy³, Taras I. Aliper¹

¹Vetbiochem LLC, 109316, Moscow, Russia;

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

³Research Institute for Diagnosis and Prevention of Human and Animal Diseases, 123098, Moscow, Russia

Introduction. Rabbit hemorrhagic disease is an acute highly contagious infection associated with two genotypes of pathogenic *Lagovirus*. Antibodies to major capsid protein (Vp60) are protective.

The aim of the work – is an evaluation of antigenic and immunogenic activity of virus-like particles (VLPs) based on recombinant major capsid proteins of both genotypes of rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) (recVP60-GI1 and recVP60-GI2).

Materials and methods. Baculovirus-expressed VLPs were evaluated using electron microscopy and administered to clinically healthy 1.5–3 month old rabbits in a dose of 50 µg. Rabbits were challenged with 10³ LD₅₀ of virulent strains “Voronezhsky-87” and “Tula” 21 days post immunization. Serum samples were tested for the presence of RHDV-specific antibodies.

Results. VLPs with hemagglutination activity forming VLP 30–40 nm in size were obtained in Hi-5 cell culture. Specific antibody titers in rabbits measured by ELISA were 1 : 200 to 1 : 800 on 21st day post immunization with VLPs. Immunogenic activity of recVP60-GI1 VLPs was 90 and 40%, while it was 30 and 100% for recVP60-GI2 VLPs after the challenge with RHDV genotypes 1 and 2 respectively. The immunogenicity of two VLPs in mixture reached 100%.

Discussion. VLPs possess hemagglutinating, antigenic and immunogenic activity, suggesting their use as components in substances designed for RHDV specific prophylaxis in rabbits. Results of the control challenge experiment demonstrated the need to include the antigens from both RHDV genotypes in the vaccine.

Conclusion. Recombinant proteins recVP60-GI1 and recVP60-GI2 form VLPs that possess hemagglutinating an antigenic activity, and provide 90–100% level of protection for animals challenged with RHDV GI1 and GI2 virulent strains.

Keywords: RHDV; VP60; virus-like particles; recombinant proteins; immune response; immunogenicity; protection

For citation: Mukhin A.N., Alekseev K.P., Yuzhakov A.G., Selezneva E.V., Moskvina A.S., Verkhovskiy O.A., Aliper T.I. Antigenic and immunogenic activity of virus-like particles based on rabbit hemorrhagic disease virus (Caliciviridae: *Lagovirus*) genotypes GI1 and GI2 recombinant major capsid proteins. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(2): 132-141 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-164> EDN: <https://elibrary.ru/rswvjz>

For correspondence: Aleksey N. Mukhin, Ph.D. (Biol.), Leading Researcher, Vetbiochem LLC, 109316, Moscow, Russia. E-mai: amuhin@yahoo.com

Information about the authors:

Mukhin A.N., <https://orcid.org/0000-0001-7008-5212>

Alekseev K.P., <https://orcid.org/0000-0001-9536-3127>

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

Selezneva E.V., <https://orcid.org/0000-0002-5592-2948>

Moskvina A.S., <https://orcid.org/0000-0002-4542-8196>

Verkhovskiy O.A., <https://orcid.org/0000-0003-0784-9341>

Aliper T.I., <https://orcid.org/0000-0003-2696-1363>

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

Funding. The research was funded by the state budget.

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 Vetbiochem LLC (protocol No. 1 dated from Nov. 13, 2020).

Received 06 February 2023

Accepted 04 April 2023

Published 30 April 2023

Введение

Вирусная геморрагическая болезнь кроликов (ВГБК) – остро протекающая высококонтагиозная болезнь, характеризующаяся явлениями геморрагического диатеза во всех органах, в особенности в лёгких и печени, возбудителями которой являются вирусы, относящиеся к семейству *Caliciviridae*, роду *Lagovirus*. ВГБК является одной из причин, наносящих высокий экономический ущерб кролиководству во всём мире, и эндемичной в Восточной Азии и Европе болезнью [1–7].

В настоящее время выделяют 4 геногруппы лаговировусов: две патогенные – G11 (G11a–G11d) и G12 и две непатогенные – G13 и G14 [8]. Оба патогенных варианта вируса ГБК встречаются на территории РФ [9–11].

Геном вируса представлен линейной молекулой РНК положительной полярности, состоящей из 7437 н.о. Вирусный капсид состоит из главного структурного белка VP60, кодируемого последовательностью нуклеотидов открытой рамки считывания 1 (ORF-1), и минорного белка VP-2.

Единственным методом специфической профилактики болезни является вакцинация кроликов с применением инактивированных тканевых или рекомбинантных вакцин. Вакцинация вызывает у кроликов образование антител к главному капсидному белку (Vp60), которые являются протективными. Несмотря на близкое антигенное родство вирусов, полноценная перекрёстная защита отсутствует, поэтому вакцина должна содержать капсидный антиген вирусов обоих генотипов [12, 13].

Несмотря на то что получение рекомбинантных главных капсидных белков вирусов ГБК и определение их иммуногенной активности были показаны рядом авторов [7, 14–18], коммерчески доступных вакцин на их основе, применяемых на территории РФ, не существует.

Целью данного исследования является оценка антигенной и иммуногенной активности вирусоподобных частиц (ВпЧ) на основе рекомбинантных главных капсидных белков вирусов ГБК геногрупп G11 и G12 (recVP60-G11 и recVP60-G12).

Материалы и методы

Вирусы

В работе использовали:

– 10% суспензию печени кролика, заражённого штаммом «Воронежский-87» вируса ГБК, относящегося к геногруппе G11, с активностью в реакции гемагглютинации 1 : 2048 (10^4 ЛД₅₀/см³);

– 10% суспензию печени кролика, заражённого штаммом «Тула» вируса ГБК, относящегося к геногруппе G12, с активностью в реакции гемагглютинации 1 : 2048 (10^4 ЛД₅₀/см³).

*Получение рекомбинантных вирусов ядерного полиэдроса калифорнийской совки *Autographa californica* (AcNPV) со вставкой ORF-1 вируса ГБК генотипов G11 и G12*

Конструирование векторов, получение рекомбинантных бакуловирусов AcORF-1-G11 и AcORF-1-

G12, оценку и наработку продуктов осуществляли, как описано в предыдущей работе [19].

Фрагмент нуклеотидной последовательности гена ORF-1 вируса ГБК геногруппы G11:

```
GGATCCATGCATCACCCATCACCATCATGGTTCC
GGATCTGGCAGTGGTTCAGGATCTGGTGGCAAGG
CTAGAGCAGTCCCCAAGGTGAGACTGCTGGCA
CCGCTACCACTGCTTCCGCTACCTGGAACCAAC
TGACGGTATGGACCCAGGTGTGGTTGCTACAACC
TCCGTGATCACTGCTGAGAACTCTTCAGCATCCA
TCGCTACCGCTGGTATCGGTGGACCACCTCAGCA
GGTGGACCAACAGGAGACCTGGAGGACCAACTT
CTACTACAACGACGTGTTACCTGGTCTGTGGCT
GACGCTCCTGGTTCATCCTGTACACTGTCCAGC
ACTCTCCACAGAACAATCCCTTCACCGCTGTGTT
GTCCCAGATGTATGCTGGTTGGGCAGGAGGCATG
CAGTTTCGCTTCATCGTGGCTGGTAGTGGTGTGT
TCGGAGGTCTGCTGGTTGCAGCTGTGATTCCTCC
AGGTATCGAGATTGGTCCAGGTCTGGAGGTGCGT
CAGTTCACACACGTCGTGATCGACGCTCGTAGCT
TGGAGCCTGTGACCATCACCATGCCAGACTGCG
TCCCAACATGTACCATCCCACTGGTGACCCCGGT
CTCGTTCACCTGGTGCTGTCCGTGTACAACA
ACCTGATCAATCCCTTTGGAGGTTCCACCTCTGC
CATCCAGGTGACCGTGGAGACACGTCCCTCCGA
GGACTTCGAGTTCGTGATGATCCGTGCTCCAGC
TCCAAGACTGTGGACTCCATCTCTCCTGCTGGTC
TCCTGACCACACCTGTGCTGACCGGTGTTGGAAA
CGACAACCGTTGGAACGGTCAGATCGTTGGTCTG
CAACCAGTTCAGGTGGCTTCTCCACCTGCAACC
GTCACCTGGAACCTGAATGGATCCACCTATGGTTG
GAGCTCACACGCTTCGCTGACATCGACCATCGT
AGAGGTTCTGCTAGCTATCCTGGCAACAATGCAA
CCAACGTGCTGCAGTTCTGGTACGCTAACGCTGG
TTCAGCTATCGACAATCCCATCTCCCAAGTGGCTC
CTGACGGATTTCAGACATGTCTTCGTTCCCTT
CAATGGTCTGGCATTCCTGCTGCAGGTTGGGTT
GGATTTGGTGGCATCTGGAACCTCCAACCTCTGGTG
CTCCCAACGTGACCACTGTGCAAGCCTACGAGC
TTGGCTTTGCCACTGGTGCACCTGGCAACCTGCA
ACCCACTACCAACACCAGTGGTACCAACACCAG
TGGTGCTCAGACTGTGGCCAAGTCCATCTACGCT
GTTGTGACAGGTAAGTGCACAGAATCCAGCTGGA
CTCTTCGTGATGGCTTCTGGCATCATCTCCACCCC
CAACGCTTCTGCTATCACCTACACCCCACAACCT
GACCGCATCGTGAACCTACCCCTGGTACACCTGCAG
TGCACCTGTGGGCAAGAACAACCTCCCATGTT
TGCATCCGCTCGTGAGACGTAACCGGTGACGTGAAC
GCTACCGCTGGATCAGCCAACCGTACTCAGTATG
GTACAGGTTCCCAGCCCTTGCCTGTGACCATGG
TCTGTCCCTCAACAACCTACTCATCTGCTCTGATGC
CAGGTCAGTTCTTCGTGTGGCAGCTGACCTTCGC
TTCTGGCTTCATGGAGATTGGTCTGTCCGTGGAC
GGCTACTTCTATGCAGGAACCTGGTGCTTCCACTA
CCTTGATCGACCTGACCGAGCTGATCGACGTGAG
ACCAGTTGGTCTCGTCCCTCCAAGAGCACTCTG
GTGTTCAACCTGGGAGGTACAGCCAACGGCTTC
TCCTACGTGTAAGCTT.
```

Фрагмент нуклеотидной последовательности гена ORF-1 вируса ГБК геногруппы G12:

ATGCACCACCATCACCACCATGGTAAGGCTCG
TGCTGCTCCACAAGGAGAGACTGCTGGTACTGC
TACCACAGCTTCCGTTCCCTGGCACCCTACAGAT
GGCATGGACCCAGGTGTGGTTGCTACAACCTCA
GTTCGTGACCACTGAGAACGCTTCCACCTCCATT
GCTACCGCTGGTATCGGAGGTCCTCCACAGCAG
GTGGACCAACAGGAGACTTGGCGTACCAACTTC
TACTACAACGACGTGTTACCTGGTTCAGTTGCTG
ACGCTCCTGGTAAACATCCTGTACACTGTGCAGC
ACTCTCCACAGAACAATCCCTTCACTGCTGTGCT
GTCTCAGATGTATGCTGGATGGGCTGGTGGCATG
CAGTTTCGCTTTCATCGTTGCTGGTTCAGGTGTGT
TTGGTGGACGTCTCGTGGCTGCTGTGATTCCTCC
AGGCATCGAGATTGGACCTGGTCTGGAAGTGCG
TCAGTTTCCCTCACGTTGTGATCGATGCTCGCTCC
TTGGAGCCCCTGACCATCACTATGCCCGACCTGC
GTCCCAACATGTACCATCCCCTGGCAACCCTGG
TCTGGTACCCACCTTGGTGTGTCCCGTGTACAAC
AACCTGATCAATCCCTTTGGTGGAAAGCACCTCTG
CTATCCAGGTGACCGTGGAGACCCGTCCTCCCG
AGGACTTCGAGTTCGTGATTCGTTGCTGCTCCAG
CTCCAAGACCGTGGACTCCATCTCCCTGCTGA
CCTCCTGACCACACCAGTGTGCTGACTGGAGTTGG
AACCGACAACAGATGGAACGGTGGAGATCGTTGG
ACTGCAACCAGTTCAGGAGGTTTCTCCACCTG
CAACCGTCACTGGAACCTGAATGGTTCACCTT
CGGATGGTCTCTCCACGCTTCGCTGCTATCGAC
CACGATCGTGGCAATGCTTCCCTTCCCTGGATCAT
CCAGTCCAACGTGCTGGAGTTGTGGTATGCTTC
AGCTGGTTCGCTGCTGACAATCCCATCTCTCAG
ATTGCTCCAGATGGCTTTCCTGACATGTCCTTCG
TACCTTCTCAGGTGCAACCATTCCCCTGCTGG
CTGGGTTGGCTTTGGAGGTATCTGGAACAGCAA
CAACGGTGTCTCCCTTCGTGACCACCGTGCAGGC
TTACGAACTGGGATTCGTAACCGGAGCTCCCTCC
AATCCTCAACCCACTACCAACAACCTCTGGTGCTC
AGATCGTAGCTAAGTCCATCTATGGTGTGGCTAA
CGGTATCAACCAGACCACTGCTGGTCTGTTTCGTG
ATGGCTTCAGGTGTGATCAGCACACCCAACTCCT
CCGCTATCACCTACACTCCTCAACCTAACCGTAT
CGTGAACGCTCCAGGCACACCTGCTGCAGCTCC
CATTGGTAAGAACACACCCATCATGTTTCGCTTCC
GTGGTTCGCTCGCACTGGAGACATCAACGCTGAA
GCTGGTTCACCAACGGAACCTCAGTATGGTGTGCT
GGATCCCAACCATTCCTGTCACTGTGGGACTGT
CCCTGAACAACCTACTCATCTGCTCTGATGCCAGG
TCAGTTCTTCGTGTGGCAGCTGAACCTTTGCTTCC
GGTTTCATGGAACCTCGGTCTGTCCCTGGATGGCT
ACTTCTATGCTGGTACTGGAGCTTCAGCTACCTT
GATCGACCTGTCTGAGCTGGTGGACATTCGTCCT
GTTGGTCCACGTCCTCCACCTCCACCTTGGTCT
ACAACCTCGGAGGCACTACCAACGGATTCTCCT
ACGTGTAA.

*Определение гемагглютинирующей активности
recVP60-G11 и recVP60-G12*

Реакцию гемагглютинации ставили с 0,75% суспензией эритроцитов человека группы О (I группы) в 0,15 М фосфатно-буферного раствора (ФБР) pH 7,2 микрометодом на полистироловых планшетах с U-образным дном

по общепринятой методике. В качестве положительного контроля использовали 10% суспензию печени кролика, заражённого штаммом вируса ГБК «Воронежский-87», и 10% суспензию печени кролика, заражённого штаммом вируса ГБК «Тула». В качестве отрицательного контроля использовали 10% печень от заведомо здорового кролика и лизат культуры клеток Hi-5, инфицированные AcNPV без вставки. За титр принимали максимальное разведение АГ, дающее гемагглютинацию.

Электронная микроскопия

На электронно-микроскопическую медную сетку, покрытую парлодиевой плёнкой, наносили 5 мкл раствора смеси 1 : 1 очищенных гесVP60-G11 и гесVP60-G12 в концентрации 10 мг/мл по общему белку в 0,15 М ФБР (pH 7,2), отмывали водой от несвязавшихся компонентов и окрашивали 1% водным раствором уранилацетата (pH 4,5). Образцы просматривали с помощью электронного микроскопа просвечивающего типа HT7700 (Hitachi, Япония).

Определение антигенной активности

Антигенную активность ВпЧ на основе рекомбинантных белков исследовали на клинически здоровых кроликах возраста 1,5–3,0 месяца. В исследовании использовали 4 группы животных по 20 голов в каждой. Первой группе животных внутримышечно вводили гесVP60-G11 в дозе 50 мкг, 2-й группе – гесVP60-G12 в дозе 50 мкг, 3-й группе – смесь 25 мкг гесVP60-G11 и 25 мкг гесVP60-G12, а животных 4-й группы не вакцинировали. Сыворотки крови кроликов, взятые до иммунизации и на 21-й день после неё, исследовали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с целью выявления специфических антител к вирусу ГБК. ИФА ставили, как описано в работе [20].

Определение иммуногенной активности

На 21-е сутки после иммунизации кроликов заражали вирулентными штаммами «Воронежский-87» вируса ГБК генотипа G11 (50% животных) и «Тула» вируса ГБК генотипа G12 (50% животных) в дозе 10^3 ЛД₅₀. Наблюдение за животными проводили в течение 7 дней после заражения: отмечали гибель и появление клинических признаков. От погибших животных отбирали печень, сердце, селезёнку, лёгкие и почки для исследования с помощью ПЦР-РВ (полимеразная цепная реакция в реальном времени) с целью обнаружения РНК вируса ГБК. На 7-е сутки все выжившие животные были подвергнуты эвтаназии, пробы паталогического материала также исследовали с применением ПЦР-РВ.

Иммуногенную активность гесVP60 для кроликов вычисляли по формуле (1):

$$IA = (ЛК - ЛИ) / ЛК \times 100\%, \quad (1)$$

где IA – иммуногенная активность; ЛК – летальность в контрольной группе (%); ЛИ – летальность среди иммунизированных животных (%).

ПЦР-РВ

Для выделения тотальной РНК готовили 10% суспензии из образцов печени кроликов, полученные

путём гомогенизации проб в стерильном ФБР и далее подвергшиеся центрифугированию при 13 200 об/мин в течение 5 мин. Суммарную РНК экстрагировали из каждой ткани кроликов с TRIzol (Invitrogen) согласно протоколу производителя. Наличие РНК вируса ГБК определяли методом ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) с использованием универсальной пары праймеров, разработанных М. Pawlikowska и соавт. [21]. Для дифференциации вирусов второго генотипа использовали ОТ-ПЦР в РВ, описанную у К.Р. Dalton и соавт. [22]. ОТ-ПЦР проводили с помощью набора One-tube real-time RT-PCR kit («Альфа Фермент», Россия).

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 ООО «Ветбиохим» (протокол № 1 от 13.11.2020).

Результаты

В результате проведённых работ были получены рекомбинантные вирусы ядерного полиодроза калифорнийской совки *Autographa californica* (AcNPV) со вставкой ORF-1 вируса ГБК генотипа G11 (AcORF-1-G11) и генотипа G12 (AcORF-1-G12).

При заражении культуры клеток Sf-9 рекомбинантными бакуловirusами на 3–4-е сутки после заражения отмечали цитопатические изменения в инфицированных культурах. Титрование полученных вирусосодержащих суспензий методом бляшкообра-

зования показало наличие рекомбинантных бакуловirusов AcORF-1-G11 и AcORF-1-G12 в титрах – $10^{5,0}$ – $10^{5,5}$ БОЕ₅₀/см³.

При заражении культуры клеток Hi-5 рекомбинантными бакуловirusами со множественностью 0,1 БОЕ₅₀/клетка отмечали экспрессию *recVP60-G11* и *recVP60-G12*. После очистки 1 г клеточных осадков было получено 5 мл препарата *recVP60-G11* с концентрацией общего белка 20 мг/мл и 4 мл препарата *recVP60-G12* с концентрацией общего белка 18 мг/мл.

Гемагглютинирующая активность очищенных препаратов *recVP60-G11* и *recVP60-G12* с концентрацией 50 мкг/мл в ФБР составила 1 : 32 000.

В 0,15 М ФБР с pH 7,2–7,4 рекомбинантные белки образовывали ВпЧ. В растворах *recVP60-G11*, *recVP60-G12* и их смеси 1 : 1 с концентрацией по общему белку 10 мг/мл при проведении электронной микроскопии наблюдали ВпЧ размером 30–40 нм (**рисунок**).

До вакцинации животные были серонегативны в отношении вируса ГБК: уровень антител в ИФА составил < 1 : 200 (1 : 200 – минимальное разведение сыворотки, используемое в тест-системе ИФА).

На 21-е сутки после однократного введения ВпЧ с содержанием 50 мкг рекомбинантных капсидных белков у всех иммунизированных кроликов наблюдался синтез специфических антител к главным капсидным белкам вируса ГБК. Уровень антител составил 1 : 200–1 : 800, у кроликов контрольной группы сероконверсии не наблюдалось (**табл. 1, 2**).

После контрольного заражения вирулентным штаммом вируса ГБК 1-го генотипа «Воронежский-87» выжили 9 из 10 животных, иммунизированных

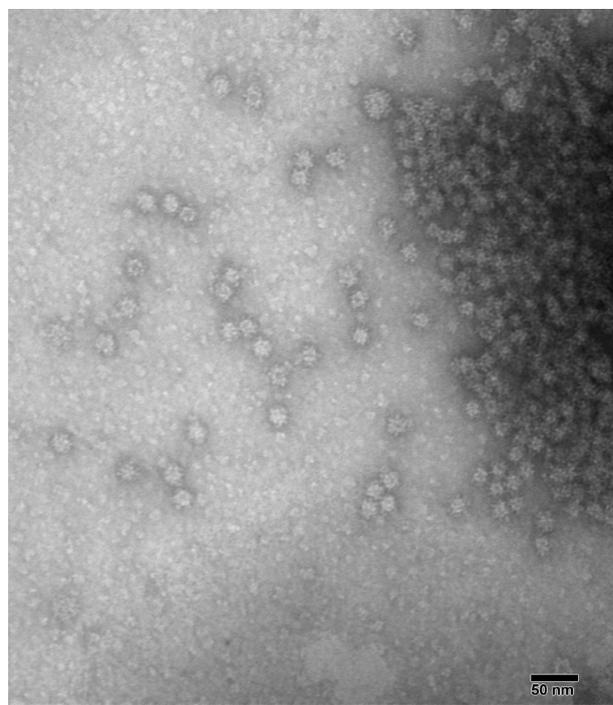
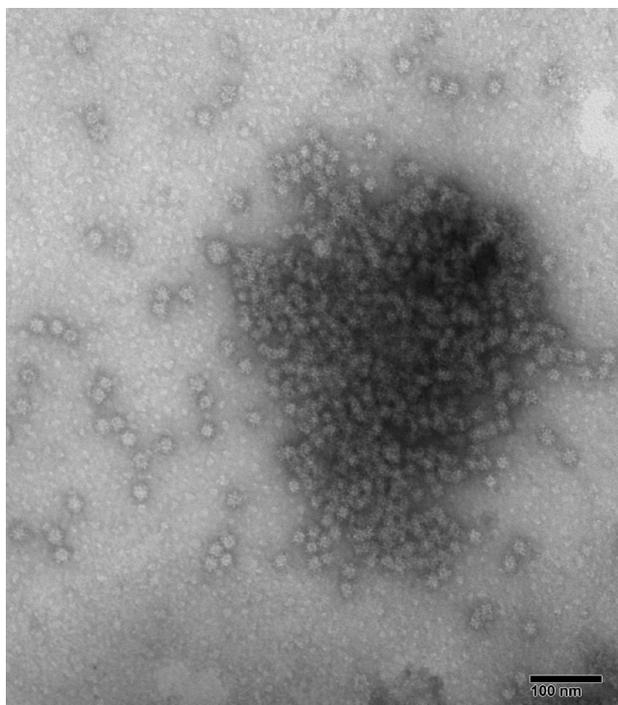


Рис. Электронно-микроскопическое изображение вирусоподобных частиц *recVP60*.

Fig. Transmission electron microscopy images of *recVP60* virus-like particles.

Таблица 1. Результаты контрольного заражения кроликов вирулентным штаммом вируса геморрагической болезни кроликов GI1
Table 1. Results of the challenge experiment with virulent rabbit hemorrhagic disease virus GI1

Группа Group	№ животного Animal No.	Титр антител в ИФА Antibody titer in ELISA	Результаты ПЦР PCR results	Результат контрольного заражения 10 ³ ЛД ₅₀ «Воронежский-87» Results of challenge with 10 ³ LD ₅₀ of "Voronezsky-87" strain	
Вирусоподобные частицы Virus-like particles Rec VP60-GI.1	1	1 : 400	–	жив	
	2	1 : 400	–	жив	
	3	1 : 800	–	жив	
	4	1 : 400	–	жив	
	5	1 : 200	–	жив	
	6	1 : 200	+	пал	
	7	1 : 400	–	жив	
	8	1 : 400	–	жив	
	9	1 : 800	–	жив	
	10	1 : 400	–	жив	
	Всего пало/выжило Total died/survived			1	9
Летальность 10% Mortality 10%			Иммуногенная активность 90% Immunogenic activity 90%		
Вирусоподобные частицы Virus-like particles Rec VP60-GI.2	1	1 : 400	+	пал	
	2	1 : 400	+	пал	
	3	1 : 800	+	пал	
	4	1 : 200	+	пал	
	5	1 : 400	–	жив	
	6	1 : 200	+	пал	
	7	1 : 400	+	пал	
	8	1 : 400	+	пал	
	9	1 : 400	–	жив	
	10	1 : 800	–	жив	
	Всего пало/выжило Total died/survived			7	3
Летальность 70% Mortality 70%			Иммуногенная активность 30% Immunogenic activity 30%		
Вирусоподобные частицы Virus-like particles Rec VP60-GI.1 + Rec VP60-GI.2	1	1 : 800	–	жив	
	2	1 : 800	–	жив	
	3	1 : 800	–	жив	
	4	1 : 200	+	пал	
	5	1 : 400	–	жив	
	6	1 : 200	–	жив	
	7	1 : 400	–	жив	
	8	1 : 400	–	жив	
	9	1 : 800	–	жив	
	10	1 : 400	–	жив	
	Всего пало/выжило Total died/survived			1	9
Летальность 10% Mortality 10%			Иммуногенная активность 90% Immunogenic activity 90%		
Контрольная группа (не иммунизиро- вали) Control group (non-immunized)	1	< 1 : 200	+	+	пал
	2	< 1 : 200	+	+	пал
	3	< 1 : 200	+	+	пал
	4	< 1 : 200	+	+	пал
	5	< 1 : 200	+	+	пал
	6	< 1 : 200	+	+	пал
	7	< 1 : 200	+	+	пал
	8	< 1 : 200	+	+	пал
	9	< 1 : 200	+	+	пал
	10	< 1 : 200	+	+	пал
	Всего пало/выжило Total died/survived			10	0
Летальность 100% Mortality 100%					

Таблица 2. Результаты контрольного заражения кроликов вирулентным штаммом вируса геморрагической болезни кроликов GI2
Table 2. Results of the challenge experiment with virulent rabbit hemorrhagic disease virus GI2

Группа Group	№ животного Animal No.	Титр антител в ИФА Antibody titer in ELISA	Результаты ПЦР PCR results	Результат контрольного заражения 10 ³ ЛД ₅₀ «Тула» Results of challenge with 10 ³ LD ₅₀ of «Tula» strain	
Вирусоподобные частицы Virus-like particles Rec VP60-GI.1	1	1 : 400	–	жив	
	2	1 : 400	+	пал	
	3	1 : 800	–	жив	
	4	1 : 400	+	пал	
	5	1 : 400	–	жив	
	6	1 : 200	+	пал	
	7	1 : 400	+	пал	
	8	1 : 200	+	пал	
	9	1 : 800	–	жив	
	10	1 : 400	+	пал	
	Всего пало/выжило Total died/survived			6	4
Летальность 60% Mortality 60%			Иммуногенная активность 40% Immunogenic activity 40%		
Вирусоподобные частицы Virus-like particles Rec VP60-GI.2	1	1 : 400	–	жив	
	2	1 : 400	–	жив	
	3	1 : 800	–	жив	
	4	1 : 200	–	жив	
	5	1 : 400	–	жив	
	6	1 : 200	–	жив	
	7	1 : 400	–	жив	
	8	1 : 400	–	жив	
	9	1 : 400	–	жив	
	10	1 : 800	–	жив	
	Всего пало/выжило Total died/survived			0	10
Летальность 0% Mortality 0%			Иммуногенная активность 100% Immunogenic activity 100%		
Вирусоподобные частицы Virus-like particles Rec VP60-GI.1 + Rec VP60-GI.2	1	1 : 800	–	жив	
	2	1 : 800	–	жив	
	3	1 : 800	–	жив	
	4	1 : 200	–	жив	
	5	1 : 400	–	жив	
	6	1 : 200	–	жив	
	7	1 : 400	–	жив	
	8	1 : 400	–	жив	
	9	1 : 800	–	жив	
	10	1 : 400	–	жив	
	Всего пало/выжило Total died/survived			0	10
Летальность 0% Mortality 0%			Иммуногенная активность 100% Immunogenic activity 100%		
Контрольная группа (не иммунизировали) Control group (non-im- munized)	1	< 1 : 200	+	+	пал
	2	< 1 : 200	+	+	пал
	3	< 1 : 200	+	+	пал
	4	< 1 : 200	+	+	пал
	5	< 1 : 200	+	+	пал
	6	< 1 : 200	+	+	пал
	7	< 1 : 200	–	–	жив
	8	< 1 : 200	+	+	пал
	9	< 1 : 200	+	+	пал
	10	< 1 : 200	+	+	пал
	Всего пало/выжило Total died/survived			9	1
Летальность 90% Mortality 90%					

гесVP60-GI1 и смесью гесVP60-GI1 и гесVP60-GI2 (иммуногенная активность 90%, летальность 10%) Иммуногенная активность гесVP60-GI2 составила 30%, т.е. из 10 иммунизированных кроликов выжило 3 (летальность 70%). При этом в контрольной группе отмечалась 100% летальность.

