

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

EXPERIMENTAL RESEARCHES

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОНОВОЙ ЭКСПРЕССИИ ИНТЕРФЕРОНА БЕТА В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК СИБИРСКОЙ НОЧНИЦЫ (*MYOTIS SIBIRICUS*)

**Ляпунова Н.А.,
Хаснатинов М.А.,
Данчинова Г.А.,
Соловаров И.С.**

ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» (664003, г. Иркутск, ул. Тимирязева, 16, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
Ляпунова Наталья Андреевна,
e-mail: nataly2193@mail.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Рукокрылые являются хозяевами и переносчиками широкого спектра зоонозов. Исследование иммунного ответа этих млекопитающих на вирусные инфекции необходимо для раскрытия фундаментальных механизмов циркуляции зоонозных инфекций в природе. Существует гипотеза о постоянно «включенной» активности белков интерферонового пути у рукокрылых для противодействия вирусным инфекциям. В этом исследовании мы оценили уровень активности системы врожденного иммунитета в клеточной линии почки сибирской ночницы (*Myotis sibiricus*, Kastschenko, 1905) *MdbK3-14*, взяв в качестве маркера экспрессию интерферона бета.

Цель исследования. Оценить фоновый уровень экспрессии гена интерферона бета (*IFN-β*) в неинфицированных клетках *Myotis sibiricus*.

Методы. Культуру клеток *MdbK3-14* выращивали в 24-луночных планшетах. Монослои клеток открепляли раствором трипсина и выделяли суммарную РНК. Концентрацию мРНК транскриптов гена *IFN-β* и референтных генов бета-актина (*ACTB*) и субъединицы А сукцинатдегидрогеназного комплекса (*SDHA*) определяли с помощью одностадийной мультиплексной ОТ-рвПЦР и подтверждали с помощью ОТ-цПЦР.

Результаты. Разработаны специфичные праймеры с зондом для детекции мРНК гена *IFN-β* в клетках рукокрылых. Выявлена стабильная детекция транскриптов генов *SDHA* и *IFN-β* как в ОТ-рвПЦР ($CV = 0,5\%$ и $CV = 0,2\%$ соответственно), так и в ОТ-цПЦР ($CV = 0,8\%$ и $CV = 1,4\%$ соответственно). Детекция мРНК *ACTB* в ОТ-цПЦР также проходила равномерно во всех образцах ($CV = 0,8\%$), однако в ОТ-рвПЦР выявлена некоторая нестабильность для бета-актина ($CV = 3,6\%$). Результаты количественного определения в ОТ-рвПЦР и ОТ-цПЦР коррелировали между собой. Установлено, что уровень экспрессии *IFN-β* в клетках *MdbK3-14* сопоставим (в ОТ-рвПЦР в среднем $0,97 \pm 0,15$ отн.ед.) или несколько ниже (в ОТ-цПЦР в среднем $0,13 \pm 0,05$ отн.ед.), чем экспрессия белков домашнего хозяйства *ACTB* и *SDHA*.

Заключение. При отсутствии иммунной стимуляции в клетках почки *M. sibiricus* наблюдается фоновая экспрессия *IFN-β*.

Ключевые слова: *Myotis sibiricus*, клеточные линии, экспрессия, мРНК, *SDHA*, *ACTB*, *IFN-β*, гены «домашнего хозяйства», количественная ОТ-ПЦР, цифровая ОТ-ПЦР

Статья поступила: 10.09.2025
Статья принята: 24.10.2025
Статья опубликована: 26.11.2025

Для цитирования: Ляпунова Н.А., Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Соловаров И.С. Количественное определение фоновой экспрессии интерферона бета в культуре клеток сибирской ночницы (*Myotis sibiricus*). *Acta biomedica scientifica*. 2025; 10(5): 233-243. doi: 10.29413/ABS.2025-10.5.25

QUANTIFICATION OF BACKGROUND EXPRESSION OF INTERFERON BETA IN CELL CULTURE OF SIBERIAN BAT (*MYOTIS SIBIRICUS*)