После контрольного заражения вирулентным штаммом вируса ГБК 2-го генотипа «Тула» выжили все животные, иммунизированные гесVP60-GI2 и смесью гесVP60-GI1 и гесVP60-GI2 (иммуногенная активность 100%), иммуногенная активность гесVP60-GI1 составила 40%. В контрольной группе отмечалась 90% летальность.

Гибель кроликов наступала в течение 12–72 ч после заражения. У всех погибших кроликов в образцах патологического материала из печени, сердца, селезенки, почек и лёгких методом ПЦР был обнаружен генетический материал вируса ГБК генотипа, соответствующего вирусу, использованному для контрольного заражения.

У всех выживших кроликов, подвергнутых эвтаназии на 7-е сутки после заражения, в образцах патологического материала из печени, сердца, селезенки, почек и лёгких методом ПЦР генетического материал вируса ГБК обнаружено не было (табл. 1, 2).

Обсуждение

Как и нативные лаговирuсы, очищенные препараты гесVP60-GI1 и гесVP60-GI2 и их смесь обладали гемагглютинирующей активностью, что говорило о возможности образования молекулами гесVP60 в 0,15 М растворе ФБР ВпЧ. Электронная микроскопия показала наличие ВпЧ размером около 30–40 нм. Структуры, состоящие из рекомбинантных VP60, напоминали капсид калицивирусов.

Изучение антигенной активности полученных на основе гесVP60-GI.1 и гесVP60-GI.2 ВпЧ показало, что введение кроликам ВпЧ из белка как одного варианта, так и их смеси, вызывает синтез специфических антител. На 21-е сутки после введения рекомбинантных капсидных белков у всех иммунизированных животных уровень антител в ИФА стал 1 : 200 и выше.

Наличие антигенных свойств у ВпЧ на основе рекомбинантных главных капсидных белков открывает широкие перспективы использования их в качестве компонентов препаратов для специфической профилактики ВГБК у кроликов.

Результаты контрольного заражения показали разницу в иммуногенности ВпЧ на основе рекомбинантных белков при заражении вирусами разных генотипов. Иммуногенная активность против гетерологичного вируса не превышала 40%, тогда как при использовании вируса такого же генотипа или в случае иммунизации кроликов ВпЧ на основе смеси рекомбинантных белков иммуногенная активность была 90–100%. Данные результаты хорошо соотносятся с ранее известным феноменом – ограниченной защитой кроликов, вакцинированных вакцинами против ВГБК, изготовленных на основе штаммов 1-го генотипа, при заражении лаговирuсами 2-го генотипа [12, 13].

Учитывая высокое антигенное родство лаговирuсов 1-го и 2-го генотипов и то, что использованная нами тест-система ИФА не позволяла дифференцировать антитела к капсидным белкам разных генотипов вируса ГБК, связь между уровнем антител и способностью животных противостоять контрольному заражению оценивали только для кроликов иммунизированных монопрепаратами.

Проводимые серологические исследования показали, что выжили все кролики, имевшие до контрольного заражения уровень антител к вирусу ГБК 1 : 400 и выше.

Среди животных, иммунизированных ВпЧ на основе гесVP60-GI.1 и заражённых вирусом ГБК 1-го генотипа, два кролика на момент заражения имели антитела на уровне 1 : 200. Из них пал только один. В группе, иммунизированной ВпЧ на основе гесVP60-GI.2 и заражённой вирусом ГБК 2-го генотипа, оба кролика с титром антител 1 : 200 выжили. При этом вирулентность в контрольной группе, заражённой вирусом ГБК 1-го генотипа, была в целом выше вирулентности в контрольной группе, заражённой вирусом ГБК 2-го генотипа.

Заключение

Таким образом, полученные в бакуловирусной системе экспрессии генов главные капсидные белки вируса ГБК генотипов GI.1 и GI.2 в 0,15 М ФБР с pH 7,2–7,4 образуют ВпЧ. Их введение как в моновариантах, так и в смеси вызывает у кроликов синтез специфических антител и защищает животных при контрольном заражении вирулентными штаммами «Воронежский-87» вируса ГБК генотипа GI1 и «Тула» вируса ГБК генотипа GI2 в дозе 10^3 ЛД₅₀ на уровне 90–100%. Уровень специфических антител к вирусу ГБК в ИФА 1 : 400 и выше защищает при контрольном заражении 100% животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Liu S.J., Xue H.P., Pu B.Q., Quian N.H. A new viral disease in rabbits. *Anim. Husb. Vet. Med.* 1984; 16(6): 253–5.
2. Mitro S., Krauss H. Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology. *Eur. J. Epidemiol.* 1993; 9(1): 70–8. <https://doi.org/10.1007/bf00463093>
3. Puggioni G., Cavadini P., Maestrone C., Scivoli R., Botti G., Ligios C., et al. The new French 2010 Rabbit Hemorrhagic Disease Virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). *Vet. Res.* 2013; 44(1): 96. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-96>
4. Abrantes J., Lopes A.M., Dalton K.P., Melo P., Correia J.J., Ramada M., et al. New variant of rabbit hemorrhagic disease virus, Portugal, 2012–2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(11): 1900–1902. <https://doi.org/10.3201/eid1911.130908>
5. Dalton K.P., Nicieza I., Abrantes J., Esteves P.J., Parra F. Spread of new variant RHDV in domestic rabbits on the Iberian Peninsula. *Vet. Microbiol.* 2014; 169(1–2): 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.12.015>
6. Duarte M., Henriques M., Barros S.C., Fagulha T., Ramos F., Luis T., et al. Detection of RHDV variant 2 in domestic rabbits in Azores. *Vet. Rec.* 2015; 176(19): 499–500. <https://doi.org/10.1136/vr.h2402>
7. OIE. Rabbit Haemorrhagic Disease. USA; 2020. Available at: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?page_refer=MapEventSummary&reportid=34728

8. Le Pendu J., Abrantes J., Bertagnoli S., Guitton J.S., Le Gall-Reculé G., Lopes A.M., et al. Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses. *J. Gen. Virol.* 2017; 98(7): 1658–66. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000840>
9. Мухин А.Н., Южаков А.Г., Селезнева Е.В., Дроздова Е.И., Верховский О.А., Алипер Т.И. Вспышка заболевания, вызванная вирусом геморрагической болезни кроликов 2-го генотипа на территории РФ. *Аграрная наука.* 2021; (4): 25–7. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-348-4-25-27> EDN: <https://www.elibrary.ru/ynmqnh>
10. Burmakina G., Malogolovkina N., Lunitsin A., Titov I., Tsybanov S., Malogolovkin A. Comparative analysis of rabbit hemorrhagic disease virus strains originating from outbreaks in the Russian Federation. *Arch. Virol.* 2016; 161(7): 1973–9. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2864-1>
11. ФГБНУ ФИЦВиМ. Третий случай обнаружения вируса геморрагической болезни кроликов нового типа – ВГБК-2 в Российской Федерации. Available at: <https://ficvim.ru/2019/02/tretij-sluchaj-obnaruzheniya-virusa-gemorragicheskoy-bolezni-krolikov-novogo-tipa-vgbk-2-v-rossijskoj-federacii/> (in Russian)
12. Le Gall-Recule G., Lavazza A., Marchandeu S., Bertagnoli S., Zwingelstein F., Cavadini P., et al. Emergence of a new lagovirus related to Rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet. Res.* 2013; 44(1): 81. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-81>
13. Peacock D., Kovaliski J., Sinclair R., Mutze G., Iannella A., Capucci L. RHDV2 overcoming RHDV immunity in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Australia. *Vet. Rec.* 2017; 180(11): 280. <https://doi.org/10.1136/vr.104135>
14. Власова Н.Н., Власов Н.А., Алексеев К.П. Конструирование плазмидного вектора, экспрессирующего VP60 вируса геморрагической болезни кроликов. *Ветеринария.* 2006; (11): 53–5. <https://www.elibrary.ru/hvjxut>
15. Gromadzka B., Szewczyk B., Konopa G., Fitzner A., Kesy A. Recombinant VP60 in the form of virion-like particles as a potential vaccine against rabbit hemorrhagic disease virus. *Acta Biochim. Pol.* 2006; 53(2): 371–6.
16. Guo H., Zhu J., Tan Y., Li C., Chen Z., Sun S., et al. Self-assembly of virus-like particles of rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in *Escherichia coli* and their immunogenicity in rabbits. *Antiviral Res.* 2016; 131: 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.04.011>
17. López-Vidal J., Gómez-Sebastián S., Bárcena J., Nuñez Mdel C., Martínez-Alonso D., Dudognon B., et al. Improved production efficiency of virus-like particles by the baculovirus expression vector system. *PLoS One.* 2015; 10(10): e0140039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140039>
18. Qi R., Miao Q., Zhu J., Tang J., Tang A., Wang X., et al. Construction and immunogenicity of novel bivalent virus-like particles bearing VP60 genes of classic RHDV(GL1) and RHDV2(GL2). *Vet. Microbiol.* 2020; 240: 108529. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108529>
19. Алексеев К.П., Москвина А.С., Верховский О.А., Селезнева Е.В., Черных О.Ю., Мухин А.Н. Получение рекомбинантного капсидного белка VP60 вируса геморрагической болезни кроликов и изучение его антигенной и иммуногенной активности. *Ветеринария Кубани.* 2020; (5): 34–7. <https://doi.org/10.33861/2071-8020-2020-5-34-37> EDN: <https://www.elibrary.ru/vxgzjm>
20. Selezneva E.V., Mukhin A.N., Ezdakova I.Yu., Verkhovskiy O.A., Aliper T.I. The application of recombinant Vp60-based ELISA for haemorrhagic disease virus antibody detection to vaccination against RHD. *AIP Conf. Proc.* 2022; 2467: 070028-1–070028-5. <https://doi.org/10.1063/5.0092529>
21. Pawlikowska M., Hukowska-Szematowicz B., Deptuła W. Phylogenetic analysis of selected strains of Rabbit haemorrhagic disease virus on the basis of N-terminal fragment of the gene encoding structural protein VP60. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 2010; 54: 129–33.
22. Dalton K.P., Arnal J.L., Benito A.A., Chacón G., Martín Alonso J.M., Parra F. Conventional and real time RT-PCR assays for the detection and differentiation of variant rabbit hemorrhagic disease virus (RHDVb) and its recombinants. *J. Virol. Methods.* 2018; 251: 118–22. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.10.009>

REFERENCES

1. Liu S.J., Xue H.P., Pu B.Q., Quian N.H. A new viral disease in rabbits. *Anim. Husb. Vet. Med.* 1984; 16(6): 253–5.
2. Mitro S., Krauss H. Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology. *Eur. J. Epidemiol.* 1993; 9(1): 70–8. <https://doi.org/10.1007/bf00463093>
3. Puggioni G., Cavadini P., Maestrale C., Scivoli R., Botti G., Ligios C., et al. The new French 2010 Rabbit Hemorrhagic Disease Virus causes an RHD-like disease in the Sardinian Cape hare (*Lepus capensis mediterraneus*). *Vet. Res.* 2013; 44(1): 96. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-96>
4. Abrantes J., Lopes A.M., Dalton K.P., Melo P., Correia J.J., Ramada M., et al. New variant of rabbit hemorrhagic disease virus, Portugal, 2012–2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(11): 1900–1902. <https://doi.org/10.3201/eid1911.130908>
5. Dalton K.P., Nicieza I., Abrantes J., Esteves P.J., Parra F. Spread of new variant RHDV in domestic rabbits on the Iberian Peninsula. *Vet. Microbiol.* 2014; 169(1–2): 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.12.015>
6. Duarte M., Henriques M., Barros S.C., Fagulha T., Ramos F., Luis T., et al. Detection of RHDV variant 2 in domestic rabbits in Azores. *Vet. Rec.* 2015; 176(19): 499–500. <https://doi.org/10.1136/vr.h2402>
7. OIE. Rabbit Haemorrhagic Disease. USA; 2020. Available at: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Review/report/Review?page_refer=MapEventSummary&reportid=34728
8. Le Pendu J., Abrantes J., Bertagnoli S., Guitton J.S., Le Gall-Reculé G., Lopes A.M., et al. Proposal for a unified classification system and nomenclature of lagoviruses. *J. Gen. Virol.* 2017; 98(7): 1658–66. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000840>
9. Mukhin A.N., Yuzhakov A.G., Selezneva E.V., Drozdova E.I., Verkhovskiy O.A., Aliper T.I. Outbreak of the disease caused by the rabbit hemorrhagic disease virus 2 in the Russian Federation. *Agrarnaya nauka.* 2021; (4): 25–7. <https://doi.org/10.32634/0869-8155-2021-348-4-25-27> EDN: <https://www.elibrary.ru/ynmqnh> (in Russian)
10. Burmakina G., Malogolovkina N., Lunitsin A., Titov I., Tsybanov S., Malogolovkin A. Comparative analysis of rabbit hemorrhagic disease virus strains originating from outbreaks in the Russian Federation. *Arch. Virol.* 2016; 161(7): 1973–9. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-2864-1>
11. Federal Research Center for Virology and Microbiology. The third case of detection of a new type of rabbit hemorrhagic disease virus – VGBK-2 in the Russian Federation. Available at: <https://ficvim.ru/2019/02/tretij-sluchaj-obnaruzheniya-virusa-gemorragicheskoy-bolezni-krolikov-novogo-tipa-vgbk-2-v-rossijskoj-federacii/> (in Russian)
12. Le Gall-Recule G., Lavazza A., Marchandeu S., Bertagnoli S., Zwingelstein F., Cavadini P., et al. Emergence of a new lagovirus related to Rabbit haemorrhagic disease virus. *Vet. Res.* 2013; 44(1): 81. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-81>
13. Peacock D., Kovaliski J., Sinclair R., Mutze G., Iannella A., Capucci L. RHDV2 overcoming RHDV immunity in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) in Australia. *Vet. Rec.* 2017; 180(11): 280. <https://doi.org/10.1136/vr.104135>
14. Vlasova N.N., Vlasov N.A., Alekseev K.P. Construction of plasmid vector of expressing virus of haemorrhagic disease of rabbits. *Veterinariya.* 2006; (11): 53–5. <https://www.elibrary.ru/hvjxut> (in Russian)
15. Gromadzka B., Szewczyk B., Konopa G., Fitzner A., Kesy A. Recombinant VP60 in the form of virion-like particles as a potential

- vaccine against rabbit hemorrhagic disease virus. *Acta Biochim. Pol.* 2006; 53(2): 371–6.
16. Guo H., Zhu J., Tan Y., Li C., Chen Z., Sun S., et al. Self-assembly of virus-like particles of rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in *Escherichia coli* and their immunogenicity in rabbits. *Antiviral Res.* 2016; 131: 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.04.011>
 17. López-Vidal J., Gómez-Sebastián S., Bárcena J., Nuñez Mdel C., Martínez-Alonso D., Dudognon B., et al. Improved production efficiency of virus-like particles by the baculovirus expression vector system. *PLoS One.* 2015; 10(10): e0140039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140039>
 18. Qi R., Miao Q., Zhu J., Tang J., Tang A., Wang X., et al. Construction and immunogenicity of novel bivalent virus-like particles bearing VP60 genes of classic RHDV(GI.1) and RHDV2(GI.2). *Vet. Microbiol.* 2020; 240: 108529. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108529>
 19. Alekseev K.P., Moskvina A.S., Verkhovskiy O.A., Selezneva E.V., Chernykh O.Yu., Mukhin A.N. Obtaining recombinant capsid protein VP60 of rabbit haemorrhagic disease virus and its antigenic and immunogenic activity study. *Veterinariya Kubani.* 2020; (5): 34–7. <https://doi.org/10.33861/2071-8020-2020-5-34-37> EDN: <https://www.elibrary.ru/vxzgjm> (in Russian)
 20. Selezneva E.V., Mukhin A.N., Ezdakova I.Yu., Verkhovsky O.A., Aliper T.I. The application of recombinant Vp60-based ELISA for haemorrhagic disease virus antibody detection to vaccination against RHD. *AIP Conf. Proc.* 2022; 2467: 070028-1–070028-5. <https://doi.org/10.1063/5.0092529>
 21. Pawlikowska M., Hukowska-Szematowicz B., Deptuła W. Phylogenetic analysis of selected strains of Rabbit haemorrhagic disease virus on the basis of N-terminal fragment of the gene encoding structural protein VP60. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 2010; 54: 129–33.
 22. Dalton K.P., Arnal J.L., Benito A.A., Chacón G., Martín Alonso J.M., Parra F. Conventional and real time RT-PCR assays for the detection and differentiation of variant rabbit hemorrhagic disease virus (RHDVb) and its recombinants. *J. Virol. Methods.* 2018; 251: 118–22. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.10.009>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-167>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023



Циркуляция вирусов герпеса крупного рогатого скота (Herpesviridae: *Varicellovirus*) и диареи крупного рогатого скота (Flaviviridae: *Pestivirus*) среди диких парнокопытных животных Московской области

Пчельников А.В.^{1,2}, Яцентюк С.П.^{1,2}, Красникова М.С.¹

¹ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору (Россельхознадзор), 123022, г. Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, 109472, г. Москва, Россия

Введение. Пестивирусы и вирусы семейства Herpesviridae широко распространены среди разных видов копытных, однако основная информация об этих возбудителях связана с их влиянием на сельскохозяйственных животных. Данные о случаях выявления вирусов диареи (BVDV) и герпеса крупного рогатого скота (КРС) у диких копытных, полученные в разных странах в последние годы, ставят вопрос о роли диких животных в эпизоотологии болезней КРС.

Цель работы – изучение распространённости герпесвирусов и пестивирусов в популяции диких парнокопытных Московской области.

Материалы и методы. Образцы паренхиматозных органов и смывы со слизистых от 124 диких парнокопытных (лосей и косуль), добытых в рамках спортивной и любительской охоты сезонов 2019–2022 гг. на территории Московской области, исследовали молекулярно-генетическими (ПЦР) и серологическими методами на наличие генетического материала и антител к возбудителям инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи КРС.

Результаты. Генетический материал BVDV выявили в образце от одного лося, ДНК герпесвирусов КРС – в образцах от 3 косуль и 2 лосей, отстрелянных на территории Московской области. Антитела к вирусам находили у животных разного пола и возраста, общая серопревалентность диких парнокопытных к герпесвирусам и пестивирусам составила 46 и 29% соответственно.

Заключение. Дикие жвачные парнокопытные Московской области могут быть естественным резервуаром герпесвирусов КРС, и это необходимо учитывать при планировании и организации мероприятий по контролю и оздоровлению территории от инфекционного ринотрахеита КРС. Случаи инфицирования диких парнокопытных животных BVDV носят менее распространённый характер, поэтому для окончательного установления их роли в эпизоотологии этой болезни у КРС необходимы дополнительные исследования.

Ключевые слова: вирус диареи крупного рогатого скота; BVDV; вирус герпеса крупного рогатого скота; ВоHV; дикие копытные; ПЦР; антитела

Для цитирования: Пчельников А.В., Яцентюк С.П., Красникова М.С. Циркуляция вирусов герпеса крупного рогатого скота (Herpesviridae: *Varicellovirus*) и диареи крупного рогатого скота (Flaviviridae: *Pestivirus*) среди диких парнокопытных животных Московской области. *Вопросы вирусологии.* 2023; 68(2): 142–151. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-167> EDN: <https://elibrary.ru/dtkibo>

Для корреспонденции: Пчельников Александр Владимирович, канд. вет. наук, доцент кафедры эпизоотологии и организации ветеринарного дела, ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, 109472, г. Москва, Россия. E-mail: vetdr-mom@list.ru

Участие авторов: Пчельников А.В. – проведение исследований, подбор литературы, подготовка иллюстративного материала, написание текста статьи; Яцентюк С.П. – общее руководство, подбор литературы, научное редактирование, написание текста статьи; Красникова М.С. – проведение исследований.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 22-26-00093, <https://rscf.ru/project/22-26-00093/>)

Благодарности. Авторы выражают искреннюю благодарность коллективу Государственной ветеринарной службы Московской области за помощь в проведении отбора проб патологического материала животных. Отдельная признательность выражается специалисту ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» К.Г. Долинской за помощь в подготовке образцов и заместителю директора ФГБУ «Центр ветеринарии» к.б.н. А.Е. Гогину за консультации по оформлению карт, опубликованных в статье.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (Протокол № 125 от 16 апреля 2020 г.).

Поступила 03.03.2023

Принята в печать 17.04.2023

Опубликована 30.04.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-167>

Circulation of bovine herpesvirus (Herpesviridae: *Varicellovirus*) and bovine viral diarrhoea virus (Flaviviridae: *Pestivirus*) among wild artiodactyls of the Moscow region

Aleksander V. Pchelnikov^{1,2}, Svetlana P. Yatsentyuk^{1,2}, Maria S. Krasnikova¹¹All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed, 123022, Moscow, Russia;²Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MBA named after K.I. Skryabin, 109472, Moscow, Russia

Introduction. Pestiviruses and viruses of the Herpesviridae family are widely distributed among different species of ungulates, but the main information about these pathogens is related to their effect on farm animals. Data on detection of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and bovine herpes virus (BoHV) in wild ungulates reported from different countries in recent years raises the question of the role of wild animals in the epidemiology of cattle diseases.

Aim of work. To study the prevalence of herpesviruses and pestiviruses in the population of wild artiodactyls of the Moscow region.

Materials and methods. Samples of parenchymal organs and mucosal swabs from 124 wild deer (moose and roe deer) shot during hunting seasons 2019–2022 in Moscow Region were examined by PCR, virological and serological methods for the presence of genetic material and antibodies to bovine infectious rhinotracheitis and viral diarrhoea.

Results. BVDV RNA was found in a sample from one moose, BoHV DNA was detected in samples from three roe deer and two moose shot in the Moscow region. Seropositive animals were of different sex and age, the total BoHVs and BVDV seroprevalence rates in wild artiodactyls were 46 and 29%, respectively.

Conclusion. Wild ruminant artiodactyls of the Moscow Region can be a natural reservoir of BoHV-1, and this must be taken into account when planning and organizing measures to control the infectious bovine rhinotracheitis. Cases of BVDV infection in wild artiodactyls are less common, so more research is needed to definitively establish their role in the epidemiology of this disease in cattle.

Keywords: bovine diarrhoea virus; BVDV; bovine herpes virus; BoHV; wild ungulates; PCR; antibodies

For citation: Pchelnikov A.V., Yatsentyuk S.P., Krasnikova M.S. Circulation of bovine herpesvirus (Herpesviridae: *Varicellovirus*) and bovine viral diarrhoea virus (Flaviviridae: *Pestivirus*) among wild artiodactyls of the Moscow region. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(2): 142-151 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-167> EDN: <https://elibrary.ru/dtkibo>

For correspondence: Aleksander V. Pchelnikov, PhD (Vet.), Associate Professor of the Department of Epizootology and Organization of Veterinary Affairs, Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MBA named after K.I. Scriabin, 109472, Moscow, Russia. E-mail: [vetdr-mom@list.ru](mailto:vetr-mom@list.ru)

Information about the authors:Pchelnikov A.V., <https://orcid.org/0000-0002-9712-3079>Yatsentyuk S.P., <https://orcid.org/0000-0002-4819-2131>Krasnikova M.S., <https://orcid.org/0000-0002-6248-419X>

Contribution: Pchelnikov A.V. – conducting research, selecting literature, preparing illustrative material, writing the text of the article; Yatsentyuk S.P. – general guidance, selection of literature, scientific editing, writing the text of the article; Krasnikova M.S. – researching.

Funding. This work was supported by the Russian Science Foundation under grant No. 22-26-00093 (<https://rscf.ru/project/22-26-00093/>).

Acknowledgement. The authors express their sincere gratitude to the staff of the State Veterinary Service of the Moscow region for their assistance in sampling pathological animal material. Special thanks are expressed to the specialist of All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed K.G. Dolinskaya for the assistance in sample preparation and to the Deputy Director of the Center for Veterinary Medicine, PhD (Biol.) A.E. Gogin for advice on the design of maps published in the article.

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 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the All-Russian State Center for Quality and Standardization of Medicines for Animals and Feed (Protocol No. 125 dated 16 April 2020).

Received 03 March 2023

Accepted 17 April 2023

Published 30 April 2023

Введение

В течение двух последних десятилетий в мировой научной литературе прослеживается повышенный интерес к изучению распространения возбудителей инфекционных болезней крупного рогатого скота (КРС) в популяции диких парнокопытных животных. Особый интерес исследователей вызывают вирусы герпеса КРС 1-го типа (BoHV-1) и диареи КРС (BVDV) как возбудители инфекционного ринотрахеита (ИРТ) КРС и вирусной диареи (ВД) КРС – болезней, строго контролируемых Всемирной организацией здоровья животных (МЭБ).

В 2007 г. исследования популяции аляскинского карibu показали серопревалентность животных к BoHV-1 на уровне 47% [1]. Исследования материала от яков, обитающих в Цинхай-Тибетском нагорье Китая, проведённые в 2011–2012 гг., показали, что антитела к BoHV-1 присутствуют у 27,9–44,6% яков из разных исследованных районов [2].

Исследования буйволов, проведённые в 2014 г. в Аргентине, позволили выделить несколько изолятов BoHV-1 [3]. Проведённое годом позже масштабное исследование диких копытных 59 лесных районов Польши показало, что антитела к BoHV-1 присутствуют у 54,2% животных. Наиболее часто антитела выявляли у благородных оленей (25,6%) и ланей (23,1%), а реже всего – у косуль (1,7%) [4].

Изучение муфлонов (*Ovis orientalis*), диких козлов (*Capra aegagrus*), индийских газелей (*Gazella bennettii*) и джейранов (*Gazella subgutturosa*), проведённое в 13 разных районах Ирана, показало отсутствие антител к BoHV-1, однако методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК BoHV-1 была обнаружена в 1,5% случаев [5]. В более поздних исследованиях, проведённых на территории Ирана, от диких буйволов были выделены изоляты BoHV-1 [6].

Очень высокая серопревалентность диких жвачных к BoHV-1 была выявлена в Колумбии. Она составила 94,7% [7].

В Австралии учёные в 2009 г. постарались проследить связь серопревалентности интродуцированных диких оленей к BoHV-1 с интенсивностью домашнего животноводства в этом же районе. На основании результатов качественного анализа рисков авторы пришли к выводу, что вероятность инфицирования домашнего скота при прямом контакте с дикими парнокопытными жвачными животными является очень высокой [8]. Однако этот вывод требует дополнительных подтверждений.

Надо отметить, что значительный антигенный перекрёст не позволяет дифференцировать BoHV-1 от антигенно родственных α -герпесвирусов, которые могут встречаться у диких жвачных копытных [9–11]. Дело в том, что BoHV-1 входит в кластер близкородственных вирусов семейства Alphaherpesvirinae, включающий, помимо этого вируса и герпесвируса КРС 5-го типа (BoHV-5), ещё несколько вирусов жвачных парнокопытных, например, герпесвирус буйвола 1-го типа (BuHV-1), герпесвирус коз 1-го ти-

па (CpHV-1), герпесвирус оленей 1-го типа (CvHV-1), герпесвирус оленей 2-го типа (CvHV-2) и герпесвирус лосей 1-го типа (ElkHV-1) [12]. Таким образом, антитела в организме диких животных могут вырабатываться в ответ на инфицирование любым вирусом рассматриваемой группы.

В отношении распространённости разных пестивирусов в популяциях диких жвачных копытных животных информации в научной литературе значительно меньше. Род *Pestivirus*, в который входит возбудитель ВД КРС, с 2018 г. решением Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) разделён на 11 видов, а ранее выделяемые BVDV 1, 2 и 3-го типа (BVDV-1, -2, -3), вирус классической чумы свиней (КЧС, CSFV) и вирус пограничной болезни (BDV) отнесены к отдельным видам: *Pestivirus A* (ранее – BVDV-1), *Pestivirus B* (BVDV-2), *Pestivirus C* (CSFV), *Pestivirus D* (BDV), *Pestivirus H* (BVDV-3, HoBi-like pestivirus) [13].

Несмотря на антигенное родство, описанное ещё в 1960-е гг. для BVDV и вируса КЧС [14], диапазон естественных хозяев вируса КЧС ограничивается домашними свиньями и дикими кабанями, в то время как BVDV-1 и BVDV-2 (*Pestivirus A* и *B*) и BDV способны проникать через межвидовые барьеры и заражать широкий круг парнокопытных [15].

Большинство исследователей диких парнокопытных животных изучают исключительно распространённость BVDV-1, и объём подобных исследований в популяциях в мире не менее значителен, чем в отношении BoHV-1. Ещё в 1983 г. L.G. Doyle и W.P. Heuschele опубликовали результаты исследования диких парнокопытных зоопарковых животных на наличие антител к вирусу BVDV. Серопревалентность животных, не вакцинированных против ВД КРС, составила 4,3% [16].

В более поздних исследованиях американским учёным удалось изолировать нецитопатический вирус против ВД КРС типа 1a из материала, отобранного от годовалой самки оленя-мула (*Odocoileus hemionus*) из северо-западного Вайоминга (США). Это второй описанный в литературе случай изоляции BVDV от свободно живущих оленей в Северной Америке и первый от оленя этого вида. Дополнительные серологические исследования, проведённые авторами в популяции *Odocoileus hemionus*, позволили установить, что общая серопревалентность к BVDV достигает 60% [17].

В 2008 г. исследователи, изучив в эксперименте восприимчивость к BVDV белохвостого оленя (*Odocoileus virginianus*), указали на необходимость корректировки программ борьбы с ВД КРС на территории США с учётом дальнейшего изучения эпизоотической ситуации по этой болезни в дикой фауне [18].

Ряд последующих исследований, проведённых европейскими учёными, позволил определить дополнительный круг диких парнокопытных животных, которые могут быть естественными резервуарами BVDV, а также установить возможность передачи возбудителя ВД от диких парнокопытных животных

домашнему КРС и наоборот. В 2006 г. в Германии подтверждена возможность естественного заражения КРС от экспериментально инфицированного мышного оленя (*Tragulus javanicus*) [19].

J. Casaubon и соавт. в 2012 г. впервые детектировали генетический материал BVDV у альпийской серны (*Rupicapra rupicapra*) в Швейцарии. По итогам проведенной работы авторы сделали вывод, что инфицирование BVDV швейцарских диких жвачных животных носит спорадический характер, в связи с чем дикие жвачные в настоящее время являются случайными переносчиками вируса, а не резервуарами для BVDV в Швейцарии [20].

К разным выводам пришли испанские учёные в 2016 и 2019 гг. X. Fernández-Aguilar и соавт. полагают, что пестивирусные инфекции у диких жвачных животных спорадические и, скорее всего, дикие животные заражаются исключительно от домашнего скота, а не наоборот [21]. В то же время V. Rodríguez-Prieto и соавт. утверждают, что BVDV циркулирует между популяциями КРС и благородного оленя (*Cervus elaphus*) и необходимы дальнейшие исследования для изучения роли благородного оленя как резервуара BVDV [22]. С этим выводом согласны и итальянские учёные, которые в 2019 г. сделали вывод о широком распространении BVDV в дикой фауне. Субгенотип BVDV-1c был впервые обнаружен у косули (*Capreolus capreolus*) и апеннинской серны (*Rupicapra pyrenaica ornata*) в Центральной Италии. В связи с этим авторы призывают к более детальному изучению роли этих животных в эпизоотологии ВД КРС [23].

Помимо исследований, посвящённых изучению распространения конкретного возбудителя, в литературе не менее широко описаны случаи регистрации ассоциаций возбудителей вирусной природы в одной и той же популяции диких парнокопытных животных. В частности, довольно часто встречаются упоминания об одновременном выявлении BoHV-1 и BVDV [24, 25].

Результаты приведённых исследований свидетельствуют о том, что BoHV-1 и BVDV в разной мере присутствуют в популяции диких жвачных животных по всему миру, в то время как в работах отечественных учёных этот вопрос затрагивается только поверхностно, а полномасштабные исследования распространённости вирусных патогенов КРС в популяции диких жвачных животных России единичны [26, 27].

Целью данной работы было изучение распространённости α -герпесвирусов КРС и пестивирусов КРС в популяции диких парнокопытных животных Московской области.

Материалы и методы

Пробы патологического материала (кусочки паренхиматозных органов, смывы со слизистой оболочки носовой полости, кровь из сердца) отбирались от диких парнокопытных животных, отстрелянных в зимние сезоны охоты 2019–2022 гг. на территории Московской области. Отбор проб проводили посмертно

ветеринарные врачи Государственной ветеринарной службы Московской области. Всего было отобрано 460 проб от 124 животных, в том числе:

- от 99 лосей (*Alces alces*);
- 15 косуль (*Capreolus capreolus*);
- 10 животных без информации о виде.

Все особи на основе морфологических характеристик (размер тела, износ зубов, рост рогов) были разделены на три возрастные категории: оленёнок (менее 1 года), годовалый (от 1 до 2 лет) и взрослый (более 2 лет). Большинство животных были взрослыми особями ($n = 68$), значительно меньше исследовано годовалых ($n = 16$) и оленят ($n = 14$). Для 26 животных примерный возраст в сопроводительных документах не был указан. Самцы ($n = 55$) и самки ($n = 54$) были представлены практически одинаково, в 26 случаях, включённых в исследование, половая принадлежность животных в сопроводительных документах была не указана.

От указанных животных был исследован 371 образец внутренних органов (носовая перегородка, верхние кольца трахеи, кусочки лёгкого, сердца, печени, почки), 48 проб смывов со слизистых и 41 проба сыворотки крови (кровь отбиралась посмертно пункцией полостей сердца). Образцы замораживали при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. В ходе пробоподготовки из тканей органов вырезали фрагмент объемом 1 см^3 , который измельчали на гомогенизаторе Homogenizer type 302 (Mechanika Precyzyjna, Польша) в 10 мл физиологического раствора с добавлением 100 мг стрептомицина и 100 ЕД пенициллина. В дальнейшем гомогенат центрифугировали на центрифуге ОПН-8УХЛ4.2 (Россия) при 3000 об/мин в течение 5 мин, супернатант отбирали и использовали для дальнейших исследований.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с “Consensus author guidelines for animal use” (IAVES 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (Протокол № 125 от 16 апреля 2020 г.).

Культура клеток. Для репродукции вирусов использовалась перевиваемая культура клеток почки телёнка (MDBK).

Вирус. В работе использовался полевой изолят вируса ИРТ КРС «Куйбышев-2006» и цитопатогенный штамм вируса ВД КРС Т-04 из коллекции ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук».

Культивирование клеток. Культивирование проводили в полистироловых культуральных матрасах с площадью роста 75 см^2 и неvented крышкой в условиях термостата при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. В качестве ростовой питательной среды использовали среды Игла DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 7% сыво-

ротки КРС (HyClone, США). Пересев культуры проводили 1 раз в неделю в соотношении 1 : 4.

Заражение культуры вирусами. Заражение культуры клеток проводили после формирования полного монослоя на 1–2-й день после посева клеток. Ростовую питательную среду сливали. Клеточный монослой дважды отмывали питательной средой Игла DMEM. После этого в матрас вносили вирусосодержащий материал из расчета 1,0 ТЦД₅₀/ккл и помещали в термостат при 37 °С на 1 ч. Через 1 ч содержимое матраса сливали, а в матрас вносили поддерживающую питательную среду (Игла DMEM без добавления сыворотки) без предварительного промывания монослоя. После этого матрас помещался в отдельный термостат при 37 °С. Цитопатическое действие вирусов учитывали ежедневно визуально под малым увеличением инвертированного микроскопа до отслоения большей части монослоя от субстрата. Вирусосодержащую суспензию использовали в дальнейших исследованиях. Определение инфекционного титра вируса проводили по методу Рида и Менча.

Реакция нейтрализации. Реакцию нейтрализации с постоянной дозой вируса 2 lg ТЦД₅₀/мл проводили микротитром, используя полистироловые 96-луночные культуральные планшеты. Каждая проба сыворотки крови исследовалась в двух повторах по три разведения в каждом (1 : 2 – 1 : 8). Результаты учитывали через 72 ч после постановки реакции. Учитывая низкое качество и количество сыворотки в предоставленных пробах, а также невозможность повторного отбора проб у тех же животных, учёт результатов реакции проводился качественно (без расчёта титра антител в исследуемой сыворотке). Животное считалось серопозитивным при получении положительного результата (отсутствие цитопатического действия вируса) хотя бы в первом разведении сыворотки одного из повторов.

Полимеразная цепная реакция. Выделение нуклеиновых кислот проводили из 100 мкл образца с помощью набора «РИБО-преп» (ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора» (ЦНИИЭ), Россия) по инструкции производителя. ПЦР для выявления ДНК герпесвирусов КРС проводили с использованием тест-системы «РИНОКОР» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). Для идентификации родственных α -герпесвирусов проводили амплификацию участка гена *gB* вирусов с использованием гнездовой ПЦР с праймерами CR30, CR31, CR32, CR33 [28]. Первый раунд с праймерами CR30, CR31 проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 2,5× PCR-mix2 blue («АмплиСенс», Россия), 0,25 мМ dNTP, 0,6 мкМ прямого и обратного праймера и 10 мкл выделенной из образца ДНК. Реакцию проводили в амплификаторе «Терцик» («ДНК-технология», Россия) по следующей программе: 5 мин–95 °С, 40 циклов (20 сек–95 °С, 20 сек–61 °С, 30 сек – 72 °С), 5 мин – 72 °С. Второй раунд с праймерами CR32, CR33 проводили в аналогичной смеси по программе: 5 мин – 95 °С, 40 циклов (20 сек–95 °С, 20 сек–63 °С, 20 сек–72 °С), 5 мин–72 °С с использованием в качестве матрицы 1 мкл реакционной смеси первого раунда.

Секвенирование очищенных ампликонов проводили с использованием набора реагентов BrilliantDye V3.1 на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies, США). Полученные нуклеотидные последовательности анализировали с помощью алгоритма BLAST на поисковом интернет-ресурсе National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Для выявления генетического материала BVDV использовали методику, разработанную в ФГБУ «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» для выявления генетического материала вирусов рода *Pestivirus* (групп А, В, С, D, H) в ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в режиме реального времени [29]. Амплификацию и детекцию продуктов ПЦР и ОТ-ПЦР проводили в режиме реального времени на приборе RotorGene Q (QIAGEN GmbH, Германия).

Статистическая обработка результатов. Статистическая обработка результатов и построение диаграмм проводились в программе Microsoft Excel 2016.

Картографический анализ. Карты строили в программе ArcGIS10.8.

Результаты

Из 124 парнокопытных, добытых на территории Московской области, пробы сыворотки крови отобраны только у 41 животного, в том числе от 36 лосей и 5 косуль. Трудности с отбором были связаны с большим промежутком времени между гибелью животного и проведённым отбором проб, а также с низкой температурой воздуха в зимний период, что приводило к частичному гемолизу крови, полученному незначительному объёму сыворотки и, как следствие, определённым трудностям при её исследовании в реакции нейтрализации. В образцах сыворотки 19 животных (16 лосей, 3 косули) были детектированы антитела к α -герпесвирусам КРС. Антитела к пестивирусам КРС детектированы в сыворотке крови 12 лосей. При этом антитела к обоим группам возбудителей определены в сыворотке крови 8 лосей.

В результате молекулярно-генетических исследований (ПЦР) 371 образца патологического материала и 48 проб смывов со слизистых от 124 диких парнокопытных, добытых на территории Московской области, ДНК α -герпесвирусов КРС была выявлена в образцах от 5 животных:

– в носовых смывах 2 косуль, добытых в 2019 г. на территории г.о. Луховицы;

– в образцах органов 2 лосей (в образце лёгкого одного, а также в образцах почки и сердца другого животного), добытых в 2022 г. на территории г.о. Ступино;

– в носовом смыве 1 косули, добытой в 2022 г. на территории г.о. Серпухов.

Анализ нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *gB*, полученных в результате секвенирования продуктов ПЦР с общими для α -герпесвирусов праймерами, подтвердили наличие ДНК ВоHV-5 в образце носового смыва от косули и ДНК ВоHV-1 в двух пробах

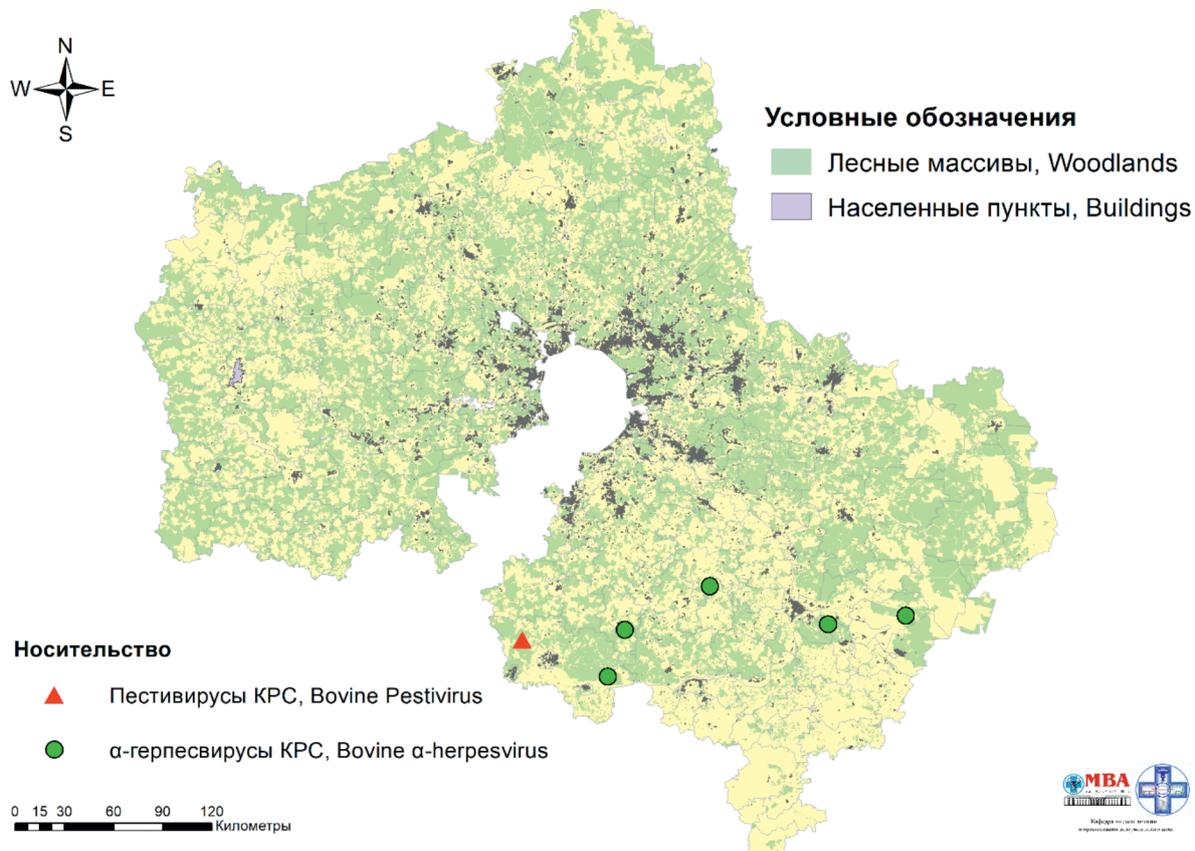


Рис. 1. Места добычи животных, в материале которых детектирован генетический материал α-герпесвирусов КРС и пестивирусов КРС, в Московской области.

Fig. 1. Locations in Moscow Region where were shot animals in which samples the genetic material of cattle α-herpesviruses and cattle pestiviruses has been detected.

органов лосей, отстрелянных в 2022 г. Для проб животных, добытых в 2019 г., из-за низкого качества образцов не удалось провести идентификацию вирусов герпеса.

В носовом смыве лося, добытого в 2022 г. на территории г.о. Серпухов, детектирован генетический материал BVDV.

Локация добычи указанных животных отображена на карте Московской области (рис. 1).

Обсуждение

Результаты, полученные в ходе исследования проб патологического материала от диких парнокопытных животных на территории Московской области, позволяют утверждать о циркуляции α-герпесвирусов КРС и пестивирусов КРС среди этих животных.

По результатам серологических исследований, общая серопревалентность диких парнокопытных Московской области к α-герпесвирусу КРС составила 46%. Серопревалентность к пестивирусам КРС составила 29%. Эти цифры варьируют в разных районах и городских округах области, но в целом положительные результаты были выявлены в районах наибольшего числа отобранных проб (рис. 2 и 3).

Антитела к α-герпесвирусам КРС и пестивирусам КРС чаще детектировали у взрослых животных (11 и 5 положительных проб соответственно), чем у оле-

нят (6 и 4 положительные пробы соответственно), количество серопозитивных самцов и самок было практически одинаковым. Реже всего антитела выявляли у годовалых животных (2 и 1 положительная проба). Кроме того, антитела к пестивирусам КРС детектированы у 2 животных, возрастная категория которых не была определена из-за отсутствия соответствующей информации (рис. 4). Полученные различия в серопозитивности возрастных групп животных можно объяснить неравномерностью выборки, а также особенностями социальной структуры групп оленей в зимнее время, которые были описаны нами ранее [30].

К сожалению, только по результатам серологических исследований, несмотря на факт отсутствия вакцинации, мы не можем точно установить носительство дикими парнокопытными Московской области возбудителя ИРТ КРС – герпесвируса КРС 1-го типа. Детектированные нами в 46% исследованных проб антитела могли выработаться в организме в ответ на инфицирование любым α-герпесвирусом КРС. Для точной дифференциации J. Thiru и соавт. в своей работе рекомендует проводить идентификацию предварительно изолированного из патологического материала возбудителя в реакции иммунофлуоресценции с моноклональными антителами [12]. Но в нашей работе изоляция возбудителей из патологического материала не проводилась.

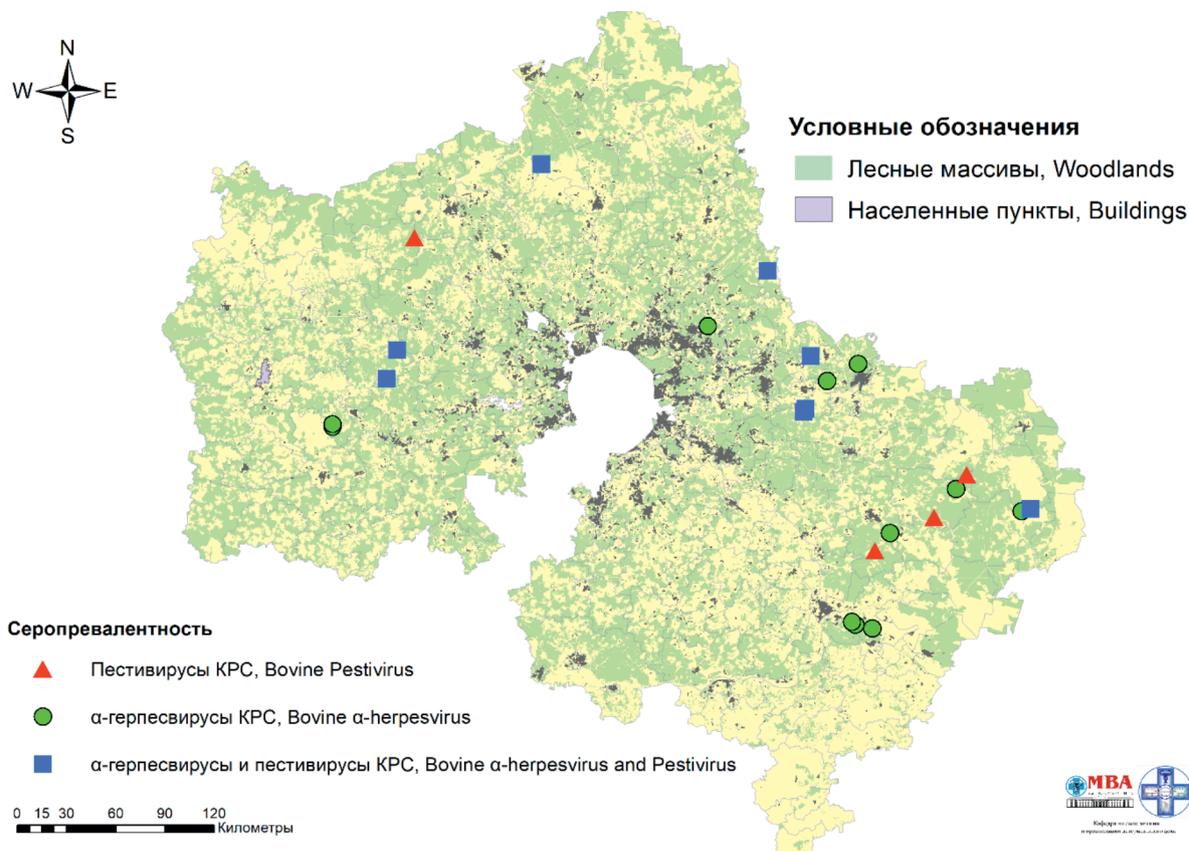


Рис. 2. Места отстрела животных, в сыворотке крови которых детектированы антитела к α-герпесвирусам КРС и пестивирусам КРС, в Московской области.

Fig. 2. Locations in Moscow Region where were shot animals in which sera antibodies to cattle α-herpesviruses and cattle pestiviruses have been detected.

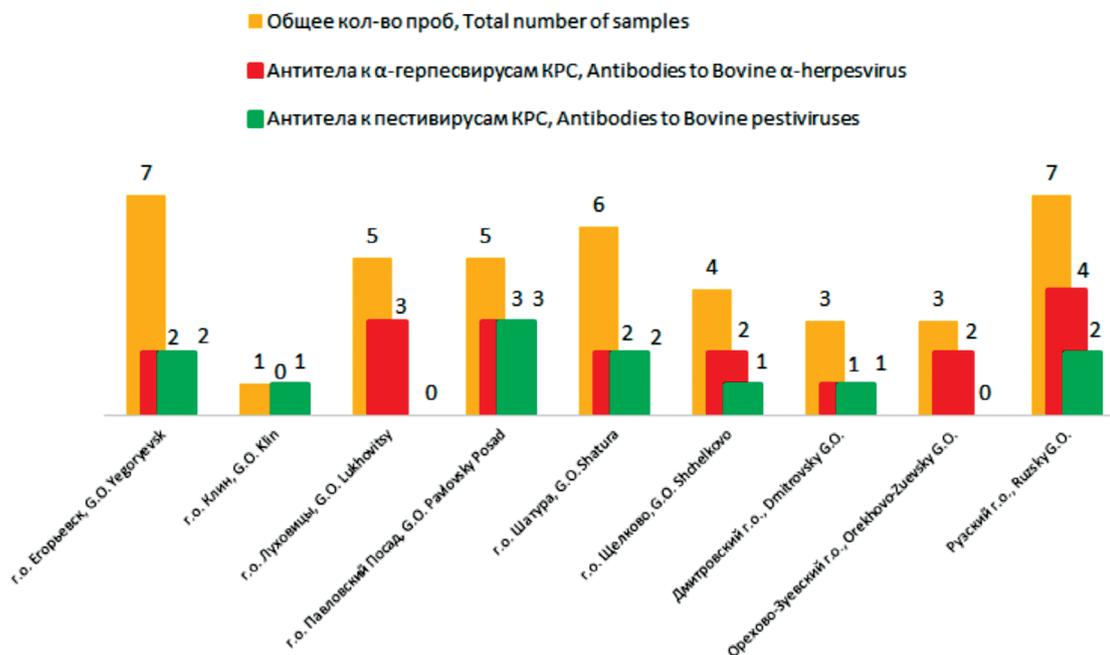


Рис. 3. Регионы Московской области, где проведён отбор проб сыворотки крови и сравнение общего количества исследованных проб и проб, в которых детектированы антитела к α-герпесвирусам КРС и пестивирусам КРС.

Fig. 3. Territories of the Moscow Region where serum samples were obtained and the comparison of total number of samples studied and samples in which antibodies to cattle α-herpesviruses and cattle pestiviruses were detected.

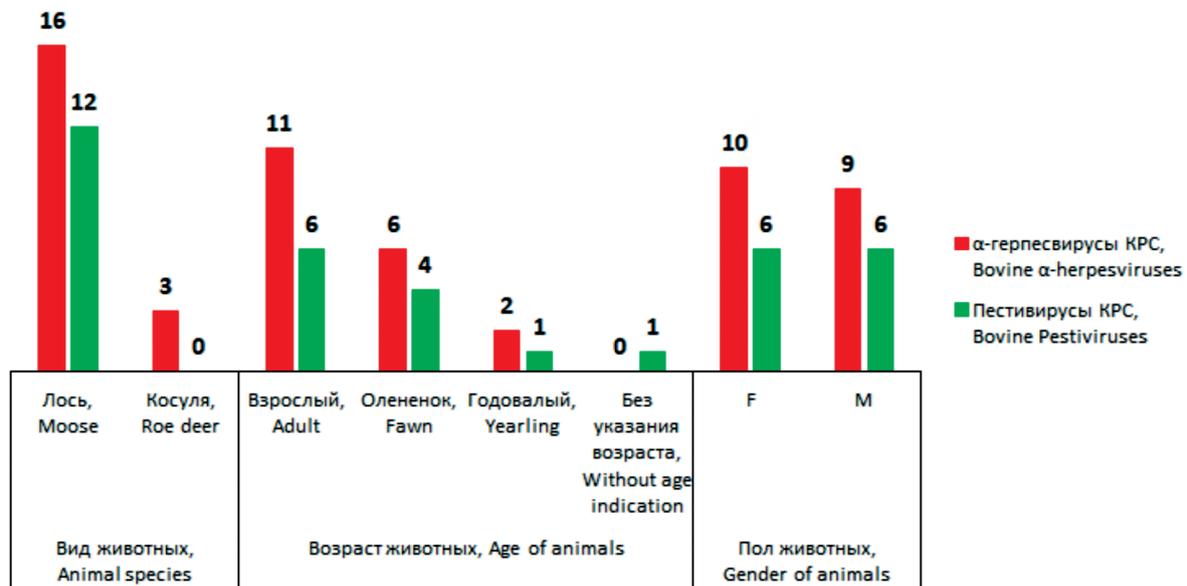


Рис. 4. Распределение общего количества проб сыворотки крови к количеству проб, в которых детектированы антитела к α-герпесвирусам КРС и пестивирусам КРС, по видовым, возрастным и половым особенностям добытых животных.

Fig. 4. Distribution of the serum samples in which antibodies to cattle α-herpesviruses of and cattle pestiviruses of were detected, in general and depending on species, age and gender characteristics of the animals.

Тем не менее мы с уверенностью можем утверждать, что герпесвирусы КРС 1-го и 5-го типа циркулируют в популяции диких парнокопытных животных на территории Московской области. Об этом говорит факт детекции генетического материала этих возбудителей в образцах материала от 3 диких парнокопытных животных. Специфичность ПЦР-исследований и описанная возможность молекулярно-генетической дифференциации родственных α-герпесвирусов, на которую указывают многие иностранные авторы [28, 31, 32], позволяет нам предположить, что циркуляция возбудителя ИРТ КРС возможна у диких копытных и на других территориях Московской области, на которых сконцентрировано относительно большее количество животных.

Факт детекции антител к пестивирусам КРС в 12 пробах сыворотки крови (серопревалентность 29%) и генетического материала BVDV в образце от одного животного говорит о циркуляции BVDV в популяции диких жвачных парнокопытных Московской области.

Заключение

По результатам наших исследований, серопревалентность диких парнокопытных Московской области к α-герпесвирусам КРС выше, чем к пестивирусам КРС. Антитела к α-герпесвирусам детектированы в 46% исследуемых проб сыворотки крови диких животных, к пестивирусам – в 29%. Такое соотношение положительных проб коррелируют с данными, полученными европейскими коллегами в разных странах [21, 25], что в целом позволяет согласиться с их выводами о роли диких жвачных животных как резервуар-

ных хозяев исследуемых возбудителей: скорее всего, дикие жвачные могут быть естественным резервуаром BoHV-1 и других α-герпесвирусов, и этот факт необходимо учитывать при организации мероприятий по контролю и ликвидации ИРТ КРС в животноводческих хозяйствах. В связи с более редкими случаями инфицирования оленей BVDV для выводов о роли диких парнокопытных животных в эпизоотологии ВД КРС необходимы дополнительные исследования.