**Liapunova N.A.,
Khasnatinov M.A.,
Danchinova G.A.,
Solovarov I.S.**

Scientific Centre for Family Health
and Human Reproduction Problems
(Timiryazeva st., 16, Irkutsk 664003,
Russian Federation)

Corresponding author:
Natalia A. Liapunova,
e-mail: nataly2193@mail.ru

RESUME

Background. The study of the immune response of these mammals to viral infections is necessary to reveal the fundamental mechanisms of the circulation of zoonotic infections in nature. There is a hypothesis about the constantly "on" activity of the interferon pathway proteins, developed evolutionarily in bats to counteract viral infections. We assessed the expression of interferon beta as a marker of the innate immune system in kidney cells of the Siberian bat (*Myotis sibiricus*, Kastschenko, 1905) MdbK3-14.

The aim. Evaluation of the background level of interferon beta (IFN- β) gene expression in bat cells as a marker of the activity of the mammalian innate immune system.

Materials and methods. MdbK3-14 cells were grown in 24-well plates. Cell monolayers were detached with trypsin solution and total RNA was isolated. The concentration of mRNA of IFN- β gene transcripts and reference genes beta actin (ACTB) and succinate dehydrogenase subunit A (SDHA) was determined by one-step multiplex RT-qPCR and confirmed by RT-dPCR.

Results. Specific primers with a probe for detecting mRNA of the IFN- β gene in bat cells were designed. The detection of SDHA and IFN- β gene transcripts was stable both in RT-qPCR (CV = 0.5 % and CV = 0.2 %, respectively) and in RT-dPCR (CV = 0.8 % and CV = 1.4 %, respectively). In addition, stable detection of ACTB mRNA was achieved using RT-dPCR (CV = 0.8 %), but the average variability value for actin using RT-qPCR exceeded the permissible value (CV = 3.6 % with an acceptable CV \leq 2 %). The results of quantitative determination in RT-qPCR and RT-dPCR correlated with each other. The expression levels of IFN- β in MdbK3-14 cells averaged 0.97 ± 0.15 relative units in RT-qPCR and 0.13 ± 0.05 relative units in RT-dPCR.

Conclusions. In the absence of immune stimulation, background expression of IFN- β occurs in the *M. sibiricus* kidney cell line.

Key words: *Myotis sibiricus*, cell lines, expression, mRNA, SDHA, ACTB, IFN- β , house-keeping genes, quantitative RT-PCR, digital PCR

Received: 10.09.2025
Accepted: 24.10.2025
Published: 26.11.2025

For citation: Liapunova N.A., Khasnatinov M.A., Danchinova G.A., Solovarov I.S. Quantification of background expression of interferon beta in cell culture of Siberian bat (*Myotis sibiricus*). *Acta biomedica scientifica*. 2025; 10(5): 233-243. doi: 10.29413/ABS.2025-10.5.25

ОБОСНОВАНИЕ

Рукокрылые являются хозяевами и переносчиками широкого спектра зоонозных инфекций [1]. Исследование иммунного ответа этих млекопитающих на вирусные инфекции необходимо для раскрытия фундаментальных механизмов циркуляции зоонозных инфекций в природе и поможет понять процесс возникновения новых заболеваний человека. Первой линией защиты у млекопитающих является система врожденного иммунитета, которая состоит из различных клеток и молекул, способных распознавать и уничтожать патогены вирусной и бактериальной природы, защищая организм от развития иммунопатологических процессов.