ЛИТЕРАТУРА

- Evans A.L., das Neves C.G., Finstad G.F., Beckmen K.B., Skjerve E., Nymo I.H., et al. Evidence of alphaherpesvirus infections in Alaskan caribou and reindeer. *BMC Vet. Res.* 2012; 8: 5. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-5>
- Han Z., Gao J., Li K., Shahzad M., Nabi F., Zhang D., et al. Prevalence of circulating antibodies to bovine herpesvirus 1 in yaks (*Bos grunniens*) on the Qinghai-Tibetan plateau, China. *J. Wildl. Dis.* 2016; 52(1): 164–7. <https://doi.org/10.7589/2015-01-018>
- Maidana S.S., Konrad J.L., Craig M.I., Zabal O., Mauroy A., Thiry E., et al. First report of isolation and molecular characterization of bubaline herpesvirus 1 (BuHV1) from Argentinean water buffaloes. *Arch. Virol.* 2014; 159(11): 2917–23. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2146-8>
- Rola J., Larska M., Socha W., Rola J.G., Materniak M., Urban-Chmiel R., et al. Seroprevalence of bovine herpesvirus 1 related alphaherpesvirus infections in free-living and captive cervids in Poland. *Vet. Microbiol.* 2017; 204: 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.006>
- Hemmatzadeh F., Boardman W., Alinejad A., Hematizade A., Moghadam M.K. Molecular and serological survey of selected viruses in free-ranging wild ruminants in Iran. *PLoS One.* 2016; 11(12): e0168756. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168756>
- Hedayat N., Haji Hajikolaei M.R., Seyfi Abad Shapouri M.R., Ghadrddan Mashhadi A.R., Izadnia H., Daghari M. Isolation and identification of bubaline herpesvirus 1 (BuHV-1) from latently infected water buffalo (*Bubalus bubalis*) from Iran. *Trop. Anim. Health Prod.* 2020; 52(1): 217–26. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02007-9>

7. Conner M.M., Ebinger M.R., Blanchong J.A., Cross P.C. Infectious disease in cervids of North America: data, models, and management challenges. *Ann. NY Acad. Sci.* 2008; 1134: 146–72. <https://doi.org/10.1196/annals.1439.005>
8. Cripps J.K., Pacioni C., Scroggie M.P., Woolnough A.P., Ramsey D.S.L. Introduced deer and their potential role in disease transmission to livestock in Australia. *Mammal. Rev.* 2019; 49(1): 60–77. <https://doi.org/10.1111/mam.12142>
9. Lyaku J.R., Nettleton P.F., Marsden H. A comparison of serological relationships among five ruminant alphaherpesviruses by ELISA. *Arch. Virol.* 1992; 124(3–4): 333–41. <https://doi.org/10.1007/BF01309813>
10. Martin W.B., Castrucci G., Frigeri F., Ferrari M. A serological comparison of some animal herpesviruses. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1990; 13(2): 75–84. [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(90\)90519-y](https://doi.org/10.1016/0147-9571(90)90519-y)
11. Nixon P., Edwards S., White H. Serological comparisons of antigenically related herpesviruses in cattle, red deer and goats. *Vet. Res. Commun.* 1988; 12(4–5): 355–62. <https://doi.org/10.1007/BF00343256>
12. Thiry J., Keuser V., Muylkens B., Meurens F., Gogev S., Vanderplassen A., et al. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Vet. Res.* 2006; 37(2): 169–90. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005052>
13. International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV. Available at: <https://ictv.global/taxonomy>
14. Darbyshire J.H. A serological relationship between swine fever and mucosal disease of cattle. *Vet. Rec.* 1960; 72: 331.
15. Becher P., Ramirez R.A., Orlich M., Rosales S.C., Konig M., Schweizer M., et al. Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology.* 2003; 311(1): 96–104. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(03\)00192-2](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(03)00192-2)
16. Doyle L.G., Heuschele W.P. Bovine viral diarrhoea virus infection in captive exotic ruminants. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1983; 183(11): 1257–9.
17. Van Campen H., Ridpath J., Williams E., Cavender J., Edwards J., Smith S., et al. Isolation of bovine viral diarrhoea virus from a free-ranging mule deer in Wyoming. *J. Wildl. Dis.* 2001; 37(2): 306–11. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-37.2.306>
18. Duncan C., Ridpath J., Palmer M.V., Driskell E., Spraker T. Histopathologic and immunohistochemical findings in two white-tailed deer fawns persistently infected with Bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2008; 20(3): 289–96. <https://doi.org/10.1177/104063870802000305>
19. Utenthal A., Hoyer M.J., Grøndahl C., Houe H., van Maanen C., Rasmussen T.B., et al. Vertical transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in mousedeer (*Tragulus javanicus*) and spread to domestic cattle. *Arch. Virol.* 2006; 151(12): 2377–87. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0818-8>
20. Casaubon J., Vogt H.R., Stalder H., Hug C., Ryser-Degiorgis M.P. Bovine viral diarrhoea virus in free-ranging wild ruminants in Switzerland: low prevalence of infection despite regular interactions with domestic livestock. *BMC Vet. Res.* 2012; 8: 204. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-204>
21. Fernández-Aguilar X., López-Olvera J.R., Marco I., Rosell R., Colom-Cadena A., Soto-Heras S., et al. Pestivirus in alpine wild ruminants and sympatric livestock from the Cantabrian Mountains, Spain. *Vet. Rec.* 2016; 178(23): 586. <https://doi.org/10.1136/vr.103577>
22. Rodríguez-Prieto V., Kukielka D., Rivera-Arroyo B., Martínez-López B., de las Heras A.I., Sánchez-Vizcaino J.M., et al. Evidence of shared bovine viral diarrhoea infections between red deer and extensively raised cattle in south-central Spain. *BMC Vet. Res.* 2016; 12: 11. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0630-3>
23. Ricci S., Bartolini S., Morandi F., Cuteri V., Prezioso S. Genotyping of pestivirus A (Bovine Viral Diarrhoea Virus 1) detected in faeces and in other specimens of domestic and wild ruminants at the wildlife-livestock interface. *Vet. Microbiol.* 2019; 235: 180–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.07.002>
24. Fabisiak M., Sałamaszyńska A., Stądziejek T. Detection of seroconversion to bovine herpesvirus 1 related alphaherpesvirus and bovine viral diarrhoea virus in Polish free-living deer. *Pol. J. Vet. Sci.* 2018; 21(3): 437–40. <https://doi.org/10.24425/122615>
25. Lillehaug A., Vikoren T., Larsen I.L., Akerstedt J., Tharaldsen J., Handeland K. Antibodies to ruminant alpha-herpesviruses and pestiviruses in Norwegian cervids. *J. Wildl. Dis.* 2003; 39(4): 779–86. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.4.779>
26. Юров К.П., Гулюкин М.И. Контроль и пути оздоровления скота племенных хозяйств и племенных предприятий от инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи. *Российская сельскохозяйственная наука.* 2018; (1): 59–63. EDN: <https://www.elibrary.ru/ovumgb>
27. Шуляк А.Ф., Горбатов А.В., Стаффорд В.В., Лошинин М.Н., Веллико Г.Н., Соколова Н.А. и др. Смешанная инфекция у диких парнокопытных в охотхозяйстве. *Ветеринария: научно-производственный журнал.* 2020; (10): 20–5. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2020.23.10.20-25> EDN: <https://elibrary.ru/jgaust>
28. Ros C., Belák S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and ruminant alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37(5): 1247–53. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.5.1247-1253.1999>
29. Горбачева Н.С., Яцентюк С.П., Красникова М.С., Козлова А.Д., Брюсова М.Б. Выявление пестивирусной контаминации биопрепаратов методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. В кн.: *Экономически и социально значимые инфекции сельскохозяйственных животных: меры профилактики и борьбы: Материалы Международной научно-практической конференции.* М.; 2022: 145–7.
30. Yatsentyuk S.P., Pchelnikov A.V., Safina E.R., Krasnikova M.S. The first study on the occurrence of bovine herpesviruses in the wild fauna of the Moscow region, Russia. *Vet. World.* 2022; 15(8): 2052–8. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.2052-2058>
31. Lyaku J.R., Vilcek S., Nettleton P.F., Marsden H.S. The distinction of serologically related ruminant alphaherpesviruses by the polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease analysis. *Vet. Microbiol.* 1996; 48(1–2): 135–42. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00136-0](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00136-0)
32. Ros C., Riquelme M.E., Forslund K.O., Belák S. Improved detection of five closely related ruminant alphaherpesviruses by specific amplification of viral genomic sequences. *J. Virol. Methods.* 1999; 83(1–2): 55–65. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(99\)00103-2](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(99)00103-2)

REFERENCES

1. Evans A.L., das Neves C.G., Finstad G.F., Beckmen K.B., Skjerve E., Nymo I.H., et al. Evidence of alphaherpesvirus infections in Alaskan caribou and reindeer. *BMC Vet. Res.* 2012; 8: 5. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-5>
2. Han Z., Gao J., Li K., Shahzad M., Nabi F., Zhang D., et al. Prevalence of Circulating Antibodies to Bovine Herpesvirus 1 in Yaks (*Bos grunniens*) on the Qinghai-Tibetan Plateau, China. *J. Wildl. Dis.* 2016; 52(1): 164–7. <https://doi.org/10.7589/2015-01-018>
3. Maidana S.S., Konrad J.L., Craig M.I., Zabal O., Mauroy A., Thiry E., et al. First report of isolation and molecular characterization of bubaline herpesvirus 1 (BuHV1) from Argentinean water buffaloes. *Arch. Virol.* 2014; 159(11): 2917–23. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2146-8>
4. Rola J., Larska M., Socha W., Rola J.G., Materniak M., Urban-Chmiel R., et al. Seroprevalence of bovine herpesvirus 1 related alphaherpesvirus infections in free-living and captive cervids in Poland. *Vet. Microbiol.* 2017; 204: 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.006>
5. Hemmatzadeh F., Boardman W., Alinejad A., Hematzaade A., Moghadam M.K. Molecular and Serological Survey of Selected Viruses in Free-Ranging Wild Ruminants in Iran. *PLoS One.* 2016; 11(12): e0168756. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168756>
6. Hedayat N., Haji Hajikolaie M.R., Seyfi Abad Shapouri M.R., Ghadrán Mashhadi A.R., Izadnia H., et al. Isolation and identification of bubaline herpesvirus 1 (BuHV-1) from latently infected water buffalo (*Bubalus bubalis*) from Iran. *Trop. Anim. Health Prod.* 2020; 52(1): 217–26. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02007-9>
7. Conner M.M., Ebinger M.R., Blanchong J.A., Cross P.C. Infectious disease in cervids of North America: data, models, and management challenges. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008; 1134: 146–72. <https://doi.org/10.1196/annals.1439.005>
8. Cripps J.K., Pacioni C., Scroggie M.P., Woolnough A.P., Ramsey D.S.L. Introduced deer and their potential role in disease transmission to livestock in Australia. *Mammal. Rev.* 2019; 49: 60–77. <https://doi.org/10.1111/mam.12142>

9. Lyaku J.R., Nettleton P.F., Marsden H. A comparison of serological relationships among five ruminant alphaherpesviruses by ELISA. *Arch. Virol.* 1992; 124(3-4): 333–41. <https://doi.org/10.1007/BF01309813>
10. Martin W.B., Castrucci G., Frigeri F., Ferrari M. A serological comparison of some animal herpesviruses. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1998; 13(2): 75–84. [https://doi.org/10.1016/0147-9571\(90\)90519-y](https://doi.org/10.1016/0147-9571(90)90519-y)
11. Nixon P., Edwards S., White H. Serological comparisons of antigenically related herpesviruses in cattle, red deer and goats. *Vet. Res. Commun.* 1988; 12(4-5): 355–62. <https://doi.org/10.1007/BF00343256>
12. Thiry J., Keuser V., Muylkens B., Meurens F., Gogev S., Vanderplasschen A., et al. Ruminant alphaherpesviruses related to bovine herpesvirus 1. *Vet. Res.* 2006; 37(2): 169–90. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005052>
13. International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV. Available at: <https://ictv.global/taxonomy>
14. Darbyshire J.H. A serological relationship between swine fever and mucosal disease of cattle. *Veterinary Record.* 1960; 72: 331.
15. Becher P., Ramirez R.A., Orlich M., Rosales S.C., König M., Schweizer M., et al. Thiel Genetic and antigenic characterization of novel pestivirus genotypes: implications for classification. *Virology.* 2003; 311: 96–104.
16. Doyle L.G., Heuschele W.P. Bovine viral diarrhoea virus infection in captive exotic ruminants. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1983; 183(11): 1257–9.
17. Van Campen H., Ridpath J., Williams E., Cavender J., Edwards J., Smith S., et al. Isolation of bovine viral diarrhoea virus from a free-ranging mule deer in Wyoming. *J. Wildl. Dis.* 2001; 37(2): 306–11. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-37.2.306>
18. Duncan C., Ridpath J., Palmer M.V., Driskell E., Spraker T. Histopathologic and immunohistochemical findings in two white-tailed deer fawns persistently infected with Bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2008; 20(3): 289–96. <https://doi.org/10.1177/104063870802000305>
19. Uttenthal A., Hoyer M.J., Grøndahl C., Houe H., van Maanen C., Rasmussen T.B., et al. Vertical transmission of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in mousedeer (*Tragulus javanicus*) and spread to domestic cattle. *Arch. Virol.* 2006; 151(12): 2377–87. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0818-8>
20. Casaubon J., Vogt H.R., Stalder H., Hug C., Rysler-Degiorgis M.P. Bovine viral diarrhoea virus in free-ranging wild ruminants in Switzerland: low prevalence of infection despite regular interactions with domestic livestock. *BMC Vet. Res.* 2012; 8: 204. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-204>
21. Fernández-Aguilar X., López-Olvera J.R., Marco I., Rosell R., Colom-Cadena A., Soto-Heras S., et al. Pestivirus in alpine wild ruminants and sympatric livestock from the Cantabrian Mountains, Spain. *Vet. Rec.* 2016; 178(23): 586. <https://doi.org/10.1136/vr.103577>
22. Rodríguez-Prieto V., Kukielka D., Rivera-Arroyo B., Martínez-López B., de las Heras A.I., Sánchez-Vizcaino J.M., et al. Evidence of shared bovine viral diarrhoea infections between red deer and extensively raised cattle in south-central Spain. *BMC Vet. Res.* 2016; 12: 11. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0630-3>
23. Ricci S., Bartolini S., Morandi F., Cuteri V., Prezioso S. Genotyping of Pestivirus A (Bovine Viral Diarrhoea Virus 1) detected in faeces and in other specimens of domestic and wild ruminants at the wild-life-livestock interface. *Vet. Microbiol.* 2019; 235: 180–7. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.07.002>
24. Fabisiak M., Sałamaszyńska A., Stajek T. Detection of seroconversion to bovine herpesvirus 1 related alphaherpesvirus and bovine viral diarrhoea virus in Polish free-living deer. *Pol. J. Vet. Sci.* 2018; 21(3): 437–40. <https://doi.org/10.24425/122615>
25. Lillehaug A., Vikøren T., Larsen I.L., Akerstedt J., Tharaldsen J., Handeland K. Antibodies to ruminant alpha-herpesviruses and pestiviruses in Norwegian cervids. *J. Wildl. Dis.* 2003; 39(4): 779–86. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.4.779>
26. Yurov K.P., Gulyukin M.I. Control and ways cattle of improvement of breederies and treatments from infectious bovine rinotracheitis and bovine viral diarrhoea. *Rossiyskaya sel'skokhozyaystvennaya nauka.* 2018; (1): 59–63. EDN: <https://www.elibrary.ru/ovumgb> (in Russian)
27. Shulyak A.F., Gorbатов A.V., Stafford V.V., Loshchinin M.N., Velichko G.N., Sokolova N.A., et al. Mixed infection among wild ruminants on hunting grounds. *Veterinariya: nauchno-proizvodstvennyy zhurnal.* 2020; (10): 20–5. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2020.23.10.20-25> EDN: <https://elibrary.ru/jgaust> (in Russian)
28. Ros C., Belák S. Studies of genetic relationships between bovine, caprine, cervine, and rangiferine alphaherpesviruses and improved molecular methods for virus detection and identification. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37(5): 1247–53. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.5.1247-1253.1999>
29. Gorbacheva N.S., Yatsentyuk S.P., Krasnikova M.S., Kozlova A.D., Bryusova M.B. Detection of pestivirus contamination of biological products by RT-PCR in real time. In: *Economically and Socially Significant Infections of Farm Animals: Prevention and Control Measures: Materials of the International Scientific and Practical Conference [Ekonomicheski i sotsial'no znachimye infektsii sel'skokhozyaystvennykh zivotnykh: mery profilaktiki i bor'by: Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii]*. Moscow; 2022: 145–7. (in Russian)
30. Yatsentyuk S.P., Pchelnikov A.V., Safina E.R., Krasnikova M.S. The first study on the occurrence of bovine herpesviruses in the wild fauna of the Moscow region, Russia. *Vet. World.* 2022; 15(8): 2052–8. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.2052-2058>
31. Lyaku J.R., Vilcek S., Nettleton P.F., Marsden H.S. The distinction of serologically related ruminant alphaherpesviruses by the polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease analysis. *Vet. Microbiol.* 1996; 48(1-2): 135–42. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(95\)00136-0](https://doi.org/10.1016/0378-1135(95)00136-0)
32. Ros C., Riquelme M.E., Forslund K.O., Belák S. Improved detection of five closely related ruminant alphaherpesviruses by specific amplification of viral genomic sequences. *J. Virol. Methods.* 1999; 83(1-2): 55–65. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(99\)00103-2](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(99)00103-2)

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-168>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023



Противовирусная активность водного экстракта базидиального гриба *Inonotus obliquus* в отношении вируса SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Betacoronavirus: Sarbecovirus) в экспериментах *in vivo* на мышах линии BALB/c

Шиповалов А.В., Кудров Г.А., Карташов М.Ю., Драчкова И.А., Пьянков О.В., Омигов В.В., Таранов О.С., Теплякова Т.В.

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Введение. Продолжающаяся пандемия COVID-19 в сочетании с сезонными вспышками респираторных вирусных инфекций требует направленной противовирусной профилактики общеукрепляющими, иммуностимулирующими препаратами. В ряду малотоксичных, но в то же время активных в отношении нескольких вирусов одновременно препаратов выделяют соединения природного происхождения. Одним из самых известных является водный экстракт базидиального гриба *Inonotus obliquus*, плодовое тело которого носит название чага. **Цель работы** – изучение *in vivo* противовирусной активности экстракта базидиального гриба *I. obliquus* в отношении вируса SARS-CoV-2.

Материалы и методы. В качестве исследуемого соединения применяли образец (20-17) экстракта базидиального гриба *I. obliquus*. В работе использовали штамм геноварианта омикрон BA.5.2 вируса SARS-CoV-2. Эксперименты проводили на мышах BALB/c, полученных из питомника ФБУН ГНЦ БВ «Вектор» Роспотребнадзора. Вирусная нагрузка SARS-CoV-2 была определена с помощью количественной ПЦР-РВ с обратной транскрипцией. Тяжесть поражения тканей лёгких оценивали гистологическими методами.

Результаты. Определена оптимальная концентрация водного экстракта базидиального гриба *I. obliquus* для внутрижелудочного введения мелким лабораторным животным. Изучена противовирусная активность водного экстракта базидиального гриба *I. obliquus* в отношении генетического варианта омикрон BA.5.2 вируса SARS-CoV-2 на модели инбредных мышей линии BALB/c. Определены максимальные значения вирусной нагрузки в тканях лёгких экспериментальных животных через 72 ч после интраназального инфицирования в дозе 2,85 lg ЦПД₅₀. Методом количественной ПЦР-РВ определено достоверное снижение вирусной нагрузки относительно контроля на 4,65 и 5,72 lg копий/мл в тканях лёгких и носовой полости соответственно. Гистологическими методами выявлена зависимость уменьшения количества и частоты наблюдаемых патоморфологических изменений тканей лёгких мышей с введением исследуемого соединения.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения водного экстракта базидиального гриба *I. obliquus* в качестве профилактического средства против циркулирующих геновариантов вируса SARS-CoV-2.

Ключевые слова: COVID-19; вирус SARS-CoV-2; противовирусная активность; базидиомицеты; *Inonotus obliquus*; мыши BALB/c

Для цитирования: Шиповалов А.В., Кудров Г.А., Карташов М.Ю., Драчкова И.А., Пьянков О.В., Омигов В.В., Таранов О.С., Теплякова Т.В. Противовирусная активность водного экстракта базидиального гриба *Inonotus obliquus* в отношении вируса SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Betacoronavirus: Sarbecovirus) в экспериментах *in vivo* на мышах линии BALB/c. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(2): 152-160. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-168> EDN: <https://elibrary.ru/gewqpk>

Для корреспонденции: Шиповалов Андрей Владимирович, научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов», ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: shipovalov_av@vector.nsc.ru

Участие авторов: Шиповалов А.В. – проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи; Кудров Г.А. – интерпретация данных, подготовка текста статьи; Карташов М.Ю. – интерпретация данных, подготовка текста статьи; Драчкова И.А. – сбор, анализ и интерпретация данных; Пьянков О.В. – руководство исследованиями; Омигов В.В. – сбор, анализ и интерпретация данных; Таранов О.С. – руководство исследованиями; Теплякова Т.В. – концепция и дизайн исследования, руководство исследованиями, участие в подготовке статьи для публикации.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

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). Все процедуры экспериментов *in vivo* были рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (протокол № 3 от 15.06.2021).

Поступила 07.03.2023
Принята в печать 19.04.2023
Опубликована 30.04.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-168>

Antiviral activity of basidial fungus *Inonotus obliquus* aqueous extract against SARS-CoV-2 virus (Coronaviridae: Betacoronavirus: Sarbecovirus) *in vivo* in BALB/c mice model

Andrey V. Shipovalov, Gleb A. Kudrov, Mikhail Yu. Kartashov, Irina A. Drachkova, Oleg V. Pyankov, Vladimir V. Omigov, Oleg S. Taranov, Tamara V. Teplyakova

State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

Introduction. The COVID-19 pandemic combined with seasonal epidemics of respiratory viral diseases requires targeted antiviral prophylaxis with restorative and immunostimulant drugs. The compounds of natural origin are low-toxic, but active against several viruses at the same time. One of the most famous compounds is *Inonotus obliquus* aqueous extract. The fruit body of basidial fungus *I. obliquus* is called Chaga mushroom.

The aim of the work – was to study the antiviral activity of *I. obliquus* aqueous extract against the SARS-CoV-2 virus *in vivo*.

Materials and methods. Antiviral activity of *I. obliquus* aqueous extract sample (#20-17) was analyzed against strain of SARS-CoV-2 Omicron BA.5.2 virus. The experiments were carried out in BALB/c inbred mice. The SARS-CoV-2 viral load was measured using quantitative real-time PCR combined with reverse transcription. The severity of lung tissue damage was assessed by histological methods.

Results. The peak values of the viral load in murine lung tissues were determined 72 hours after intranasal inoculation at dose of 2,85 lg TCID₅₀. The quantitative real-time PCR testing has shown a significant decrease in the viral load compared to the control group by 4,65 lg copies/ml and 5,72 lg copies/ml in the lung tissue and nasal cavity samples, respectively. Histological methods revealed that the decrease in the number and frequency of observed pathomorphological changes in murine lung tissues depended on the introduction of the compound under study.

Conclusion. The results obtained indicate the possibility of using basidial fungus *Inonotus obliquus* aqueous extract as a preventive agent against circulating variants of SARS-CoV-2 virus.

Keywords: COVID-19; SARS-CoV-2 virus; antiviral activity; basidiomycetes; *Inonotus obliquus*; BALB/c mice

For citation: Shipovalov A.V., Kudrov G.A., Kartashov M.Yu., Drachkova I.A., Pyankov O.V., Omigov V.V., Taranov O.S., Teplyakova T.V. Antiviral activity of basidial fungus *Inonotus obliquus* aqueous extract against SARS-CoV-2 virus (Coronaviridae: Betacoronavirus: Sarbecovirus) *in vivo* in BALB/c mice model. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(2): 152-160 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-168> EDN: <https://elibrary.ru/gewqpk>

For correspondence: Andrey V. Shipovalov, Researcher, Department "Collection of microorganisms", State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: shipovalov_av@vector.nsc.ru

Information about the authors:

Shipovalov A.V., <https://orcid.org/0000-0003-1201-8307>

Kudrov G.A., <https://orcid.org/0000-0002-8251-7040>

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

Drachkova I.A., <https://orcid.org/0000-0002-2522-1657>

Pyankov O.V., <https://orcid.org/0000-0003-3340-8750>

Omigov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-2028-6099>

Taranov O.S., <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>

Teplyakova T.V., <https://orcid.org/0000-0003-4754-5051>

Contribution: Shipovalov A.V. – conducting of the experiments, collection, analysis, and interpretation of the data, writing original draft of the article; Kudrov G.A. – interpretation of the data, writing and editing original draft of the article; Kartashov M.Yu. – interpretation of the data, writing and editing original draft of the article; Drachkova I.A. – collection, analysis, and interpretation of the data; Pyankov O.V. – supervision; Omigov V.V. – collection, analysis, and interpretation of the data; Taranov O.S. – supervision; Teplyakova T.V. – concept and design of the study, supervision, editing original draft of the article.

Funding. The research was funded by the state budget.

Conflict of interest. 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, July 23, 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector" (protocol No. 3 dated July 15, 2021).

Received 07 March 2023

Accepted 19 April 2023

Published 30 April 2023

Введение

Первый случай выявления нового коронавируса SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Betacoronavirus: Sarbecovirus) был зарегистрирован в Ухане, КНР, в декабре 2019 г. [1]. Вирус быстро распространился по всему земному шару, вызвав пандемию. Болезнь, вызванная вирусом SARS-CoV-2, получила название COVID-19. Общими клиническими проявлениями данного заболевания являются лихорадка, сухой кашель, у ряда пациентов – одышка, мышечные и (или) суставные боли, головная боль головокружение, снижение вкуса и обоняния, диарея и тошнота. Кроме того, чрезмерная активация иммунных и воспалительных реакций хозяина может привести к обширному высвобождению цитокинов («цитокиновый шторм»), вызывая полиорганное повреждение [2]. У небольшой группы пациентов развивается острый респираторный дистресс-синдром, характеризующийся затруднённым дыханием и низким уровнем кислорода в крови, что может привести к дыхательной недостаточности [3]. Примерно 1% от общего числа зарегистрированных случаев инфицирования заканчивается летальным исходом [4]. Несмотря на снижение патогенности у вновь выявляемых геновариантов коронавируса [5], существует острая потребность в терапевтических и особенно профилактических противовирусных препаратах.

Задокументированы случаи сочетанного инфицирования различными респираторными вирусами пациентов с COVID-19 [6]. При полиэтиологичных острых респираторных вирусных инфекциях (ОРВИ) показано применение иммуностимулирующих, активирующих неспецифические механизмы иммунного ответа препаратов, обладающих широким спектром противовирусного действия [7, 8].

Широко известным природным препаратом, используемым для неспецифической противовирусной профилактики, является водный экстракт плодового тела базидиомицета *Inonotus obliquus*, более известного как чага. Данный экстракт содержит широкий спектр различных биологически активных соединений [9–11]. Показана противовирусная активность данного препарата в отношении ряда вирусов человека [12–15].

Ранее высказанное предположение о наличии ингибирующего действия водных экстрактов *I. obliquus* на репликацию коронавируса SARS-CoV-2 [16, 17] позднее было подтверждено *in vitro* в перевиваемой культуре клеток Vero E6 [18, 19]. С целью углублённого изучения противовирусной активности водных экстрактов базидиомицетов нами было проведено исследование эффективности *in vivo*.

Несмотря на то что приматы являются наиболее адекватными моделями для изучения ранних стадий COVID-19 у людей [20], использование более мелких животных также применимо при проведении доклинических и клинических исследований эффективности противовирусных препаратов. Возможность моделирования инфекции SARS-CoV-2 на мышцах линии BALB/c была описана ранее [21] и использована нами в данной работе.

Материалы и методы

Соединения. В эксперименте использовали водный экстракт базидиального гриба *I. obliquus* (образец 20-17), полученный по описанной ранее методике [22].

Вирусы. В работе использовали штамм генетического варианта омикрон BA.5.2 вируса SARS-CoV-2 hCoV-19/Russia/MOS-SRC-49415/2022 (EPI_ISL_16613436), полученный из Государственной коллекции микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Инфекционный вирус выделяли в культуре клеток Vero E6, аликвоты вируса были заморожены и хранились при температуре –80 °С. Титр стока составлял не менее 10⁶ ЦПД₅₀/мл. Для исследований использовался 4-й пассаж вируса. Титр вирусной суспензии определяли методом конечных разведений на клетках Vero E6 по методу Рида и Менча [23].

Культуры клеток. В работе использовали линию клеток Vero E6, полученную из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Выращивание монослоя клеток Vero E6 осуществляли в среде DMEM (Gibco, США) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США) и комплексного антибиотика (Gibco, США). В качестве поддерживающей среды при культивировании вируса использовали ту же среду, но с 2% эмбриональной сывороткой.

Животные. В экспериментах использовали мышей инбредной линии BALB/c (*Mus musculus strain BALB/c*). В работе использовали самцов с массой тела 18–20 г. Животные были получены из питомника лабораторных животных ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Мыши содержались в индивидуально вентилируемых садках и имели неограниченный доступ к пище и воде. Акклиматизация к условиям эксперимента была проведена в течение 7 дней до заражения. Во время экспериментов в садках поддерживалась температура 22–24 °С, а относительная влажность – 40–55%.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение национальных¹ и международных руководящих принципов по уходу и гуманному использованию животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010) [24–26]. Все процедуры экспериментов *in vivo* были рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (заявка ГНЦ ВБ «Вектор»/07-06.2021, утверждена протоколом БЭК № 3 от 15.06.2021).

¹ГОСТ 33215-2014. Межгосударственный стандарт. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур / GOST 33215-2014. Guidelines for accommodation and care of animals. Environment, housing and management; ГОСТ 33216-2014. Межгосударственный стандарт. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами / GOST 33216-2014. Guidelines for accommodation and care of animals. Species-specific provisions for laboratory rodents and rabbits.

Изучение токсичности экстракта базидиально-го гриба *I. obliquus*. В эксперименте был исследован экстракт базидиального гриба *I. obliquus* в концентрации 2 мг/мл. Оценку токсичности проводили согласно общепринятой методике [27].

Мышам линии BALB/c, самцам ($n = 8$) и самкам ($n = 8$), перорально вводили водный экстракт базидиального гриба *I. obliquus* в объёме 100 мкл на голову 2 раза в день в течение 5 суток, после чего за мышами наблюдали в течение двух недель.

Исследование эффективности водного экстракта *I. obliquus* в отношении вируса SARS-CoV-2. В работе использовали две группы животных (1 опытная и 1 контрольная) по 16 мышей в каждой.

Внутрижелудочное введение препарата мышам BALB/c проводилось по лечебно-профилактической схеме каждые 12 ч в течение 10 суток. Объём одномоментно вводимого препарата – 100 мкл. На 7-е сутки от начала эксперимента животных инфицировали интраназально. Препараты вводились за 1 ч до заражения и через 11 ч после, далее – каждые 12 ч. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор.

Инфицирование предварительно анестезированных Zoletil 100 (Virbac, Франция) животных производили интраназально инокуляцией вируса пипеткой в объёме 20 мкл в дозе 50 ИД₅₀. Через 72 ч после инфицирования всех животных подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации, после чего производили отбор тканей носовой полости и лёгких. Полученные с помощью механического гомогенизатора (FastPrep-24, MP Biomedicals, США) 10% гомогенаты тканей осветляли путём центрифугирования при 6000 об/мин (Eppendorf MiniSpin plus, Германия). Аликвоты осветлённых образцов использовали для анализа ПЦР (полимеразная цепная реакция). Затем гомогенаты подвергали немедленной заморозке и хранению при температуре $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Определение РНК вируса SARS-CoV-2 в биологических образцах методом количественного ПЦР-РВ. Для выделения РНК использовали набор «РИБО-преп» («АмплиСенс», Россия). Синтез комплементарной ДНК (кДНК) из выделенной РНК проводили реагентами для реакции обратной транскрипции «Реверта-Л» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия) согласно инструкции производителя.

Для количественного определения РНК вируса SARS-CoV-2 использовали набор реагентов «Вектор-ПЦРrv-nCoV-RG» (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия). Амплификацию проводили на приборе Rotor Gene 6000 (BioRad, США) с детекцией наработки ПЦР-продукта по каналу FAM.

Стандартная кривая, установленная между логарифмом концентраций вирусной кДНК и пороговым значением Ct (Cycle threshold), была получена путём 10-кратного последовательного разведения образцов внутреннего положительного контроля (ПКО), поставляемых с соответствующим набором для ПЦР. Образец ПКО представляет собой раствор рекомбинантной бактериальной плазмиды, содержащей

вставку ДНК, комплементарную фрагменту гена *lab* вируса SARS-CoV-2. Начальная концентрация плазмиды составляла 10^6 копий/реакция, конечная концентрация – 0,1 копий/реакция. Значения Ct были получены по двум флуоресцентным каналам: для вирусной кДНК и для ПКО. Вирусную нагрузку измеряли по значениям Ct вирусной кДНК, масштабированным относительно значений Ct ПКО.

Гистологические исследования. Забор органов от инфицированных животных осуществляли через 72 ч после заражения. Образцы фиксировали в 10% растворе забуференного формалина («БиоВитрум», Россия) для гистологических исследований в течение 48 ч. Обработку материала проводили по общепринятой методике: последовательное обезвоживание в этиловом спирте возрастающей концентрации, пропитывание в смеси ксилола–парафина и заливка в парафиновые блоки. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм готовили с помощью автоматического ротационного микротомы НМ-360 (Германия). Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Светооптическое исследование и микрофотосъёмку проводили на микроскопе AxioImager Z1 (Zeiss, Германия) с использованием программного пакета AxioVision 4.8.2 этого же производителя. Распространённость и степень выраженности патологических проявлений инфекционного процесса оценивали при анализе сканов серийных срезов, полученных на цифровом сканере микропрепаратов Olympus SlideView VS200 (Olympus, Германия; программный пакет VS200ASW 3.2).

Статистика. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы Statistica 13.0. Для парного сравнения экспериментальной и контрольной группы применяли U-критерий Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

Для оценки токсичности были использованы 16 мышей BALB/c (самцы и самки), получавшие перорально водный экстракт базидиального гриба *I. obliquus* в концентрации 2 мг/мл в объёме 100 мкл на голову 2 раза в день в течение 5 суток. За время наблюдения (в течение 2 недель) экспериментальные животные не теряли в массе, более того, среднегрупповой прирост массы составил 9,2–10,6%. У животных не наблюдались анорексия, дегидратация (обезвоживание), аномальные выделения, гиперактивность, увеличение периодов неподвижности и сна, увеличение вокализации, самовредительство, агрессивное-оборонительное поведение, социальная изоляция. Гибель животных за всё время наблюдения не фиксировалась. Это свидетельствует о том, что исследуемый препарат не проявляет токсичности в применяемой схеме лечения.

Водный экстракт базидиального гриба *I. obliquus* (в концентрации 2 мг/мл) был использован в эксперименте по изучению противовирусной активности как не вызывающий токсического эффекта на организм мыши.

После инфицирования животных контроль клинического состояния проводился ежедневно и включал осмотр и измерение массы тела каждой мыши.

У животных наблюдалась незначительная потеря массы – около 5%, что нельзя отнести к значимому показателю тяжести инфекционного процесса при COVID-19. Никаких других признаков болезни или дистресса у мышей в любой момент времени после заражения отмечено не было.

Через 72 ч после инфицирования методом количественной ПЦР-РВ (в реальном времени) была измерена вирусная нагрузка в образцах 10% гомогенатов тканей лёгких и носовой полости животных контрольной и экспериментальной групп и представлена в графическом виде на **рис. 1**.

Концентрация вирусной РНК в тканях носовой полости животных экспериментальной и контрольной групп была значительно выше (3,73 и 5,72 lg копий/мл), чем в тканях лёгких (2,42 и 4,65 lg копий/мл).

Вирусная нагрузка значимо снижалась у животных экспериментальной группы относительно контроля на 4,65 и 5,72 lg копий/мл в тканях лёгких (**рис. 1 а**) и носовой полости (**рис. 1 б**) соответственно.

Другим показателем эффективности противовирусного препарата является снижение тяжести поражения тканей лёгкого инфицированного животного. Для изучения патоморфологических изменений тканей лёгких мышей контрольной и экспериментальной группы были проанализированы гистологические препараты, полученные от животных на пике инфекции. В результате исследования выявили ряд патологических изменений: дистелектаз, диффузные кровоизлияния, единичные лимфоцитарные инфильтраты (**рис. 2**).

У большинства животных контрольной группы отмечалось умеренное снижение воздушности лёгочной ткани по типу дистелектаза. В целом по группе такие участки занимали приблизительно 70% площади паренхимы. На фоне заметной гиперемии капилляров межальвеолярных стенок практически в каждом исследованном образце наблюдались локусы

умеренно выраженной воспалительной клеточной инфильтрации. Клеточный состав инфильтратов был представлен преимущественно лимфоидными элементами при участии немногочисленных нейтрофильных гранулоцитов. У 8 животных лейкоциты, наряду с диффузным распределением по паренхиме, концентрировались вокруг отдельных кровеносных сосудов, демонстрируя тенденцию к васкулиту. Бронхи оставались без видимых изменений.

На гистологических препаратах тканей лёгких животных экспериментальной группы также прослеживалось снижение воздушности лёгочной ткани в пределах степени дистелектаза. Суммарно при визуальной оценке дистелектазы занимали площадь менее половины (47%). У 6 животных обнаруживались умеренно выраженные признаки очаговой воспалительной клеточной инфильтрации. Лимфоидные элементы и нейтрофилы просматривались главным образом в проекции межальвеолярных стенок. Концентрация лейкоцитов вокруг сосудов и бронхов не отмечалась. В препаратах лёгких остальных животных (в количестве 10) не наблюдалось структурных изменений, выходящих за рамки артефициальных. Таким образом, только у 6 из 16 животных наблюдалась умеренная воспалительная клеточная реакция, в то время как у 10 оказалась практически нормальной микроструктура лёгких.

Обсуждение

Среди известных профилактических препаратов, обладающих противовирусной активностью, водные экстракты *I. obliquus* характеризуются предельно низкой токсичностью. Острая токсичность проявляется при внутрибрюшинном введении экстракта в концентрациях порядка 20 мг/мл сухого вещества. Однако, такие концентрации сухого вещества для водных экстрактов на практике не достижимы без использования специальных способов экстракции [28]. В нашем эксперименте был использован водный экстракт *I. obliquus* в минимальной из использованных ранее в исследованиях *in vivo* концентрации 2 мг/мл [15, 28].

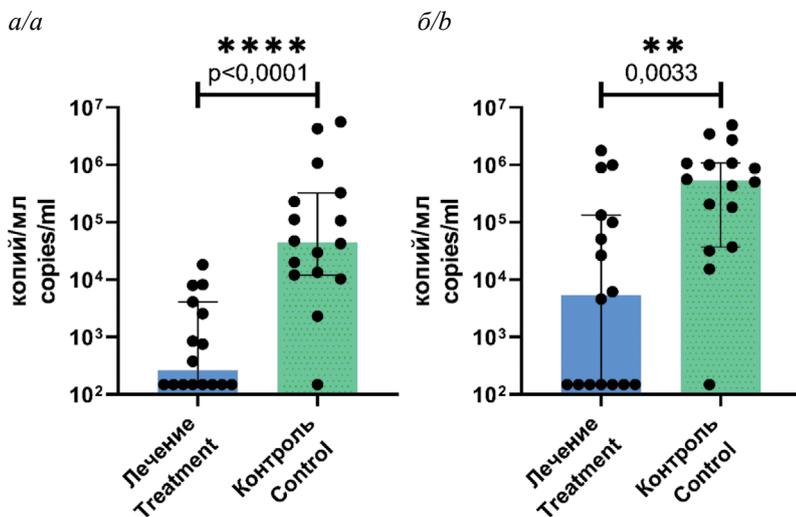


Рис. 1. Вирусная нагрузка в образцах 10% гомогенатов тканей лёгких (а) и носовой полости (б) мышей линии BALB/c на 4-е сутки после интраназальной инокуляции геновариантом омикрон BA.5.2 вируса SARS-CoV-2. Вирусная нагрузка выражена в lg копий/мл. Индивидуальные значения представлены точками, 95% доверительный интервал – вертикальной линией. Значения *p* над скобками представляют собой тест Манна–Уитни, сравнение группы терапии с контролем.

Fig. 1. Viral load in 10% lung tissue homogenate samples (a) and nasal cavity samples (b) of BALB/c mice on day 4 after intranasal inoculation with Omicron BA.5.2 variant of SARS-CoV-2 virus. The viral load is expressed in lg copies/ml. Individual values are shown by dots, 95% confidence interval is shown by a vertical line. The *p* values above the brackets represent the comparison between the therapy group and the control group using Mann–Whitney test.

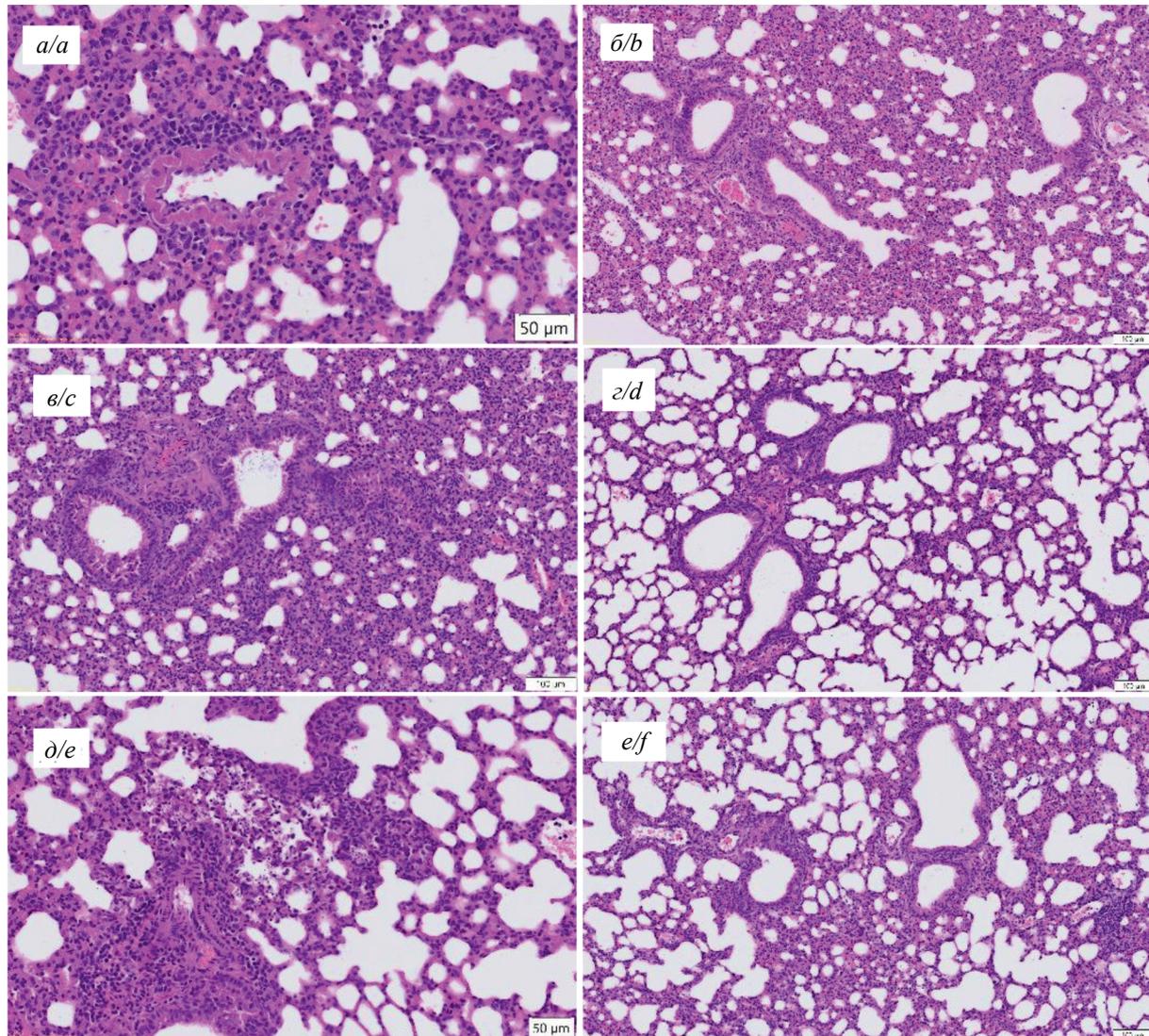


Рис. 2. Гистологические срезы лёгких мышей BALB/c, инфицированных вирусом SARS-CoV-2. Окраска – гематоксилин и эозин. Контрольная группа: *a* – снижение воздушности лёгочной паренхимы (дистелектаз), периваскулярная воспалительноклеточная инфильтрация; *e* – область резкого снижения воздухонаполнения лёгкого (дистелектаз), бронхи без изменений; *d* – очаг воспаления с клеточным детритом – на микроснимке в центре, рядом сосуд в состоянии периваскулярной инфильтрации (внизу слева). Экспериментальная группа: *b* – гиперемия сосудов, снижение воздухонаполнения паренхимы, бронхи не изменены; *z* – паренхима в состоянии нормального воздухонаполнения, мелкий локус отёка; *e* – зона умеренного снижения воздушности на фоне сосудистой гиперемии, бронхи не изменены.

Fig. 2. Histological sections of the lungs of BALB/c mice infected SARS-CoV-2 virus. Hematoxylin and eosin staining. Control group: *a* – decrease in the airiness of the pulmonary parenchyma (distelectasis), perivascular inflammatory cell infiltration; *c* – area of a sharp decrease in lung air filling (distelectasis), bronchi are unchanged; *e* – focus of inflammation with cellular detritus – on a micrograph in the center, next to a vessel in a state of perivascular infiltration (bottom left). Experimental group: *b* – vascular hyperemia, decreased air filling of the parenchyma, bronchi unchanged; *d* – parenchyma in a state of normal air filling, small edema locus; *f* – zone of moderate decrease in airiness against the background of vascular hyperemia, bronchi are unchanged.

Водные экстракты высших базидиомицетов представляют собой комплекс иммуностимулирующих биологически активных веществ [7–16]. Согласно данным молекулярного моделирования (докинга), некоторые из них, такие как бета-глюкан, галактоманнан, бетулиновая кислота и уникальный терпеноид *I. obliquus* инонотузан С, могут непосредственно взаимодействовать с поверхностными белками вируса, снижая аффинность к рецепторам клетки-хозяина [17, 29]. Однако вирусу SARS-

CoV-2 свойственна высокая изменчивость, влияющая в первую очередь на структуру поверхностного S-белка. Изменение его конформации и аффинности обуславливает особенности инфекционного процесса и влияет на тяжесть клинических проявлений. В связи с этим ингибирование взаимодействия вируса с рецептором ACE2 (ангиотензинпревращающим ферментом 2) клетки-хозяина является одной из стратегий при разработке противовирусных препаратов.

Появление и быстрое распространение генетического варианта вируса SARS-CoV-2 омикрон, имеющего более 30 мутаций в S-белке, вызвало предположения о возможном уменьшении чувствительности к соединениям, используемым в профилактике и терапии [30]. В этом случае очевидна необходимость использования актуальных штаммов коронавируса при изучении противовирусной активности перспективных препаратов. В этом эксперименте нами был использован штамм одного из основных циркулирующих геновариантов омикрон BA.5.2.

До начала эксперимента мы охарактеризовали инфекционный процесс, вызванный вирусом SARS-CoV-2, у мышей линии BALB/c, выявили основные показатели тяжести заболевания с целью использования этой модели для оценки эффективности противовирусных препаратов [31]. Геновариант омикрон BA.5.2 вируса SARS-CoV-2 эффективно реплицируется в респираторном тракте мышей линии BALB/c, причём в тканях лёгкого вирусная РНК обнаруживается на высоком уровне через 72 ч после заражения [32]. Кроме того, вирусная нагрузка в тканях носовой полости животных значительно выше, чем в тканях лёгких. Эта закономерность характерна для инфекционного процесса, вызванного геновариантами омикрон [33].

В нашем исследовании было показано достоверное системное вирусингибирующее действие водного экстракта чаги при пероральном введении. Пропорциональное снижение вирусной нагрузки как в тканях лёгких, так и в носовой полости свидетельствует о высокой биодоступности водного экстракта *I. obliquus*.

Полученные данные свидетельствуют о том, что водный экстракт, выделенный из высшего базидиомицета *I. obliquus*, обладает противовирусной активностью в отношении вируса SARS-CoV-2 не только в инфицированных клетках почки зелёной мартовки (клеточная линия Vero E6) [19], но и в эксперименте на мелких млекопитающих.

Заключение

При пероральном введении экстракта *I. obliquus* мышам линии BALB/c по лечебно-профилактической схеме наблюдали эффективное подавление репликации вируса в тканях носовой полости и лёгких. Снижение вирусной нагрузки на слизистых носа уменьшает вероятность передачи возбудителя заболевания, что является важным показателем противовирусного действия препаратов в условиях проведения противоэпидемических мероприятий по недопущению распространения COVID-19. Кроме того, при анализе гистологических препаратов тканей лёгких (основного органа-мишени при ОРВИ) было выявлено, что патоморфологические повреждения, характерные для инфекционного процесса, вызванного вирусом SARS-CoV-2, менее выражены у животных экспериментальной группы. Введение лабораторным животным водного экстракта *I. obliquus* эффективно защищает лёгкие, снижая вирусную нагрузку, степень развития патологии в них и, как следствие, риск развития тяжёлой формы COVID-19.

Таким образом, водный экстракт, выделенный из высшего базидиомицета *I. obliquus* и сочетающий низкую токсичность и высокую противовирусную активность, может рассматриваться как профилактическое средство против циркулирующих вариантов вирусов SARS-CoV-2.

ЛИТЕРАТУРА

- Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., et al. Novel Coronavirus Investigating and Research Team, A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(8): 727–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
- Zhang B., Zhou X., Qiu Y., Song Y., Feng F., Feng J., et al. Clinical characteristics of 82 death cases with COVID-19. *PLoS One.* 2020; 15(7): e0235458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235458>
- Tay M.Z., Poh C.M., Rénia L., MacAry P.A., Ng L.F.P. The trinity of COVID-19: Immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.* 2020; 20(6): 363–74. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>
- WHO. Coronavirus disease (COVID-19) dashboard; 2023. Available at: <https://covid19.who.int>
- Акимкин В.Г., Семенов Т.А., Углева С.В., Дубоделов Д.В., Кузин С.Н., Яцышина С.Б. и др. COVID-19 в России: эпидемиология и молекулярно-генетический мониторинг. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2022; 77(4): 254–60. <https://doi.org/10.15690/vramn2121> EDN: <https://elibrary.ru/doijs>
- Киселева И.В., Ларионова Н.В., Григорьева Е.П., Ксенафонтов А.Д., Аль Фарух М.А., Руденко Л.Г. Особенности циркуляции респираторных вирусов в пред- и пандемические периоды гриппа и COVID-19. *Инфекция и иммунитет.* 2021; 11(6): 1009–19. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-SFO-1662> EDN: <https://elibrary.ru/higkam>
- Bimonte S., Crispo A., Amore A., Celentano E., Cuomo A., Cascella M. Potential antiviral drugs for SARS-Cov-2 treatment: pre-clinical findings and ongoing clinical research. *In Vivo.* 2020; 34(3 Suppl.): 1597–602. <https://doi.org/10.21873/invivo.11949>
- Hamza A., Ghanekar S., Kumar D.S. Current trends in health-promoting potential and biomaterial applications of edible mushrooms for human wellness. *Food Biosci.* 2022; 51: 102290. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102290>
- Теплякова Т.В., Косога Т.А. *Высшие грибы Западной Сибири – перспективные объекты для биотехнологии лекарственных препаратов.* Новосибирск; 2014.
- Martel J., Ko Y.F., Ojcius D.M., Lu C.C., Chang C.J., Lin C.S., et al. Immunomodulatory properties of plants and mushrooms. *Trends Pharmacol. Sci.* 2017; 38(11): 967–81. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.07.006>
- Lu Y., Jia Y., Xue Z., Li N., Liu J., Chen H. Recent developments in *Inonotus obliquus* (Chaga mushroom) polysaccharides: Isolation, structural characteristics, biological activities and application. *Polymers.* 2021; 13(9): 1441. <https://doi.org/10.3390/polym13091441>
- Pan H.H., Yu X.T., Li T., Wu H.L., Jiao C.W., Cai M.H., et al. Aqueous extract from a Chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (higher basidiomycetes), prevents herpes simplex virus entry through inhibition of viral-induced membrane fusion. *Int. J. Med. Mushrooms.* 2013; 15(1): 29–38. <https://doi.org/10.1615/intjmedmushr.v15.i1.40>
- Носик Д.Н., Носик Н.Н., Теплякова Т.В., Лобач О.А., Киселева И.А., Кондрашина Н.Г. и др. Противовирусная активность экстрактов базидиомицетов и гуминовых соединений в отношении вируса иммунодефицита человека (Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus 1) и вируса простого герпеса (Herpesviridae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1). *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(5): 276–83. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-5-4> EDN: <https://elibrary.ru/hfbppn>
- Теплякова Т.В., Ильичева Т.Н., Маркович Н.А. Перспективы создания препаратов против гриппа на основе лекарственных грибов (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология.* 2020; 56(5): 409–18. <https://doi.org/10.31857/S0555109920050141> EDN: <https://elibrary.ru/tnqiiib>
- Garber A., Barnard L., Pickrell C. Review of whole plant extracts with activity against herpes simplex viruses in vitro and in vivo.