Одним из ключевых звеньев активации врожденного иммунного ответа является интерферон бета (IFN- β). Этот цитокин относится к интерферонам I типа, которые индуцируются непосредственно в ответ на вирусную инфекцию [2]. Описана экспрессия и противовирусная активность IFN- β в клетках почки китайской летучей мыши, *Myotis davidii*, при заражении вирусом Сендей, который относится к семейству *Paramyxoviridae* [3]. Установлено, что экспрессия гена *IFN- β* , индуцированная вирусом, выше в клетках рукокрылых, чем в клетках мышевидных грызунов [4]. Считается, что именно противовирусные интерфероны I типа (IFN- α/β) ответственны за высокую толерантность летучих мышей к зоонозным вирусам [5]. Существует гипотеза о постоянно «включенной» системе интерферона у рукокрылых [6]. Вероятно, новые вирусы, попадая в организм летучей мыши, не вызывают иммунопатологию из-за постоянной активности белков интерферонового пути, выработанной эволюционно. Можно предположить, что эта особенность характерна для всех представителей рукокрылых, однако до сих пор этот вопрос исследован слабо. Например, зарубежными авторами показано, что IFN- α конститутивно экспрессируется во всех органах здоровых особей австралийской черной летучей лисицы *Pteropus alecto* и малайского коротконосого крыланы *Cynopterus brachyotis*, а IFN- β , напротив, едва обнаруживается [7]. Но оба этих вида рукокрылых относятся к семейству *Pteropodidae*, подотряда *Megachiroptera* (крыланы или летучие лисицы). В то же время, другие авторы выявили фоновое присутствие IFN- β и подтипов IFN типа I в клетках почки *Myotis daubentonii*, которая относится к подотряду *Microchiroptera* (летучие мыши) [5]. Кроме того, в отличие от результатов по крыланам, авторами данного исследования не обнаружено ни различных подтипов IFN- α , ни необычно высокой базовой экспрессии IFN в клетках *Myotis daubentonii*, что указывает на явные различия между интерфероновыми системами летучих мышей и летучих лисиц, и, конечно, требует целенаправленного изучения каждой группы рукокрылых.

Ранее нами была создана перевиваемая линия MdbK3-14, являющаяся линией клеток почки сибирской ночницы (*Myotis sibiricus*, Kastschenko, 1905) – широко распространенного и многочисленного вида рукокрылых. Было установлено, что репликация

флавивирусов, в частности, вируса клещевого энцефалита (ВКЭ), в этой клеточной линии снижена по сравнению с клеточными линиями резервуарных (восточноазиатская лесная мышь) и лабораторных (свинья) хозяев вируса [8]. Это проявлялось в затрудненном проникновении вируса внутрь клеток MdbK3-14, пониженней эффективности репликации РНК и продукции инфекционного вируса, замедлением репродукции и снижением итоговых титров инфекционного вируса [9]. Также оказалось, что по сравнению с клетками лабораторного и резервуарного хозяев, культура клеток MdbK3-14 является наименее чувствительной к заражению ВКЭ, цитопатическое действие вируса не выражено, гибели клеток вследствие заражения ВКЭ не происходит [10]. Для выяснения механизмов, обуславливающих клеточную резистентность к вирусной инфекции, мы попытались оценить фоновый уровень врожденного иммунитета в неинфицированных клетках MdbK3-14.

Цель данной работы состояла в оценке фонового уровня экспрессии гена *IFN- β* , кодирующего интерферон бета в клетках сибирской ночницы как маркера активности системы врожденного иммунитета.

Основным методом количественного анализа профиля экспрессии генов выбрана полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в реальном времени (OT-рвПЦР), а в качестве референтов выбраны гены, кодирующие бета-актин (*ACTB*) и субъединицу А сукцинатдегидрогеназного комплекса (*SDHA*). Бета-актин — это белок, который играет важную роль в обеспечении подвижности, поддержании структуры и целостности клеток эукариот [11]. Субъединица А сукцинатдегидрогеназного комплекса интегрируется в белковый комплекс, который встраивается в митохондриальную мембрану и принимает участие в функционировании цикла Кребса и дыхательной цепи [12]. Критическая роль этих белков в поддержании жизнеспособности клетки обуславливает постоянство и стабильность экспрессии кодирующих их генов в широком диапазоне внешних условий. Помимо этого, методика оценки экспрессии *ACTB* и *SDHA* ранее была успешно апробирована нами на культурах клеток грызунов и парнокопытных [13]. Предположительно, в клетках рукокрылых экспрессия этих генов также будет стабильной. В качестве дополнительного метода оценки концентрации мРНК целевого и референтных генов мы использовали цифровую OT-ПЦР (OT-цПЦР). Несмотря на то, что OT-цПЦР количественно определяет абсолютное значение концентрации целевого фрагмента в каждом образце, для нормализации реакции также рекомендуется использовать референтные гены [14], поскольку на образцы могут влиять другие факторы, такие как обратная транскрипция.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Разработка праймеров