REFERENCES

- J. Evid. Based. Integr. Med.* 2021; 26: 2515690X20978394. <https://doi.org/10.1177/2515690X20978394>
- Chun S., Gopal J., Muthu M. Antioxidant activity of mushroom extracts/polysaccharides—Their antiviral properties and plausible antiCOVID-19 properties. *Antioxidants*. 2021; 10(12): 1899. <https://doi.org/10.3390/antiox10121899>
 - Eid J.I., Das B., Al-Tuwaijri M.M., Basal W.T. Targeting SARS-CoV-2 with Chaga mushroom: An in silico study toward developing a natural antiviral compound. *Food Sci. Nutr.* 2021; 9(12): 6513–23. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2576>
 - Arunachalam K., Sasidharan S.P., Yang X. A concise review of mushrooms antiviral and immunomodulatory properties that may combat against COVID-19. *Food Chem. Adv.* 2022; 1: 100023. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100023>
 - Teplyakova T.V., Pyankov O.V., Safatov A.S., Ovchinnikova A.S., Kosogova T.A., Skarnovich M.O., et al. Water extract of the Chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (Agaricomycetes), inhibits SARS-CoV-2 replication in vero E6 and vero cell culture experiments. *Int. J. Med. Mushrooms*. 2022; 24(2): 23–30. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2021042012>
 - Rockx B., Kuiken T., Herfst S., Bestebroer T., Lamers M.M., Oude Munnink B.B., et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science*. 2020; 368(6494): 1012–5. <https://doi.org/10.1126/science.abb7314>
 - Gu H., Chen Q., Yang G., He L., Fan H., Deng Y.Q., et al. Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy. *Science*. 2020; 369(6511): 1603–7. <https://doi.org/10.1126/science.abc4730>
 - Теплякова Т.В., Пьянков О.В., Скарнович М.О. Ингибитор репликации коронавируса SARS-CoV-2 на основе водного экстракта гриба *Inonotus obliquus*. Патент РФ № 2741714 C1; 2021.
 - Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27(3): 493–7. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
 - FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab. Anim.* 2014; 48(3): 178–92. <https://doi.org/10.1177/0023677213516312>
 - Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington: National Academies Press; 2011. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050>
 - American Veterinary Medical Association. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. Available at: <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf>
 - Миронов А.Н., Бунатян Н.Д., Васильев А.Н. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. М.: Гриф и К; 2012.
 - Разумов И.А., Казачинская Е.И., Пучкова Л.И., Косогова Т.А., Горбунова И.А., Локтев В.Б. и др. Протективная активность водных экстрактов из высших грибов при экспериментальной герпесвирусной инфекции у белых мышей. *Антибиотики и химиотерапия*. 2013; 58(9-10): 8–12. EDN: <https://elibrary.ru/nfgjex>
 - Basal W.T., Elfiky A., Eid J. Chaga medicinal mushroom *Inonotus obliquus* (Agaricomycetes) terpenoids may interfere with SARS-CoV-2 spike protein recognition of the host cell: a molecular docking study. *Int. J. Med. Mushrooms*. 2021; 23(3): 1–14. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2021037942>
 - Zhou H., Møhlenberg M., Thakor J.C., Tuli H.S., Wang P., Assaraf Y.G., et al. Sensitivity to vaccines, therapeutic antibodies, and viral entry inhibitors and advances to counter the SARS-CoV-2 Omicron variant. *Clin. Microbiol. Rev.* 2022; 35(3): e00014–22. <https://doi.org/10.1128/cmr.00014-22>
 - Шиповалов А.В., Кудров Г.А., Томилов А.А., Боднев С.А., Болдырев Н.Д., Овчинникова А.С. и др. Изучение восприимчивости линий мышей к вызывающим обеспокоенность вариантам вируса SARS-CoV-2. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; (1): 148–55. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-1-148-155>
 - Zhang Y.N., Zhang Z.R., Zhang H.Q., Li N., Zhang Q.Y., Li X.D., et al. Different pathogenesis of SARS-CoV-2 Omicron variant in wild-type laboratory mice and hamsters. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022; 7(1): 62. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00930-2>
 - Halfmann P.J., Iida S., Iwatsuki-Horimoto K., Maemura T., Kiso M., Scheaffer S.M., et al. SARS-CoV-2 Omicron virus causes attenuated disease in mice and hamsters. *Nature*. 2022; 603(7902): 687–92. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04441-6>
 - Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., et al. Novel Coronavirus Investigating and Research Team, A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020; 382(8): 727–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>
 - Zhang B., Zhou X., Qiu Y., Song Y., Feng F., Feng J., et al. Clinical characteristics of 82 death cases with COVID-19. *PLoS One*. 2020; 15(7): e0235458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235458>
 - Tay M.Z., Poh C.M., Rénia L., MacAry P.A., Ng L.F.P. The trinity of COVID-19: Immunity, inflammation and intervention. *Nat. Rev. Immunol.* 2020; 20(6): 363–74. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8.4>
 - WHO. Coronavirus disease (COVID-19) dashboard; 2023. Available at: <https://covid19.who.int>
 - Akimkin V.G., Semenenko T.A., Ugleva S.V., Dubodelov D.V., Kuzin S.N., Yatsyshina S.B., et al. COVID-19 in Russia: epidemiology and molecular genetic monitoring. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk*. 2022; 77(4): 254–60. EDN: <https://elibrary.ru/dozijs> <https://doi.org/10.15690/vramn2121> (in Russian)
 - Kiseleva I.V., Larionova N.V., Grigor'eva E.P., Ksenafontov A.D., Al' Farrukh M.A., Rudenko L.G. Salient features of circulating respiratory viruses in the pre- and pandemic influenza and COVID-19 seasons. *Infektsiya i immunitet*. 2021; 11(6): 1009–19. EDN: <https://elibrary.ru/higkam> <https://doi.org/10.15789/2220-7619-SFO-1662> (in Russian)
 - Bimonte S., Crispo A., Amore A., Celentano E., Cuomo A., Cascella M. Potential antiviral drugs for SARS-Cov-2 treatment: pre-clinical findings and ongoing clinical research. *In Vivo*. 2020; 34(3 Suppl.): 1597–602. <https://doi.org/10.21873/invivo.11949>
 - Hamza A., Ghanekar S., Kumar D.S. Current trends in health-promoting potential and biomaterial applications of edible mushrooms for human wellness. *Food Biosci.* 2022; 51: 102290. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102290>
 - Teplyakova T.V., Kosogova T.A. *Higher Mushrooms of Western Siberia as Promising Objects for Drug Biotechnology [Vysshie griby Zapadnoy Sibiri – perspektivnye ob'ekty dlya biotekhnologii lekarstvennykh preparatov]*. Novosibirsk; 2014. (in Russian)
 - Martel J., Ko Y.F., Ojcius D.M., Lu C.C., Chang C.J., Lin C.S., et al. Immunomodulatory properties of plants and mushrooms. *Trends Pharmacol. Sci.* 2017; 38(11): 967–81. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.07.006>
 - Lu Y., Jia Y., Xue Z., Li N., Liu J., Chen H. Recent developments in *Inonotus obliquus* (Chaga mushroom) polysaccharides: Isolation, structural characteristics, biological activities and application. *Polymers*. 2021; 13(9): 1441. <https://doi.org/10.3390/polym13091441>
 - Pan H.H., Yu X.T., Li T., Wu H.L., Jiao C.W., Cai M.H., et al. Aqueous extract from a Chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (higher basidiomycetes), prevents herpes simplex virus entry through inhibition of viral-induced membrane fusion. *Int. J. Med. Mushrooms*. 2013; 15(1): 29–38. <https://doi.org/10.1615/intjmed-mushr.v15.i1.40>
 - Nosik D.N., Nosik N.N., Teplyakova T.V., Lobach O.A., Kiseleva I.A., Kondrashina N.G., et al. Antiviral activity of extracts of basidiomycetes and humic compounds substances against human immunodeficiency virus (Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus 1) and herpes simplex virus (Herpesviridae: Simplexvirus: Human alphaherpesvirus 1). *Voprosy virusologii*. 2020; 65(5): 276–83. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-5-4> EDN: <https://elibrary.ru/hfbppn> (in Russian)
 - Teplyakova T.V., Ilyicheva T.N., Markovich N.A. Prospects for the development of anti-influenza drugs based on medicinal mushrooms (review). *Appl. Biochem. Microbiol.* 2020; 56(5): 489–96. <https://doi.org/10.1134/S0003683820050142> EDN: <https://elibrary.ru/bggpif>
 - Garber A., Barnard L., Pickrell C. Review of whole plant extracts with activity against herpes simplex viruses in vitro and in vivo. *J. Evid. Based. Integr. Med.* 2021; 26: 2515690X20978394. <https://doi.org/10.1177/2515690X20978394>
 - Chun S., Gopal J., Muthu M. Antioxidant activity of mushroom extracts/polysaccharides—Their antiviral properties and plausible antiCOVID-19 properties. *Antioxidants*. 2021; 10(12): 1899. <https://doi.org/10.3390/antiox10121899>
 - Eid J.I., Das B., Al-Tuwaijri M.M., Basal W.T. Targeting SARS-CoV-2 with Chaga mushroom: An in silico study toward developing

- a natural antiviral compound. *Food Sci. Nutr.* 2021; 9(12): 6513–23. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2576>
18. Arunachalam K., Sasidharan S.P., Yang X. A concise review of mushrooms antiviral and immunomodulatory properties that may combat against COVID-19. *Food Chem. Adv.* 2022; 1: 100023. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100023>
 19. Teplyakova T.V., Pyankov O.V., Safatov A.S., Ovchinnikova A.S., Kosogova T.A., Skarnovich M.O., et al. Water extract of the Chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (Agaricomycetes), inhibits SARS-CoV-2 replication in vero E6 and vero cell culture experiments. *Int. J. Med. Mushrooms.* 2022; 24(2): 23–30. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2021042012>
 20. Rockx B., Kuiken T., Herfst S., Bestebroer T., Lamers M.M., Oude Munnink B.B., et al. Comparative pathogenesis of COVID-19, MERS, and SARS in a nonhuman primate model. *Science.* 2020; 368(6494): 1012–5. <https://doi.org/10.1126/science.abb7314>
 21. Gu H., Chen Q., Yang G., He L., Fan H., Deng Y.Q., et al. Adaptation of SARS-CoV-2 in BALB/c mice for testing vaccine efficacy. *Science.* 2020; 369(6511): 1603–7. <https://doi.org/10.1126/science.abc4730>
 22. Teplyakova T.V., Pyankov O.V., Skarnovich M.O. Replication inhibitor SARS-CoV-2 based on a water extract of the fungus *Inonotus obliquus*. Patent RF № 2741714 C1; 2021. (in Russian)
 23. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27(3): 493–7. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
 24. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Lab. Anim.* 2014; 48(3): 178–92. <https://doi.org/10.1177/0023677213516312>
 25. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Washington: National Academies Press; 2011. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK54050>
 26. American Veterinary Medical Association. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. Available at: <https://www.avma.org/sites/default/files/2020-02/Guidelines-on-Euthanasia-2020.pdf>
 27. Mironov A.N., Bunatyan N.D., Vasil'ev A.N. *Methodological Recommendations for the Study of the Specific Activity of Interferon Inducers [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv]*. Moscow: Grif & K; 2012. (in Russian)
 28. Razumov I.A., Kazachinskaya E.I., Puchkova L.I., Kosogova T.A., Gorbunova I.A., Loktev V.B., et al. Protective activity of aqueous extracts from higher mushrooms against herpes simplex virus type-2 on albino mice model. *Antibiotiki i khimioterapiya.* 2013; 58(9-10): 8–12. EDN: <https://elibrary.ru/nfgiex> (in Russian)
 29. Basal W.T., Elfiky A., Eid J. Chaga medicinal mushroom *Inonotus obliquus* (Agaricomycetes) terpenoids may interfere with SARS-CoV-2 spike protein recognition of the host cell: a molecular docking study. *Int. J. Med. Mushrooms.* 2021; 23(3): 1–14. <https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.2021037942>
 30. Zhou H., Möhlenberg M., Thakor J.C., Tuli H.S., Wang P., Assaraf Y.G., et al. Sensitivity to vaccines, therapeutic antibodies, and viral entry inhibitors and advances to counter the SARS-CoV-2 Omicron variant. *Clin. Microbiol. Rev.* 2022; 35(3): e00014–22. <https://doi.org/10.1128/cmr.00014-22>
 31. Shipovalov A.V., Kudrov G.A., Tomilov A.A., Bodnev S.A., Boldyrev N.D., Ovchinnikova A.S., et al. Susceptibility to SARS-CoV-2 virus variants of concern in mouse models. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2022; (1): 148–55. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2022-1-148-155> (in Russian)
 32. Zhang Y.N., Zhang Z.R., Zhang H.Q., Li N., Zhang Q.Y., Li X.D., et al. Different pathogenesis of SARS-CoV-2 Omicron variant in wild-type laboratory mice and hamsters. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022; 7(1): 62. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00930-2>
 33. Halfmann P.J., Iida S., Iwatsuki-Horimoto K., Maemura T., Kiso M., Scheaffner S.M., et al. SARS-CoV-2 Omicron virus causes attenuated disease in mice and hamsters. *Nature.* 2022; 603(7902): 687–92. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04441-6>

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-169>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023



Использование вирусоподобных частиц на основе рекомбинантных вирусных белков VP2/VP6 ротавируса А для оценки гуморального иммунного ответа методом ИФА

Филатов И.Е.¹, Цибезов В.В.¹, Баландина М.В.¹, Норкина С.Н.¹, Латышев О.Е.¹, Елисеева О.В.¹, Черепушкин С.А.¹, Верховский О.А.², Гребенникова Т.В.¹

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098, г. Москва, Россия;

²АНО «Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных», 123098, г. Москва, Россия

Введение. Ротавирусная инфекция является одной из основных проблем инфекционной патологии человека, животных и птиц. Оценка иммуногенности и эффективности всех типов вакцин против ротавируса типа А (РВА) проводят на лабораторной модели животных, в качестве которой обычно используют грызунов или новорождённых поросят, при этом для их проведения необходимо наличие ИФА, позволяющего выявить вирусспецифические антитела определённого класса.

Цель – разработка непрямого ИФА с использованием вирусоподобных частиц (VLP), состоящих из белков VP2/VP6 РВА, в качестве антигена для выявления и оценки уровня ВГА-специфических антител классов IgG, IgM, IgA в иммунном ответе к ротавирусу А.

Материалы и методы. Получение и очистка VP2/VP6 VLP РВА, электронная микроскопия, электрофорез в ПААГ-ДСН, иммуноблоттинг, иммуноферментный анализ, реакция нейтрализации.

Результаты. В статье представлены результаты получения рекомбинантного бакуловируса, содержащего ген *VP2/VP6 GFP* РВА, определения его инфекционной активности и использования для наработки VLP. Показана морфология, определён структурный состав и установлена высокая антигенная активность VP2/VP6 VLP РВА. На его основе разработан ИФА и приведены результаты выявления специфических антител к РВА в сыворотке крови различных видов животных.

Заключение. Разработанный ИФА с использованием VP2/VP6 VLP РВА в качестве универсального антигена позволяет выявлять весь спектр IgG-, IgM-, IgA-антител в иммунном ответе к РВА, что имеет важное научно-практическое значение в оценке иммуногенности и эффективности традиционных и разрабатываемых вакцин против ротавирусной инфекции.

Ключевые слова: ротавирус А; VP2/VP6 VLP РВА; ИФА; специфические антитела; иммунный ответ

Для цитирования: Филатов И.Е., Цибезов В.В., Баландина М.В., Норкина С.Н., Латышев О.Е., Елисеева О.В., Черепушкин С.А., Верховский О.А., Гребенникова Т.В. Использование вирусоподобных частиц на основе рекомбинантных вирусных белков VP2/VP6 ротавируса А для оценки гуморального иммунного ответа методом ИФА. *Вопросы вирусологии.* 2023; 68(2): 161-171. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-169> EDN: <https://elibrary.ru/aywqhn>

Для корреспонденции: Гребенникова Татьяна Владимировна, д-р биол. наук, профессор, руководитель отдела молекулярной вакцинологии и иммунодиагностики, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия. E-mail: t_grebennikova@mail.ru

Участие авторов: Филатов И.Е., Цибезов В.В. – проведение экспериментальных исследований, написание текста; Баландина М.В., Норкина С.Н., Латышев О.Е., Елисеева О.В., Черепушкин С.А. – проведение экспериментальных исследований; Верховский О.А. – сбор и обработка материалов, написание текста; Гребенникова Т.В. – написание резюме, заключения, общая редакция текста.

Финансирование. Работа финансирована государственной тематикой Министерства здравоохранения Российской Федерации «Разработка подходов для создания вакцины против инфекции, вызванной ротавирусом типа А» (регистрационный номер АААА-А18-118051490143-3).

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 организации ООО «Институт доклинических исследований» (Протокол № БЭК 4.25/21 от 02.06.2021).

Поступила 09.03.2023

Принята в печать 20.04.2023

Опубликована 30.04.2023

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-169>

Virus-like particles based on rotavirus A recombinant VP2/VP6 proteins for assessment the antibody immune response by ELISA

Ilya E. Filatov¹, Valeriy V. Tsibezov¹, Marina V. Balandina¹, Svetlana N. Norkina¹, Oleg E. Latyshev¹, Olesya V. Eliseeva¹, Stanislav A. Cherepushkin¹, Oleg A. Verkhovskiy², Tatyana V. Grebennikova¹

¹National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia;

²Diagnostic and Prevention Research Institute for human and animal diseases, 123098, Moscow, Russia

Introduction. Rotavirus infection is one of the main concerns in infectious pathology in humans, mammals and birds. Newborn piglets or rodents are usually being used as a laboratory model for the evaluation of immunogenicity and efficacy for all types of vaccines against rotavirus A (RVA), and the use of ELISA for the detection of virus-specific antibodies of specific isotype is an essential step of this evaluation.

Objective. Development of indirect solid-phase ELISA with VP2/VP6 rotavirus VLP as an antigen to detect and assess the distribution of RVA-specific IgG, IgM and IgA in the immune response to rotavirus A.

Materials and methods. VP2/VP6 rotavirus VLP production and purification, electron microscopy, PAGE, immunoblotting, ELISA, virus neutralization assay.

Results. The study presents the results of development of a recombinant baculovirus with RVA genes VP2-eGFP/VP6, assessment of its infectious activity and using it for VLP production. The morphology of the VP2/VP6 rotavirus VLPs was assessed, the structural composition was determined, and the high antigenic activity of the VLP was established. VLP-based ELISA assay was developed and here we report results for RVA-specific antibody detection in sera of different animals.

Conclusion. The developed ELISA based on VP2/VP6 rotavirus VLP as a universal antigen makes it possible to detect separately IgG, IgM and IgA antibodies to rotavirus A, outlining its scientific and practical importance for the evaluation of immunogenicity and efficacy of traditional vaccines against rotavirus A and those under development.

Keywords: rotavirus A; VP2/VP6 rotavirus VLP; ELISA; isotype-specific antibodies; immune response

For citation: Filatov I.E., Tsibezov V.V., Balandina M.V., Norkina S.N., Latyshev O.E., Eliseeva O.V., Cherepushkin S.A., Verkhovskiy O.A., Grebennikova T.V. Virus-like particles based on rotavirus A recombinant VP2/VP6 proteins for assessment the antibody immune response by ELISA. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2023; 68(2): 161-171 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-169> EDN: <https://elibrary.ru/aywqhn>

For correspondence: Tatyana V. Grebennikova, Dr Sci. (Biol.), Professor, Head of the Department of Molecular Vaccinology and Immunodiagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia. E-mail: t_grebennikova@mail.ru

Information about the authors:

Filatov I.E., <https://orcid.org/0000-0001-5274-224X>

Tsibezov V.V., <https://orcid.org/0000-0003-2150-5764>

Balandina M.V., <https://orcid.org/0009-0002-8179-1379>

Norkina S.N., <https://orcid.org/0009-0006-9608-4713>

Latyshev O.E., <https://orcid.org/0000-0002-5757-3809>

Eliseeva O.V., <https://orcid.org/0000-0002-0723-9749>

Cherepushkin S.A., <https://orcid.org/0000-0002-1734-5369>

Verkhovskiy O.A., <https://orcid.org/0000-0003-0784-9341>

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

Contribution: Filatov I.E., Tsibezov V.V. – performing the experiments, writing the text; Balandina M.V., Norkina S.N., Latyshev O.E., Eliseeva O.V., Cherepushkin S.A. – performing the experiments; Verkhovskiy O.A. – material collection and processing, writing the text; Grebennikova T.V. – writing of the summary, conclusion, editing the text.

Acknowledgments. The study was supported by state task of the Ministry of Health of Russia “Development of approaches to create a vaccine against rotavirus type A infection” No. AAAA-A18-118051490143-3.

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 Research and manufacturing centre «Home of pharmacy” (protocol No БЭК 4.25/21 dated 02 June 2021).

Received 09 March 2023

Accepted 20 April 2023

Published 30 April 2023

Введение

Ротавирусная инфекция (РВИ), характеризующаяся острым течением, диареей, рвотой, гастроэнтеритом, развитием общего интоксикационного синдрома, значительной степенью распространённости и летальности, является одной из основных проблем инфекционной патологии человека, животных и птиц во всём мире [1]. Ротавирус (РВ) типа А (РВА) – важнейший энтеропатоген неонатального периода человека, свиней, крупного рогатого скота, других видов млекопитающих. За счёт структурной особенности своей трёхслойной белковой оболочки, устойчивой к кислой среде желудка и пищеварительным ферментам, поражает эпителиальные клетки ворсинок тонкого отдела кишечника, вызывая их дегенерацию, некроз и десквамацию. Защита организма происходит за счёт иммунных реакций в лимфоидной ткани слизистых оболочек, в первую очередь экстравазкулярной продукции секреторного IgA (sIgA), являющегося основой иммунитета слизистых. IgG- и ранние IgM-антитела также выполняют важную эффекторную функцию в формировании как системного, так и местного иммунитета против РВИ [2].

Этиологическим агентом РВИ является икосаэдрический безоболочечный вирус рода *Rotavirus* семейства *Reoviridae*, в состав которого входят шесть структурных (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 и VP7) и пять неструктурных белков (NSP1 – NSP5/6), кодирующихся одиннадцатью сегментами двухцепочечной РНК в РВ-вирионе размером 18 555 н.р. [3]. На основе секвенирования гена белка внутреннего капсида VP6 и его молекулярных и антигенных свойств в пределах рода идентифицировано десять геногрупп/серогрупп вируса (РВА–РВJ).

Наиболее эффективной мерой борьбы с РВИ человека и животных является вакцинопрофилактика, снижающая уровень заболеваемости и предотвращающая развитие тяжёлых гастроэнтеритов и диарей. В настоящее время в мире используется несколько моно- и поливалентных вакцин, изготовленных из живых ослабленных штаммов РВА человеческого и (или) животного происхождения, однако имеется тенденция к разработке и внедрению в практику более безопасных и эффективных препаратов [4–6], в том числе и на основе нереплицирующихся вирусоподобных частиц (VLP). Предполагается, что VLP-вакцины могут снизить риск побочных эффектов, связанных с традиционными вакцинами, обеспечить повышенную защиту против родственных серотипов РВ [7–10]. Было показано, что вакцинация очищенными ротавирусными VLP вызывает иммунитет у млекопитающих против гетеротипичного РВ [11]. В нашей стране также были получены VLP, синтезированные к актуальным вирусным генотипам РВА, циркулирующим на территории Российской Федерации, и показана перспектива их использования в качестве основного компонента VLP-вакцины [12].

Оценку иммуногенности и эффективности всех типов РВА-вакцин повсеместно проводят на лабораторной модели животных, в качестве которой обычно

используют грызунов или новорождённых поросят. Ранее была экспериментально доказана эффективность использования именно поросят в качестве универсальной модели для оценки качества вакцинных препаратов против РВИ человека [13, 14].

Для проведения подобных исследований необходимым условием является наличие тест-системы на основе иммуноферментного анализа (ИФА), позволяющей в сжатые сроки выявить вирусспецифические антитела различных классов. Ранее нами был разработан ИФА для выявления РВА-специфических антител, относящихся к IgG-изотипу в сыворотке крови и молозиве свиней с использованием в качестве антигена рекомбинантного белка VP6 (рек-VP6), полученного в бакуловирусной системе экспрессии. Выбор VP6 был не случаен, поскольку известно, что он является основным высококонсервативным группоспецифическим белком вириона, обладает выраженной иммуногенной активностью и содержится в наибольшем количестве [15]. Метод был успешно апробирован в эксперименте на новорождённых поросятах породы вьетнамская вислобрюхая при воспроизведении РВ человека и оценки протективного эффекта клонированного штамма Wa РВА [16]. Вместе с тем за рубежом уже имеются разработки, касающиеся использования различных комбинаций антигенов VLP в непрямом ИФА (VLP ELISA), например, для выявления антител к РВ типа С (РВС) [7].

Целью настоящей работы была разработка непрямого ИФА с использованием вирусоподобных частиц (VLP), состоящих из белков VP2/VP6 РВА, в качестве антигена для выявления и оценки уровня ВГА-специфических антител классов IgG, IgM, IgA в иммунном ответе к РВА.

Материалы и методы

Для получения рекомбинантного бакуловируса, содержащего ген *VP2/VP6 GFP* РВА, использовали рекомбинантную бакмиду, содержащую белки РВА человека VP6 и VP2, слитую с зелёным флуоресцентным белком eGFP. Получение генно-инженерной конструкции, кодирующей белки VP2-eGFP и VP6 РВА, подробно описано ранее [12]. Трансфекцию перевиваемой линии клеток *Spodoptera frugiperda* Sf-9 проводили очищенными препаратами бакмидной ДНК с использованием катионного липосомного агента Cellfectin (Invitrogen, США) по методике производителя. После трансфекции проводили ещё два пассажа на клетках Sf-9 для накопления вируса.

Инфекционность рекомбинантного бакуловируса определяли методом титрования в монослойной культуре Sf-21 по методике, описанной в Baculocomplete User Guide с модификациями. Клетки Sf-21 с концентрацией посевной суспензии 5×10^5 клеток/см³ культивировали в двух 12-луночных планшетах в объёме 1 см³/луночка в течение 24 ч. В 24-луночном планшете готовили разведения вируса от 10^{-1} до 10^{-7} на питательной среде, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку, в соотношении 0,2 см³ вируса к 1,8 см³ среды. Каждое разведение исследуе-

мого вируса (с 10^{-7} по 10^{-1}) в объёме $0,5 \text{ см}^3$ вносили в три лунки одного ряда. Три лунки последнего ряда оставляли незаражёнными в качестве контроля. Инфицированные клетки оставляли для контакта с вирусом на 1 ч при комнатной температуре, после чего последовательно из каждого ряда лунок, начиная с контрольного, удаляли по $0,5 \text{ см}^3$ разведения вируса и немедленно вносили по $1,0 \text{ см}^3$ тёплого рабочего раствора агарозы. Через 10–20 мин, после застывания слоя агарозы, на его поверхность наносили по $0,5 \text{ см}^3$ ростовой среды для предотвращения высыхания клеток. Инкубировали планшеты в термостате с температурой $27,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 4 суток. После инкубации удаляли из каждой лунки планшетов по $0,5 \text{ см}^3$ среды и добавляли по $0,5 \text{ см}^3$ приготовленного рабочего раствора нейтрального красного. Инкубировали планшеты в термостате с температурой $27,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 3–4 ч. По окончании срока инкубации удаляли оставшуюся жидкость и помещали планшеты в термостат с температурой $27,0 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ для полного проявления бляшек. Через сутки проводили учёт результатов титрования подсчётом бляшек в световом боксе. Бляшки имеют вид неокрашенных пятнышек на монослое клеток красного цвета. Подсчитывали бляшки в ряде лунок с их количеством в пределах 5–30 в лунке. Титр вируса выражают в бляшкообразующих единицах (БОЕ/ см^3). Высчитывали среднее количество бляшек в разведении по трём лункам и определяли титр вируса, используя формулу (1):

$$\text{Титр (БОЕ/см}^3\text{)} = A \times B \times 2, \quad (1)$$

где A – среднее количество бляшек в разведении; B – значение, обратное степени разведения вируса; 2 – коэффициент пересчёта на 1 см^3 (при объёме вносимого вируса в лунку $0,5 \text{ см}^3$).

Очистка VP2/VP6 VLP PBA. Культуральную жидкость, содержащую VP2/VP6 VLP PBA, центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин, супернатант повторно центрифугировали 20 мин при 6000 об/мин ($4 \text{ }^\circ\text{C}$, ротор Sorval SS34, Thermo Scientific).

VLP из осветлённых суспензий очищали ультрацентрифугированием в течение 2 ч при 28 000 об/мин ($4 \text{ }^\circ\text{C}$; центрифуга Optima XE-100, бакетный ротор SW 32Ti, Beckman Coulter, США) на подушке из 35% (w/v) сахарозы, приготовленной на буфере TNC (10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 ; pH 7,4).

Также для получения VLP из осветлённых суспензий использовали проточное центрифугирование (центрифуга Optima XE-100, проточный ротор CF-32, Beckman Coulter, США) 28 000 об/мин на подушке из 35% (w/v) сахарозы на буфере TNC. Осадок VLP смывали со стенок ротора буфером TNC, и полученную суспензию VLP наслаивали на 6 мл 35% (w/v) сахарозы, приготовленной на буфере TNC, центрифугировали в течение 2 ч при 28 000 об/мин ($4 \text{ }^\circ\text{C}$; центрифуга Optima XE-100, бакетный ротор SW 32Ti, Beckman Coulter, США). Полученные осадки, содержащие VLP, ресуспендировали в буфере TNC и хранили при $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Электронная микроскопия. 3 мкл препарата с концентрацией 12–30 мг/мл наносили на медную сетку,

покрытую углеродной подложкой (Ted Pella, США) и обработанную в атмосфере тлеющего разряда, инкубировали 30 сек при комнатной температуре. Затем на сетку наносили каплю 2% раствора ацетата урана, выдерживали 30 сек, излишки раствора удаляли с сетки фильтровальной бумагой. Окрашенные сетки хранили в пластиковых контейнерах до использования. Исследование образцов производили в просвечивающем электронном микроскопе JEOL JEM-2100 (JEOL, Япония), оборудованном катодом из гексаборита лантана, при ускоряющем напряжении 200 кВ. Изображения получали с увеличением $\times 25\,000$ с помощью ПЗС-камеры Gatan X100 с размером матрицы 2000×2000 пикселей (Gatan, США).

Концентрацию белка в образцах определяли с использованием коммерческого набора Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo, США).

Чистоту и специфичность продуктов оценивали методами электрофореза в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) на приборе Mini-PROTEAN II (Bio-Rad, США) в восстанавливающих условиях при постоянном напряжении 200 В.

Экспериментальная вакцина «VLP-рота» представляет смесь VLP, состоящих из четырех рекомбинантных белков: VP2, VP4, VP6 и VP7 [12].

В качестве *испытуемых проб* использовали сыворотку крови мышей, морских свинок, свиней. Предварительно все испытуемые пробы были протестированы в реакции нейтрализации (РН) и по её результатам в зависимости от наличия и титра антител к РВА дифференцированы на положительные и отрицательные.

Получение РВА-специфических сывороток мышей. Для исследования использовали самок мышей линии BALB/c 3–4-недельного возраста массой 16–18 г (питомник лабораторных животных филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» Федерального медико-биологического агентства, Россия). Проводили двукратную иммунизацию экспериментальной вакциной «VLP-рота» с интервалом 14 суток. При интраназальном введении применяли лёгкий эфирный наркоз. Сформировали 7 опытных групп:

- группа 1 – внутримышечное введение с адьювантом в объёме $0,2 \text{ мл/мышь}$;
- группа 2 – внутримышечное введение без адьюванта в объёме $0,2 \text{ мл/мышь}$;
- группа 3 – внутрибрюшинное введение с адьювантом в объёме $0,2 \text{ мл/мышь}$;
- группа 4 – внутрибрюшинное введение без адьюванта в объёме $0,2 \text{ мл/мышь}$;
- группа 5 – интраназальное введение с адьювантом в объёме $0,05 \text{ мл/мышь}$;
- группа 6 – интраназальное введение без адьюванта в объёме $0,05 \text{ мл/мышь}$;
- группа 7 – контроль.

Через 7 суток после второй иммунизации от всех животных получали сыворотку крови и определяли уровень антител к РВА методом непрямого ИФА с использованием в качестве сорбированного антигена рек-VP6 и VP2/VP6 VLP PBA. Сыворотки тестировали с двой-

ным шагом в разведениях от 1/200 до 1/25 600. Использовали пероксидазные конъюгаты анти-IgG, анти-IgM и анти-IgA мыши (Sigma) в разведении 1/2000.

Получение РВА-специфических сывороток свиней. Для исследования использовали сыворотку крови карликовых свиней после трёхкратной иммунизации с интервалом 9–10 суток экспериментальной вакциной «VLP-рота» в дозах 30, 120 мкг белка/доза. Контрольным животным вводили 0,9% NaCl. Уровень РВА-специфических антител классов IgG и IgA определяли методом непрямого ИФА с использованием в качестве сорбированного антигена VP2/VP6 VLP РВА и пероксидазные конъюгаты анти-IgG, анти-IgM и анти-IgA свиньи (Sigma).

Все испытуемые пробы сывороток также исследовали на наличие антител к РВА в коммерческом наборе Ingezim Rotavirus Porcino (Ingenasa, Испания) по методике производителя.

Получение РВА-специфических сывороток морских свинок. Морских свинок иммунизировали двукратно с интервалом 14 дней вакциной «VLP-рота» в дозах 60, 120 мкг белка/доза. Контрольным животным вводили 0,9% NaCl. Уровень РВА-специфических антител IgG-изотипа определяли методом непрямого ИФА с использованием в качестве сорбированного антигена VP2/VP6 VLP РВА и пероксидазного конъюгата анти-IgG морской свинки (Sigma).

Реакцию нейтрализации РВА с испытуемыми пробами проводили микрометодом в 96-луночных полистироловых культуральных планшетах (Costar, США) на перевиваемой культуре клеток MARC-145, выращенной на питательной среде MEM с глутамином с добавлением 5% эмбриональной сыворотки телёнка по стандартной методике с рабочей дозой РВА, содержащей 100 ТЦИД₅₀/100 мкл. Разведения вируса готовили в питательной среде, содержащей 10 мкг/мл трипсина. Испытуемые пробы прогревали на водяной бане при температуре 56 °С в течение 30 мин с целью инактивации неспецифических ингибиторов. Далее готовили их разведения от 1 : 10 до 1 : 1280 и вносили по 100 мкл в лунки 96-луночного планшета. К разведениям сывороток добавляли по 100 мкл вирусосодержащей суспензии и инкубировали смесь в течение 1 ч при 37 °С. Затем смесь переносили в 96-луночные планшеты с монослоем клеток MARC-145. Через 4–5 суток инкубации при 37 °С и 5% CO₂ проводили учёт результатов путём микроскопирования монослоя с целью определения цитопатических изменений в клетках. Вируснейтрализующий титр испытуемой пробы выражали как её предельное разведение, ингибирующее развитие цитопатического действия вируса.

Непрямой ИФА. В лунки иммунологического планшета (Greiner, Германия) вносили 0,1 мл рек-VP6 или VP2/VP6 VLP РВА (10 мкг/мл) в 0,1 М карбонатно-бикарбонатном буфере, pH 9,5. Планшет инкубировали 18 ч при 4 °С, после чего удаляли избыток антигена пятикратной отмывкой ФСБТ (0,01 М фосфатный буфер, 170 mM NaCl, 0,1% твин-20, pH 7,4). Свободные участки пластика блокировали 1% желатином (Gerbu, Германия) в ФСБТ (1 ч при 37 °С), уда-

ляли блокирующий раствор и вносили в лунки 0,1 мл РВА-специфических или нейтральных испытуемых сывороток в ФСБТ и 0,5% бычьего сывороточного альбумина. Планшет инкубировали 1 ч при 37 °С, промывали ФСБТ и добавляли 0,1 мл меченых пероксидазой соответствующего конъюгата в рабочем разведении. Через 1 ч инкубации при 37 °С отмывали планшет ФСБТ и вносили в лунки 100 мкл субстратного раствора с тетраметилбензидином (ООО «Хема», Россия). Инкубировали 15 мин при комнатной температуре и останавливали реакцию добавлением 0,1 мл 1M H₂SO₄. Интенсивность окраски в лунках определяли на спектрофотометре с вертикальным лучом (Multiscan FC, Thermo, США) при 450 нм (A₄₅₀).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерных программ Microsoft Office Excel 2007–2016 и статистических онлайн-калькуляторов (<https://math.semestr.ru>, <https://medstatistic.ru>).

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 организации ООО «Институт доклинических исследований» (Протокол № БЭК 4.25/21 от 02.06.2021).

Результаты

На первом этапе работы был получен рекомбинантный бакуловирус, содержащий ген *VP2/VP6 GFP* РВА. Результат трансфекции линии клеток Sf-9 бакмидной ДНК, содержащей гены белков РВА VP6 и VP2-eGFP, представлен на **рис. 1**, по данным которого видно, что флуоресценция, свидетельствующая об успешной трансфекции клеток, наблюдается в 1-м пассаже и усиливается в 3-м. Для оценки бляшкообразования непосредственно перед окраской монослоя нейтральным красным проводили контроль инфицированных клеток методом флуоресцентной микроскопии (**рис. 2**). Титр полученного рекомбинантного бакуловируса, содержащего ген *VP2/VP6 GFP* РВА, в 3-м пассаже составил $2,3 \times 10^6$ БОЕ/см³.

По результатам очистки установлено, что совместная экспрессия (коэкспрессия) VP2 и VP6 приводила к сборке двухслойных частиц, которые могут служить базовой структурой для всех остальных вариантов соответствующих рекомбинантных белков РВА, полученных ранее [12]. Результаты электронной микроскопии показали, что по морфологии и размеру VP2/VP6 VLP РВА соответствовали вириону нативного вируса и представляли собой трёхслойный колесообразный капсид размером 50–80 нм (**рис. 3**). При этом более 90% полученных частиц были собраны правильно и не разрушены, концентрация общего белка в растворе после проведённой очистки составила 10–20 мг/мл, что, вероятнее всего, и является количественным содержанием VP2/VP6 VLP РВА.

Результаты по определению структурного состава субстанции показали, что VP2/VP6 VLP РВА пред-

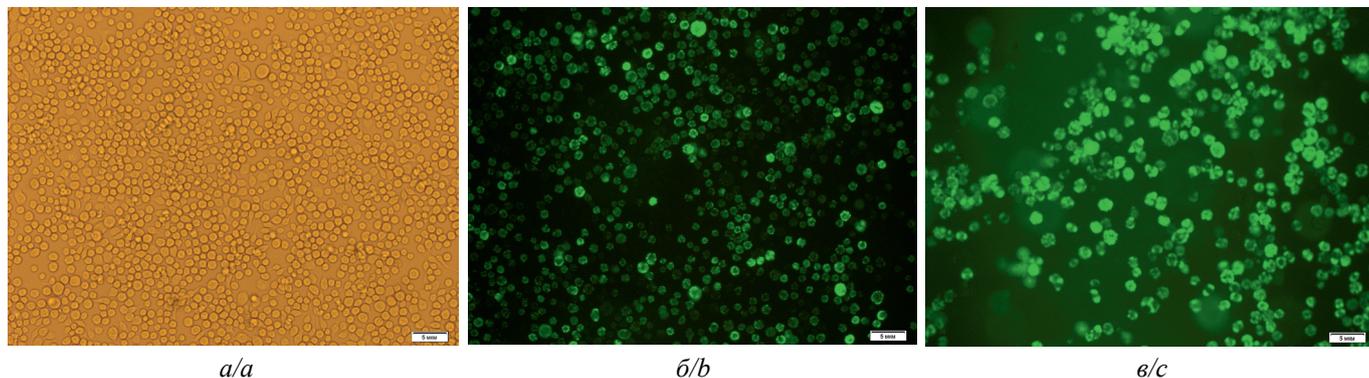


Рис. 1. Результат трансфекции линии клеток Sf-9 бакмидной ДНК, содержащей гены белков PBA VP6 и VP2-eGFP: *a* – незараженная культура клеток Sf-9 в проходящем свете; *б, в* – культура клеток Sf-9, зараженная рекомбинантным бакуловирусом 1-го (*б*) и 3-го (*в*) пассажа соответственно в флуоресцентном поле.

Fig. 1. The result of transfection of the Sf-9 cell line with bacmid DNA containing the genes of RVA proteins VP6 and VP2-eGFP: *a* – not infected Sf-9 cell line in transmitted light; *b, c* – Sf-9 cell line infected with baculovirus first (*b*) and third (*c*) passages in fluorescence field.

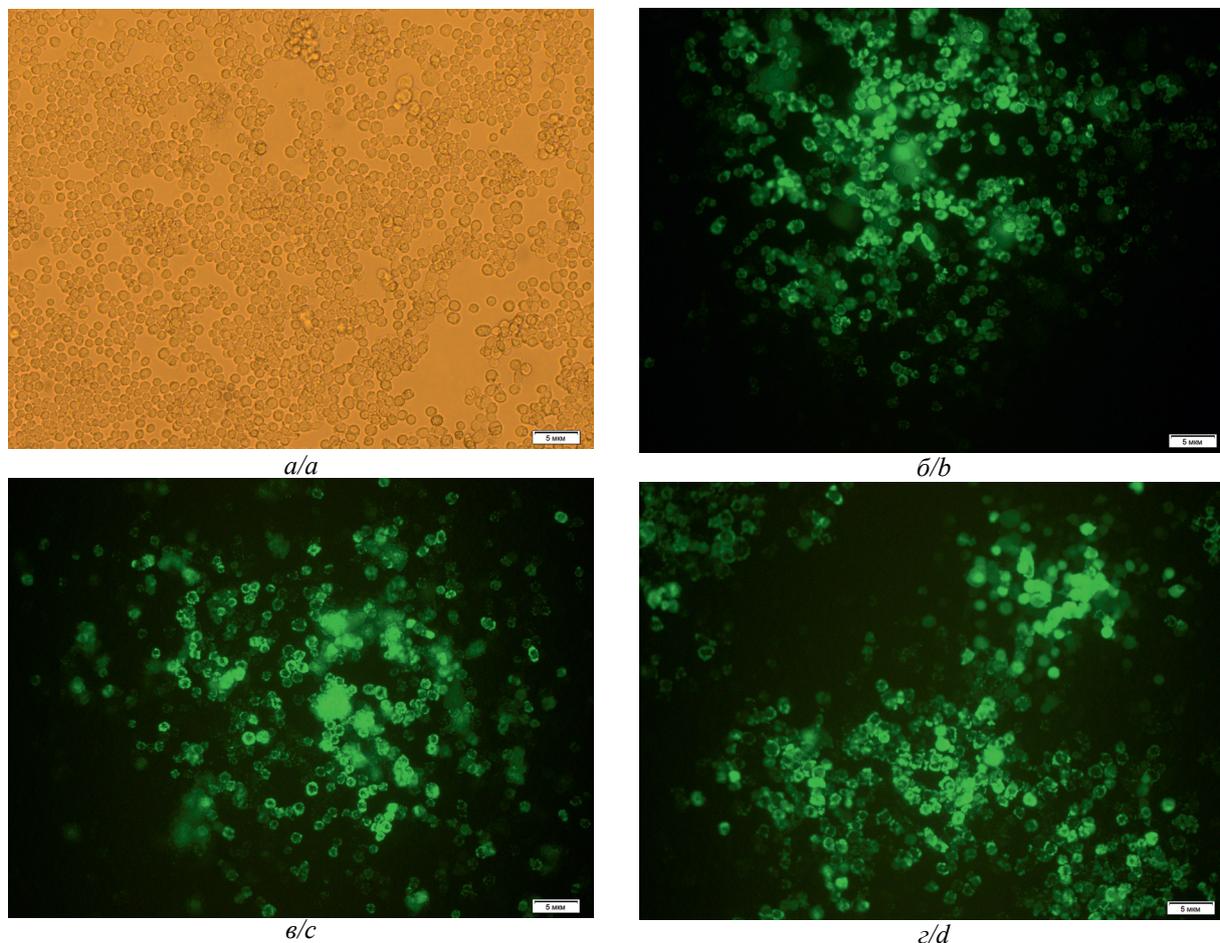


Рис. 2. Инокулированная культура клеток Sf-21, разведение вируса 10^{-4} : *a* – в проходящем свете; *б, в, г* – бляшки в флуоресцентном поле.

Fig. 2. Sf-21 cells infected with 10^{-4} virus dilution: *a* – in transmitted light; *b, c, d* – plaques in fluorescence field.

ставляют собой гомогенную смесь двух рекомбинантных белков VP2 и VP6 с молекулярной массой приблизительно 120 кД и 45 кД соответственно (рис. 4). Антигенная активность VP2/VP6 VLP PBA была подтверждена в иммуноблоттинге с PBA-по-

ложительными пробами сывороток крови свиньи и мыши.

Для изучения антигенной активности полученного препарата и возможности его применения в качестве антигена в иммуноферментном методе для выявления

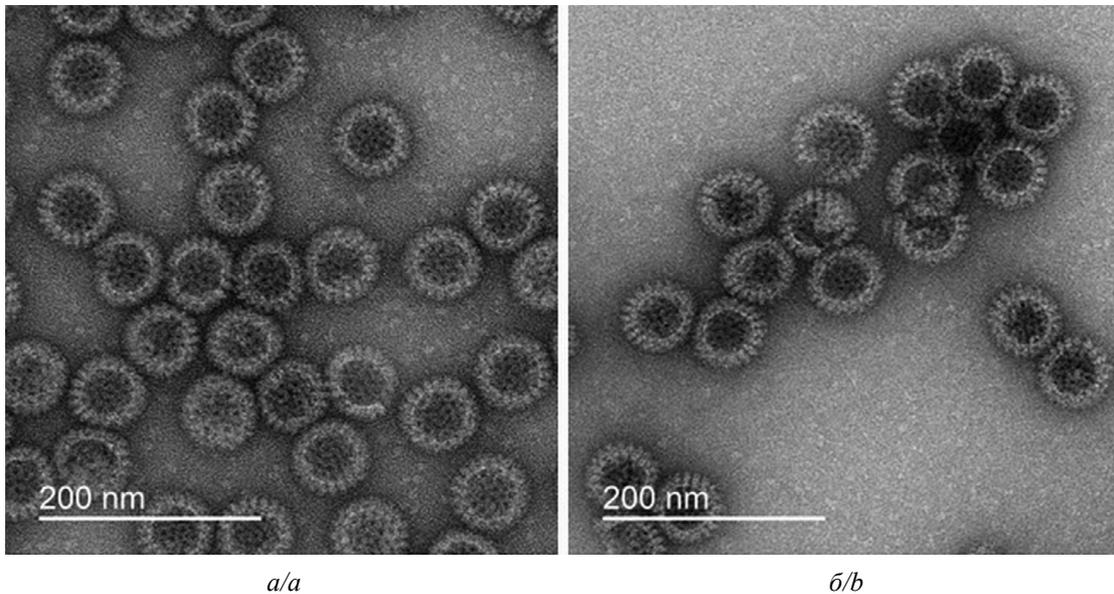


Рис. 3. Электронная микрофотография VP2/VP6 VLP PBA (а) и PBA (б). Увеличение $\times 25\,000$.

Fig. 3. Electron micrograph of RVA VP2/VP6 VLPs (a) and RVA (b). $\times 25,000$ magnification.

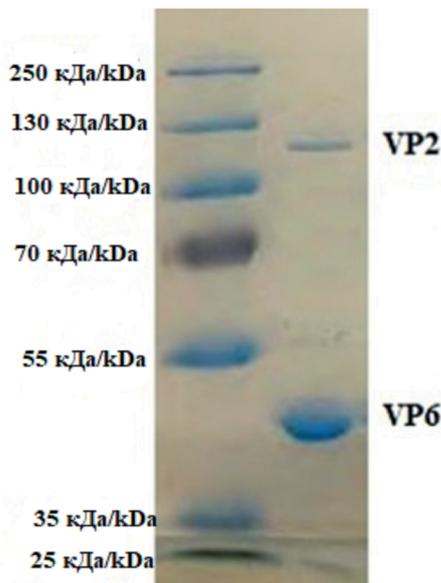


Рис. 4. Структурный анализ препарата VP2/VP6 VLP PBA методом электрофореза в 12% ПААГ-ДСН. На электрофореграмме видны две полосы, соответствующие по молекулярной массе структурным белкам VP2 и VP6 ротавируса А (120 and 45 kDa). Видимые дополнительные полосы отсутствуют.

Fig. 4. Protein analysis of RVA VP2/VP6 VLP by SDS-PAAGE. Two bands are visible in 12% gel that correspond to molecular weight of the RVA structural proteins VP2 and VP6 (120 and 45 kDa). No additional protein bands are present.

PBA-специфических антител использованы сыворотки крови мыши, свиньи и морской свинки.

При сравнении антигенной активности препаратов рекомбинантного VP6 и VP2/VP6 VLP PBA показано, что оба препарата позволяют эффективно выявлять PBA-специфические антитела IgG-, IgM-

и IgA-изотипов в сыворотках крови мышей, иммунизированных VP2/VP6 VLP PBA, причём при использовании в качестве сорбированного антигена VP2/VP6 VLP PBA чувствительность тест-системы на 15–30% выше, чем при использовании рек-VP6 (**рис. 5**).

В опыте на поросятах была установлена динамика содержания PBA-специфических антител, относящихся к IgG- и IgA-изотипам в сыворотке крови животных в процессе поствакцинального иммуногенеза (**рис. 6**). При этом статистически достоверное повышение их уровня отмечено у животных после третьей иммунизации ($r = 0,95$; $p < 0,05$). При параллельном исследовании этих же проб в РН и ИФА-наборе зарубежного производства положительная корреляция полученных результатов установлена между VLP ИФА / РН ($r = 0,9$, $p < 0,05$) и VLP ИФА / Ingezim Rotavirus Porcino ($r = 0,87$, $p < 0,05$), что свидетельствует о высокой эффективности разработанной тест-системы.

Установленная динамика содержания уровня IgG-специфических поствакцинальных антител к PBA в сыворотке крови морских свинок подтвердила высокую чувствительность и специфичность метода (**рис. 7**).

Обсуждение

Несмотря на значительные успехи в борьбе с РВИ человека и животных, проблема разработки новых средств диагностики и специфической профилактики остаётся весьма актуальной. Прежде всего это обусловлено биологией РВ, связанной с их реассортацией (обмен геномными фрагментами между вакцинным и вирулентным вирусом или между различными РВ после одномоментного заражения) и приводящей к появлению новых, зачастую более вирулентных и трудно диагностируемых штаммов РВ. Использование VLP в вакцине (VLP-вакцина) является альтернативным подходом к замене живого вируса на более безопас-

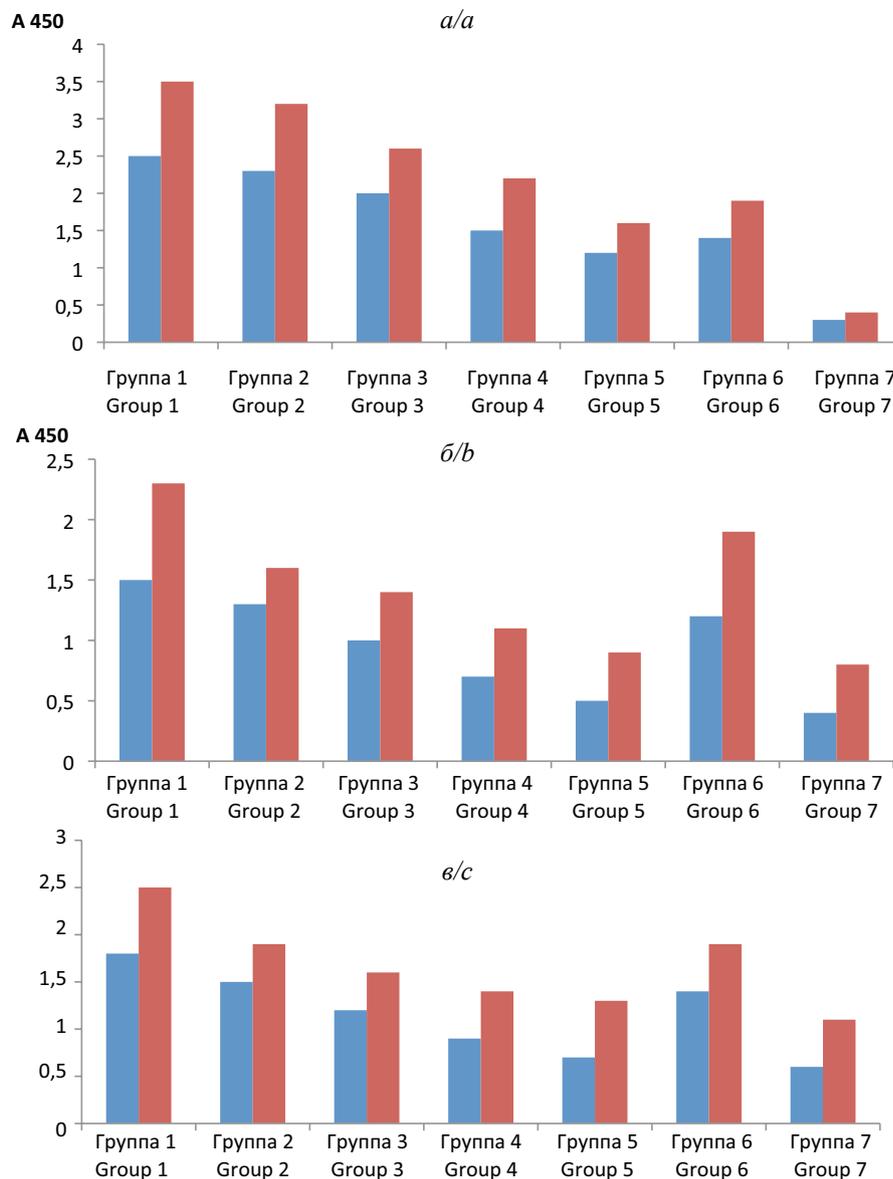


Рис. 5. Сравнительный анализ специфического связывания рек-VP6 (синие столбцы) и VP2/VP6 VLP PBA (красные столбцы) при их использовании в качестве антигена в непрямом ИФА для выявления IgG (а), IgM (б) и IgA (в) специфических антител в сыворотке крови мышей.

Fig. 5. Comparative analysis of specific recognition of rec-VP6 (blue columns) and RVA VP2/VP6 VLP (red columns) which were utilized in ELISA as antigen for the detection of IgG (a), IgM (b) and IgA (c) antibodies in mouse serum samples.

ный и не менее эффективный белковый иммуноген. Поскольку VLP, образующиеся путём самосборки рекомбинантных белков, экспрессируемых в клетке, обладают морфологическими и структурными особенностями, сходными с таковыми у нативных вирусов, не содержат никаких инфекционных генетических материалов, они более безопасны, чем цельновирионные вакцины. Последние данные свидетельствуют о том, что VLP представляют собой технологию платформы для вакцинации с высоким потенциалом для использования против широкого спектра инфекционных вирусов, при этом технология получения рекомбинантных белков в клетках насекомых с использованием бакуло-

вирусной системы экспрессии достаточно подробно освещена в зарубежной и отечественной литературе [17–19]. В настоящем исследовании композиция VP2/VP6 VLP PBA, представляющая собой конформационную структуру двух рекомбинантных белков, помимо перспективы применения в качестве компонента вакцины, была использована в качестве антигена для ИФА. Методологически этот подход коррелирует с технологией разработки ИФА для выявления IgA- и IgG-антител к PBC в сыворотке крови и молоке свиней с использованием отдельных очищенных комбинаций VLP или коктейля из всех полученных VLP PBC, показавший свою практическую эффективность [7].

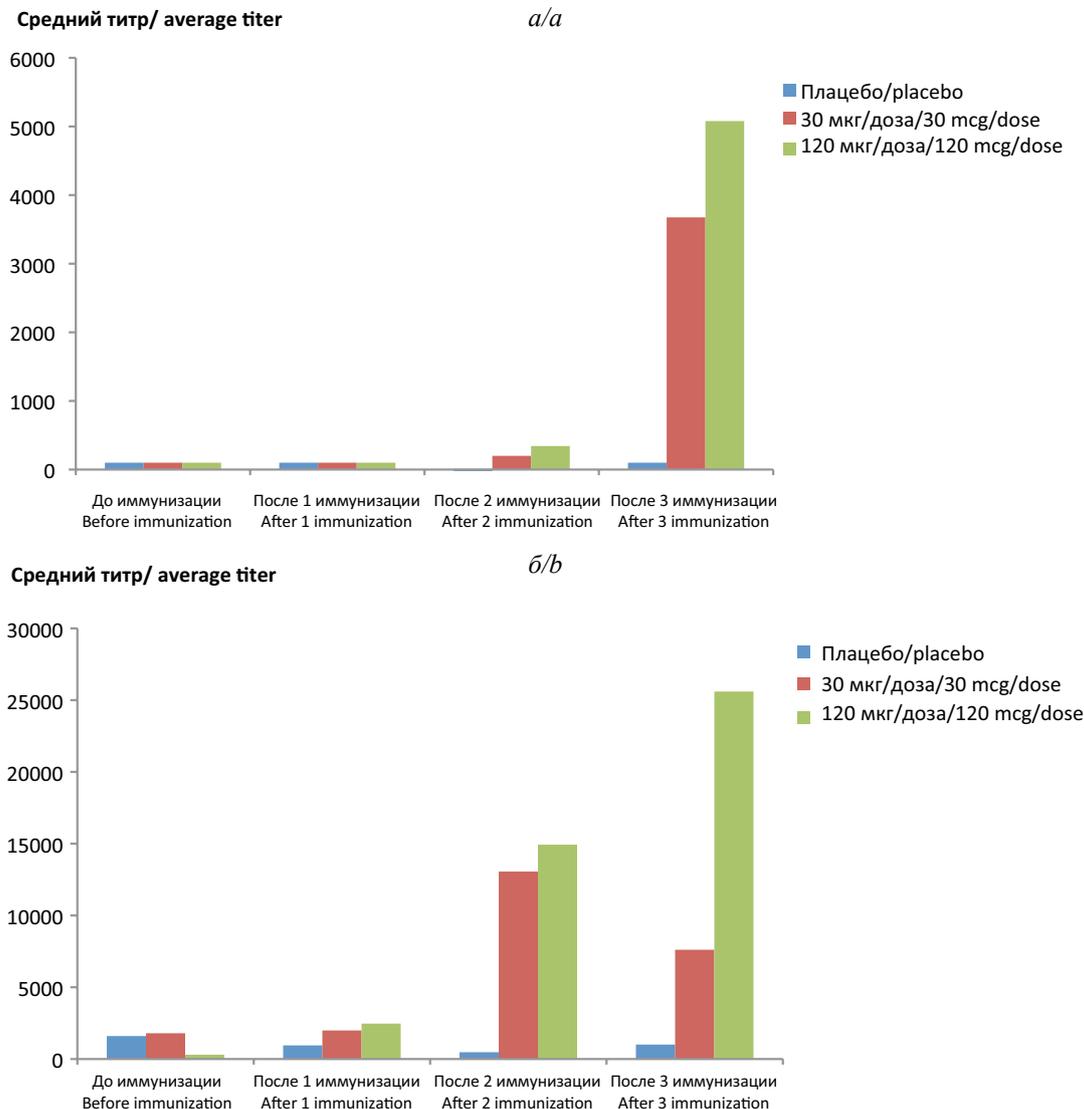


Рис. 6. Распределение сывороточных IgG (*a*) и IgA (*б*) антител в иммунном ответе к РВА в опыте на новорождённых карликовых поросятах. В качестве антигена использован VP2/VP6 VLP РВА, испытуемые пробы отобраны до, после первой, второй и третьей иммунизации (ось абсцисс) соответственно. Приведены среднегеометрические показатели значения обратного титра антител (ось ординат).

Fig. 6. Distribution of IgG (*a*) and IgA (*b*) antibodies to RVA in the serum samples of newborn dwarf piglets. RVA VP2/VP6 VLPs were used as antigen in ELISA, serum samples were collected before and after of each vaccination. The geometric mean values for reverse antibody titers are shown.

Помимо высокой консервативности и иммуногенности, особенностью VP6 является наличие нескольких других полезных свойств, которые могут позволить использовать их в качестве адъювантов, иммунологических носителей и средств доставки лекарств, а также выступать в качестве каркаса для производства ценных нанобиоматериалов [20, 21].

Известно, что с биологической точки зрения основу системного иммунитета составляют антитела IgG-класса, в то время как локальная продукция специфических sIgA-антител (димерная форма молекулы IgA, связанная с секреторным компонентом) в лимфоидных тканях желудочно-кишечного, респираторного

и мочеполового тракта обеспечивает местную систему защиты против вирусов. В формировании как системного иммунитета, так и иммунитета слизистых важную роль играют IgM-антитела, обеспечивающие вирусспецифическое связывание на ранней стадии иммунного ответа. Далее после изотипического переключения плазматические клетки начинают синтезировать антитела IgG и IgA. Этот процесс связан с реконструкцией ДНК В-клеток, реализуется CD4⁺-эффекторными Т-лимфоцитами и приводит к функциональному разнообразию гуморальный иммунный ответ. При энтеровирусных инфекциях изотипическое переключение с IgM на IgA происходит главным

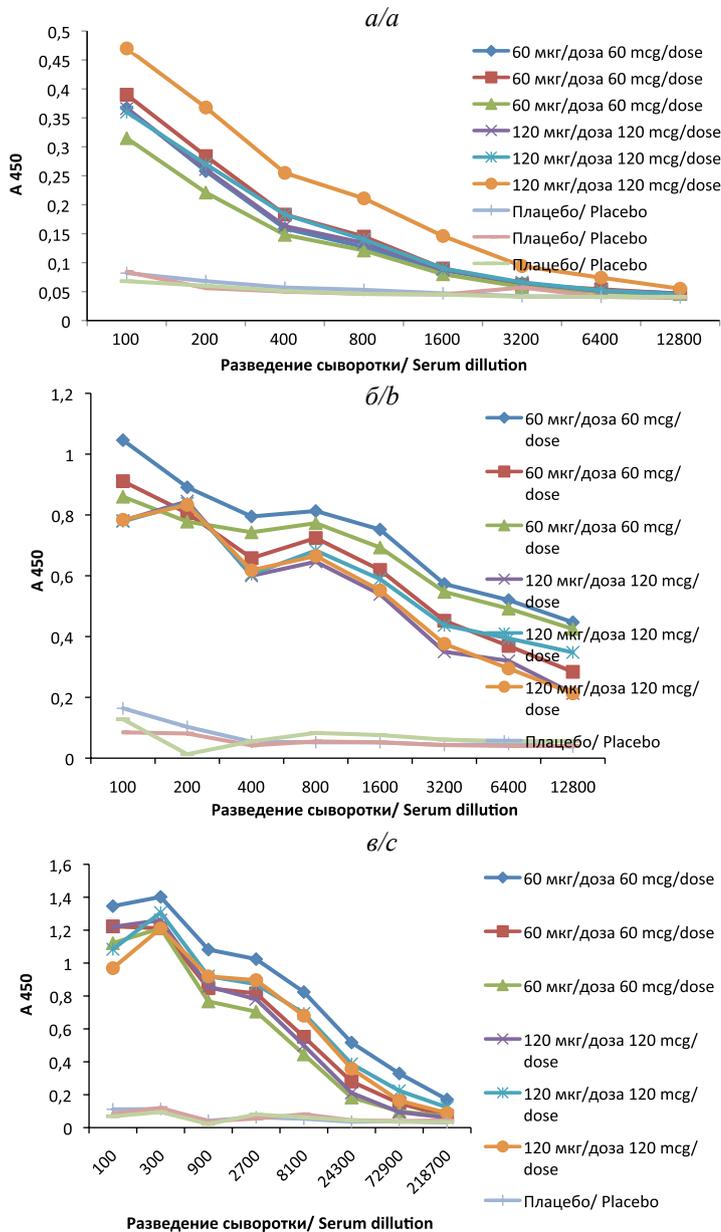


Рис. 7. Кривые титрования проб сыворотки крови морских свинок в VLP ИФА, отражающие уровень вирусспецифических антител IgG. В качестве антигена использован VP2/VP6 VLP РВА, испытуемые пробы отобраны после первой (а), второй (б) и третьей (в) иммунизации соответственно. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку крови неиммунных животных.

Fig. 7. Titration curves of guinea pigs serum samples obtained in VLP-based ELISA representing the levels of RVA-specific IgG antibodies. RVA VP2/VP6 VLPs were used as antigen in ELISA, serum samples were collected after first (a), second (b) and third (c) vaccination, respectively. Sera from non-vaccinated animals were used as negative controls.

образом в зародышевых центрах В-клеток лимфоидной ткани, ассоциированной с кишечником (GALT). В отличие от других иммуноглобулинов, молекулы sIgA устойчивы к протеолитическому расщеплению в желудочно-кишечном тракте, и поэтому по сравнению с IgG- или IgM-антителами они наиболее эффективны в связывании с энтеропатогенами [22, 23].

Ранее нами было показано, что появление IgG-антител к РВА в сыворотке крови является маркером формирования системного иммунитета против РВИ, обеспечивающего наряду с местным выживанием животных после экспериментального заражения [16].

Разработанная в настоящем исследовании тест-система позволяет выявлять не только IgG-, но и IgM- и IgA-антитела к РВА, что значительно расширяет показатели иммунного статуса организма животных (а в будущем, возможно, и человека), спектр исследуемого биологического материала и позволяет достоверно оценивать этапы формирования противовирусного иммунного ответа в доклинических исследованиях.

Заключение

Таким образом, можно сделать общий вывод о том, что разработанный ИФА с использованием VP2/VP6 VLP РВА в качестве универсального антигена выявляет весь спектр IgG-, IgM-, IgA-антител в иммунном ответе к РВА. Тест-система позволяет с высокой степенью достоверности определить уровень антител как в сыворотке крови, где IgG является основным изотипом, так и в секретах слизистых оболочек, где преобладают секреторные антитела класса IgA. Изучение распределения различных классов антител имеет важное значение в оценке иммуногенности и эффективности разрабатываемых вакцин против РВИ в доклинических исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013.
2. Saif L.J., Fernandez F.M. Group A rotavirus veterinary vaccines. *J. Infect. Dis.* 1996; 174(Suppl. 1): S98–106. https://doi.org/10.1093/infdis/174.supplement_1.s98
3. Kumar D., Anderson A.V., Pittman J., Springer N.L., Marthaler D.G., Mwangi W. Antibody response to rotavirus C pre-farrow natural planned exposure to gilts and their piglets. *Viruses*. 2022; 14(10): 2250. <https://doi.org/10.3390/v14102250>
4. Vetter V., Gardner R.C., Debrus S., Benninghoff B., Pereira P. Established and new rotavirus vaccines: a comprehensive review for healthcare professionals. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2022; 18(1): 1870395. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1870395>
5. Folorusno O.S., Sebolai O.M. Overview of the development, impacts, and challenges of live-attenuated oral rotavirus vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2020; 8(3): 341. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030341>
6. Wang Y., Li J., Liu P., Zhu F. The performance of licensed rotavirus vaccines and the development of a new generation of rotavirus vaccines: a review. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2021; 17(3): 880–96. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1801071>
7. Chepngeno J., Diaz A., Paim F.C., Saif L.J., Vlasova A.N. Rotavirus C: prevalence in suckling piglets and development of virus-like particles to assess the influence of maternal immunity on the disease development. *Vet. Res.* 2019; 50(1): 84. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0705-4>
8. Changotra H., Vij A. Rotavirus virus-like particles (RV-VLPs) vaccines: An update. *Rev. Med. Virol.* 2017; 27(6). <https://doi.org/10.1002/rmv.1954>
9. Jere K.C., O'Neill H.G., Potgieter A.C., van Dijk A.A. Chimeric virus-like particles derived from consensus genome sequences of human rotavirus strains co-circulating in Africa. *PLoS One*. 2014; 9(9): e105167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105167>
10. Song J.M. Parenteral, non-live rotavirus vaccine: recent history and future perspective. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 2021; 10(3): 203–10. <https://doi.org/10.7774/cevr.2021.10.3.203>

11. Crawford S.E., Estes M.K., Ciarlet M., Barone C., O'Neal C.M., Cohen J., et al. Heterotypic protection and induction of a broad heterotypic neutralization response by rotavirus-like particles. *J. Virol.* 1999; 73(6): 4813–22. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.6.4813-4822.1999>
12. Черепушкин С.А., Цибезов В.В., Южаков А.Г., Лагышев О.Е., Алексеев К.П., Алтаева Э.Г. и др. Синтез и характеристика вирусоподобных частиц ротавируса А (Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A) человека. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(1): 55–64. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-27> EDN: <https://www.elibrary.ru/eersag>
13. Yuan L., Saif L.J. Induction of mucosal immune responses and protection against enteric viruses: rotavirus infection of gnotobiotic pigs as a model. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002; 87(3–4): 147–60. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(02\)00046-6](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(02)00046-6)
14. Azevedo M.P., Vlasova A.N., Saif L.J. Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *Expert. Rev. Vaccines.* 2013; 12(2): 169–81. <https://doi.org/10.1586/erv.13.3>
15. Shoja Z., Jalilvand S., Latifi T., Roohvand F. Rotavirus VP6: involvement in immunogenicity, adjuvant activity, and use as a vector for heterologous peptides, drug delivery, and production of nano-biomaterials. *Arch. Virol.* 2022; 167(4): 1013–23. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05407-9>
16. Лагышев О.Е., Елисеева О.В., Костина Л.В., Алексеев К.П., Хаметова К.М., Алтаева Е.Г. и др. Оценка иммуногенной активности клонированного штамма WA ротавируса А человека. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(4): 156–64. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-156-164> EDN: <https://www.elibrary.ru/sckbyy>
17. Lai C.C., Cheng Y.C., Chen P.W., Lin T.H., Tzeng T.T., Lu C.C., et al. Process development for pandemic influenza VLP vaccine production using a baculovirus expression system. *J. Biol. Eng.* 2019; 13: 78. <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0206-z>
18. Белжеларская С.Н. Бакуловирусные системы экспрессии рекомбинантных белков в клетках насекомых и млекопитающих. *Молекулярная биология.* 2011; 45(1): 142–59. EDN: <https://www.elibrary.ru/ndjchz>
19. Changotra H., Vij A. Rotavirus virus-like particles (RV-VLPs) vaccines: An update. *Rev. Med. Virol.* 2017; 27(6). <https://doi.org/10.1002/rmv.1954>
20. Shoja Z., Jalilvand S., Latifi T., Roohvand F. Rotavirus VP6: involvement in immunogenicity, adjuvant activity, and use as a vector for heterologous peptides, drug delivery, and production of nano-biomaterials. *Arch. Virol.* 2022; 167(4): 1013–23. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05407-9>
21. Heinimäki S., Tamminen K., Hytönen V.P., Malm M., Blazevic V. Rotavirus inner capsid VP6 acts as an adjuvant in formulations with particulate antigens only. *Vaccines (Basel).* 2020; 8(3): 365. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030365>
22. Macpherson A.J., McCoy K.D., Johansen F.E., Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol.* 2008; 1(1): 11–22. <https://doi.org/10.1038/mi.2007.6>
23. Mantis N.J., Rol N., Corthesy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol.* 2011; 4(6): 603–11. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.41>
6. Wang Y., Li J., Liu P., Zhu F. The performance of licensed rotavirus vaccines and the development of a new generation of rotavirus vaccines: a review. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2021; 17(3): 880–96. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1801071>
7. Chepengeno J., Diaz A., Paim F.C., Saif L.J., Vlasova A.N. Rotavirus C: prevalence in suckling piglets and development of virus-like particles to assess the influence of maternal immunity on the disease development. *Vet. Res.* 2019; 50(1): 84. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0705-4>
8. Changotra H., Vij A. Rotavirus virus-like particles (RV-VLPs) vaccines: An update. *Rev. Med. Virol.* 2017; 27(6). <https://doi.org/10.1002/rmv.1954>
9. Jere K.C., O'Neill H.G., Potgieter A.C., van Dijk A.A. Chimeric virus-like particles derived from consensus genome sequences of human rotavirus strains co-circulating in Africa. *PLoS One.* 2014; 9(9): e105167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105167>
10. Song J.M. Parenteral, non-live rotavirus vaccine: recent history and future perspective. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 2021; 10(3): 203–10. <https://doi.org/10.7774/cevr.2021.10.3.203>
11. Crawford S.E., Estes M.K., Ciarlet M., Barone C., O'Neal C.M., Cohen J., et al. Heterotypic protection and induction of a broad heterotypic neutralization response by rotavirus-like particles. *J. Virol.* 1999; 73(6): 4813–22. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.6.4813-4822.1999>
12. Cherepushkin S.A., Tsibezov V.V., Yuzhakov A.G., Latyshev O.E., Alekseev K.P., Altaeva E.G., et al. Synthesis and characterization of human rotavirus A (Reoviridae: Sedoreovirinae: Rotavirus: Rotavirus A) virus-like particles. *Voprosy virusologii.* 2021; 66(1): 55–64. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-27> EDN: <https://www.elibrary.ru/eersag> (in Russian)
13. Yuan L., Saif L.J. Induction of mucosal immune responses and protection against enteric viruses: rotavirus infection of gnotobiotic pigs as a model. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002; 87(3–4): 147–60. [https://doi.org/10.1016/s0165-2427\(02\)00046-6](https://doi.org/10.1016/s0165-2427(02)00046-6)
14. Azevedo M.P., Vlasova A.N., Saif L.J. Human rotavirus virus-like particle vaccines evaluated in a neonatal gnotobiotic pig model of human rotavirus disease. *Expert. Rev. Vaccines.* 2013; 12(2): 169–81. <https://doi.org/10.1586/erv.13.3>
15. Shoja Z., Jalilvand S., Latifi T., Roohvand F. Rotavirus VP6: involvement in immunogenicity, adjuvant activity, and use as a vector for heterologous peptides, drug delivery, and production of nano-biomaterials. *Arch. Virol.* 2022; 167(4): 1013–23. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05407-9>
16. Latyshev O.E., Eliseeva O.V., Kostina L.V., Alekseev K.P., Khametova K.M., Altaeva E.G., et al. Assessment of immunogenic activity of the cloned human rotavirus A WA strain. *Voprosy virusologii.* 2019; 64(4): 156–64. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-4-156-164> EDN: <https://www.elibrary.ru/sckbyy> (in Russian)
17. Lai C.C., Cheng Y.C., Chen P.W., Lin T.H., Tzeng T.T., Lu C.C., et al. Process development for pandemic influenza VLP vaccine production using a baculovirus expression system. *J. Biol. Eng.* 2019; 13: 78. <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0206-z>
18. Belzhelarskaya C.N. Baculovirus expression systems for recombinant protein production in insect and mammalian cells. *Молекулярная биология.* 2011; 45(1): 142–59. EDN: <https://www.elibrary.ru/ndjchz> (in Russian)
19. Changotra H., Vij A. Rotavirus virus-like particles (RV-VLPs) vaccines: An update. *Rev. Med. Virol.* 2017; 27(6). <https://doi.org/10.1002/rmv.1954>
20. Shoja Z., Jalilvand S., Latifi T., Roohvand F. Rotavirus VP6: involvement in immunogenicity, adjuvant activity, and use as a vector for heterologous peptides, drug delivery, and production of nano-biomaterials. *Arch. Virol.* 2022; 167(4): 1013–23. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05407-9>
21. Heinimäki S., Tamminen K., Hytönen V.P., Malm M., Blazevic V. Rotavirus inner capsid VP6 acts as an adjuvant in formulations with particulate antigens only. *Vaccines (Basel).* 2020; 8(3): 365. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030365>
22. Macpherson A.J., McCoy K.D., Johansen F.E., Brandtzaeg P. The immune geography of IgA induction and function. *Mucosal Immunol.* 2008; 1(1): 11–22. <https://doi.org/10.1038/mi.2007.6>
23. Mantis N.J., Rol N., Corthesy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol.* 2011; 4(6): 603–11. <https://doi.org/10.1038/mi.2011.41>

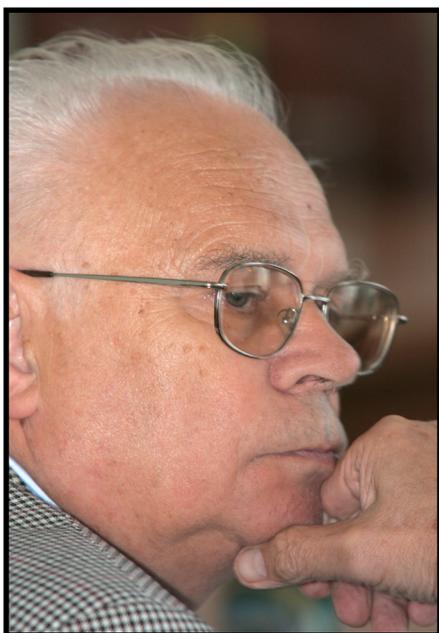
REFERENCES

1. L'vov D.K., ed. *Virology Guide: Human and Animal Viruses and Viral Infections [Rukovodstvo po virusologii: Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
2. Saif L.J., Fernandez F.M. Group A rotavirus veterinary vaccines. *J. Infect. Dis.* 1996; 174(Suppl. 1): S98–106. https://doi.org/10.1093/infdis/174.supplement_1.s98
3. Kumar D., Anderson A.V., Pittman J., Springer N.L., Marthaler D.G., Mwangi W. Antibody response to rotavirus C pre-farrow natural planned exposure to gilts and their piglets. *Viruses.* 2022; 14(10): 2250. <https://doi.org/10.3390/v14102250>
4. Vetter V., Gardner R.C., Debrus S., Benninghoff B., Pereira P. Established and new rotavirus vaccines: a comprehensive review for healthcare professionals. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2022; 18(1): 1870395. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1870395>
5. Folorunso O.S., Sebolai O.M. Overview of the development, impacts, and challenges of live-attenuated oral rotavirus vaccines. *Vaccines (Basel).* 2020; 8(3): 341. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030341>

НЕКРОЛОГИ



Николай Николаевич Носик (07.04.1932–19.03.2023)



19 марта 2023 г. ушёл из жизни руководитель отдела репродукции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, доктор медицинских наук, профессор Николай Николаевич Носик.

Н.Н. Носик – известный учёный в области вирусологии, автор более 280 опубликованных научных работ в России и за рубежом, ряда патентов и монографий.

Научные исследования Н.Н. Носика посвящены профилактике и лечению вирусных инфекций. Проведённые им исследования по проблеме интерферонов и их индукторов легли в основу нового направления в разработке противовирусных препаратов с широким спектром активности. В результате этих исследований были созданы и внедрены такие активные противовирусные препараты, как ридостин, ларифан, амиксин и ряд других.

В последние годы Н.Н. Носик руководил исследованиями по разработке и изучению дезинфицирующих вирулицидных средств, активно участвовал в создании современной нормативной документации для оценки вирулицидной эффективности биоцидов.

Н.Н. Носик достойно представлял отечественную медицинскую вирусологию за рубежом, работая в научных лабораториях США, Франции и Китая. В период работы советником по вирусологии в Региональном бюро Всемирной организации здравоохранения для Юго-Восточной Азии, Н.Н. Носик создал вирусологическую ла-

бораторию в Национальном институте инфекционных болезней в Дели, Индия, координировал и проводил эпидемиологические и вирусологические исследования во многих странах региона – от Непала до Мьянмы.

Все 67 лет научной жизни Н.Н. Носика связаны с Институтом вирусологии, в который он пришёл аспирантом в 1956 г. после окончания с отличием Первого Московского медицинского института им. И.М. Сеченова. После защиты в 1960 г. диссертации на степень кандидата медицинских наук работал в должности младшего научного сотрудника, затем старшего научного сотрудника. С 1988 г. являлся руководителем лаборатории онтогенеза вирусов и руководителем отдела репродукции вирусов, членом Ученого совета Института вирусологии им. Д.И. Ивановского. Под руководством Н.Н. Носика подготовлено 7 кандидатов наук.

Н.Н. Носик награждён медалью «За заслуги перед отечественным здравоохранением», знаком «Отличник здравоохранения», являлся почётным членом Национального союза «Медико-биологическая защита».

Все эти годы Н.Н. Носик активно участвовал в общественной жизни института, являясь в разные годы редактором стенгазеты, членом команды КВН, председателем научно-производственной комиссии Группы народного контроля и более 25 лет избирался председателем профсоюзного комитета института, всегда и везде отстаивая интересы его сотрудников.

Многолетнюю научную творческую деятельность Н.Н. Носика всегда отличала высокая принципиальность и требовательность к качеству проводимых исследований, о чём свидетельствовал заслуженный авторитет в научном мире и у сотрудников института.

Выдающийся учёный, дипломат, активный гражданин, энергичный организатор, общительный, улыбчивый, с огромным чувством юмора, поэт, прозаик и художник, замечательный друг и отец – таким мы запомним этого замечательного человека.

Вот несколько строк, сказанных им:

*Дни рождения, как вёрсты,
Стоят на жизненном пути.
Как долг путь,
Лишь знают звёзды,
И как с достоинством пройти.*

Всего несколько дней не дожил Николай Николаевич Носик до своего 91-летия.

Свой жизненный путь он прошёл с большим достоинством.

Память об этом выдающемся человеке сохранится в сердцах всех, кто был с ним знаком.

ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

Памяти выдающегося вирусолога



В этом году исполняется 90 лет со дня рождения выдающегося советского (российского) вирусолога, всемирно признанного эксперта по этиологии, диагностике и профилактике вирусных гепатитов, академика Российской академии медицинских наук, профессора, доктора медицинских наук Михаила Семёновича (Суреновича) Балаяна.

Он родился 11 мая 1933 г. в Москве. После окончания в 1957 г. Первого медицинского института им. И.М. Сеченова был направлен в аспирантуру Института полиомиелита АМН СССР и после её окончания в 1960 г. стал младшим научным сотрудником лаборатории иммунологии энтеровирусов этого института. В 1961 г. защитил кандидатскую диссертацию по иммунологии вируса полиомиелита.

С 1962 по 1972 г. был старшим научным сотрудником института, а в 1966–1968 гг. работал в отделе вирусологии Национального института микробиологии, эпидемиологии и гигиены в Гаване (Республика Куба). В 1971 г. защитил докторскую диссертацию по проблеме полиомиелита и в период 1971–1974 гг. работал во Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в Женеве в должности эксперта-вирусолога, а с 1974 по 1976 г. руководил вирусологическим проектом ВОЗ в Уганде.

Вернувшись в Москву, М.С. Балаян был назначен заместителем директора по научной работе Института полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР и в августе 1976 г. возглавил вновь созданную в инсти-

туте лабораторию гепатита. Благодаря его настойчивости и усилиям уже в 1977 г. лаборатория была оснащена необходимым оборудованием и приборами, укомплектована сотрудниками и начала работу. В этой лаборатории впервые в СССР стали проводиться исследования, посвящённые проблемам диагностики и профилактики вирусного гепатита А (ГА). За последующую четверть века в этой лаборатории под его руководством и при непосредственном участии были проведены исследования, имевшие важное значение для изучения ГА. Указывая на важнейшие из них, отметим воспроизведение в клеточной культуре короткого цикла репродукции вируса ГА (ВГА), что позволило получить нужные количества жизнеспособного ВГА, позже использованного для диагностики и профилактики ГА (вакцина).

На основе лишь отечественных материалов была разработана первая в СССР диагностическая тест-система иммуноферментного метода (ИФМ) обнаружения ВГА и антител к нему. Она была использована для оценки иммуноструктуры в отношении ВГА у населения ряда регионов СССР. Была также создана экспериментальная модель ВГА-инфекции на игрунковых обезьянах, которую много лет использовали для научных исследований. Кроме того, здесь же на основе культурального ВГА была создана признанная эффективной вакцина против ГА. И, наконец, были открыты, идентифицированы и изучены вирусы ГА низших приматов Старого Света. Их инфекция была детально изучена на модели инфицированных игрунковых обезьян. Эти научные достижения вскоре обеспечили лаборатории международное признание и статус Центра, сотрудничающего с ВОЗ по ГА, и выдвинули М.С. Балаяна в число признанных экспертов в области ГА.

Вместе с тем в этой же лаборатории был проведён ряд важных, в том числе первых в мире, исследований в области диагностики вирусного гепатита, в 1990 г. названного гепатитом Е (ГЕ), и изучения данного вируса. При этом основой и первым этапом этих исследований послужил проведённый М.С. Балаяном летом 1981 г. контролируемый опыт по экспериментальному самозаражению гепатитом, который привел к развитию у него тяжёлого желтушного заболевания. Результаты исследований биологических материалов, полученных в этом опыте, в то время внесли весомый вклад в изучение ВГЕ и самого ГЕ. Говоря лишь о важнейших из них, надо отметить, что в лаборатории был визуализирован и впервые с помощью иммуноэлектронной микроскопии идентифицирован ВГЕ, таксономически отличавшийся от ВГА и способный вызывать заболевание у людей и лабораторных животных, включая игрунковых и других обезьян. Более того, была разработана одна из первых в мире тест-систем ИФМ для выявления ВГЕ и анти-

тел к нему, успешно использованная как в научных, так и клинических целях. Наконец, были получены данные, прямо указывающие на зоонозную природу ВГЕ-инфекции и важную роль диких и домашних животных в её поддержании в природе и обществе.

Все перечисленные выше и многие другие данные, полученные М.С. Балаяном и его сотрудниками, были высоко оценены научным сообществом, а их имена сегодня неизменно упоминаются во всех авторитетных монографиях в ряду учёных, открывших ВГЕ. М.С. Балаян был признан одним из ведущих в мире учёных в области изучения энтеральных вирусных гепатитов и до конца жизни оставался членом международного комитета экспертов ВОЗ и других авторитетных научных сообществ, занимающихся изучением вирусных гепатитов.

Нам посчастливилось лично общаться с М.С. Балаяном не только в период работы в руководимой им лаборатории, но и в научных командировках. Наблюдая за этим блистательным учёным и чрезвычайно талантливым человеком, нельзя было не отметить его прекрасное образование, широкую эрудицию и высочайшую степень компетентности не только в вирусологии, но и в эпидемиологии и иммунологии. Кроме того, он был необычайно обаятельным и приятным собеседником и полемистом, отличающимся утончённым чувством юмора. Он всегда был исключительно вежлив и доброжелателен по отношению к окружающим и, оставаясь авторитетом,

всегда пользовался любовью сотрудников и коллег.

Свободно владея английским и испанским языками, на конференциях он активно общался со своими именитыми коллегами из разных стран, а многие из них долгие годы поддерживали с ним тёплые дружеские отношения. При этом, будучи человеком мира, он всегда оставался истинным патриотом.

Его перу принадлежат сотни научных статей и в том числе изданные за рубежом в ведущих вирусологических журналах мира. Он соавтор трёх монографий и широко известного в России и странах СНГ энциклопедического словаря «Вирусные гепатиты», который за четверть века выдержал три издания. Он подготовил восемь кандидатов и двух докторов наук, а в лабораторию по его приглашению постоянно приезжали молодые учёные из СНГ, европейских и азиатских стран. Он с удовольствием общался с молодыми исследователями и постоянно интересовался новостями в мире науки. Интерес к научному поиску и работоспособность у него сохранились до его безвременной кончины 5 ноября 2000 г. в Москве.

Сегодня вспоминая М.С. Балаяна, его коллеги и ученики, ныне работающие в разных странах, неизменно испытывают не только горечь утраты, но и гордость за выдающегося учёного, своего современника, внёсшего заметный вклад в развитие науки и на весь мир прославившего отечественную вирусологию в деле изучения вирусных энтеральных гепатитов.

Член-корреспондент РАН, профессор М.И. Михайлов,

профессор А.Г. Анджапаридзе,

профессор М.К. Мамедов (Москва, Тбилиси, Баку)

Problems
of Virology

Voprosy
Virusologii