Набор зонда с праймерами для выявления мРНК интерферона бета рукокрылых был разработан на основе

данных о последовательностях *IFN-β* рода *Myotis* sp., опубликованных в базе данных GenBank (номера доступа XM_005853023 и XM_036329120). Выравнивание последовательностей выполняли в программе BioEdit 7.0.5.3 с помощью встроенного алгоритма CLUSTAL W с итоговой ручной корректировкой. В работе также применялся веб-инструмент OligoCalc¹ для проектирования олигонуклеотидных последовательностей. Проверку специфичности праймеров и зондов проводили с помощью поиска BLAST² и с помощью ПЦР с визуализацией ампликонов в агарозном геле. Разработка, структура и валидация праймеров и зондов для референтных генов *ACTB* и *SDHA* опубликованы нами ранее [13].

Культура клеток

Перевиваемая адгезивная клеточная линия почки *Myotis sibiricus* (Kastschenko, 1905) MdbK3-14 была разработана в лаборатории трансмиссивных инфекций ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ [9]. В данной работе использовали сток клеток на 64 пассаже. Поддержание культуры клеток осуществляли на среде RPMI1640 с добавлением антибиотиков и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) HyClone (Thermo Scientific, UK).

Исследование одобрено Комитетом по биомедицинской этике ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, протокол № 2 от 18.02.2020 г.

Подготовка клеток

Монослой клеток с 90–100 % конфлюэнтностью открепляли от флаcona с помощью трипсина с добавлением 0,5 mM ЭДТА (T\Е). После этого клетки ресуспенировали в ростовой среде (RPMI1640 с добавлением L-глутамина, пенициллина, 100 U\мл, стрептомицина, 100 мкг/мл, ЭТС, 10 %) и определяли концентрацию клеток с помощью камеры Горяева. Полученную клеточную суспензию приводили к концентрации 1×10^5 клеток/мл и сеяли в 24-луночные планшеты в количестве 1 мл суспензии на лунку. Планшеты с клетками инкубировали в течение 16–18 часов при 37°C в условиях 5 % CO₂, после чего ростовую среду удаляли и заменяли 1 мл среды поддержки (RPMI1640 с добавлением L-глутамина, антибиотиков и 2 % ЭТС). Через 24 часа инкубации среду поддержки удаляли, клетки трижды промывали бессывороточной средой и открепляли 0,25 мл T\Е. После этого в каждую лунку добавляли 0,25 мл среды поддержки, клетки ресуспенсировали и переносили в 1,5 мл пробирки «Эппendorф». Клетки осаждали центрифугированием (центрифуга Eppendorf MiniSpin, 13400 об/мин в течение 5 мин) при +4°C, ресуспенсировали в 1 мл стерильного фосфатно-солевого буфера (PBS, pH = 7,4), определяли концентрацию клеток и переносили в криопробирки в аликовтах, содержащих по 5×10^4 клеток для каждого образца. Клетки осаждали центрифугированием при +4°C, надклеточную жидкость удаляли, а осадок клеток хранили при -70°C и использовали целиком однократно для выделения РНК. Все этапы работы по сбору образцов клеток проводились на льду.

Выделение РНК

Для оценки экспрессии генов *SDHA*, *ACTB* и *IFN-β* в клетках MdbK3-14 получали образцы РНК с использованием наборов HiPure Total RNA Kit (Magen Biotechnology, Гуанчжоу) и RNase Free DNaseI Set (Magen Biotechnology, Гуанчжоу) согласно инструкции производителя. Итоговый объем очищенного препарата РНК составлял 100 мкл. Качество очистки РНК от геномной ДНК контролировали путем проведения дополнительного ПЦР без ОТ-реакции с праймерами к исследуемым генам. Препарат РНК считали пригодным для дальнейших исследований при отсутствии накопления специфической флуоресценции в рвПЦР, а также при отсутствии целевого фрагмента в гель-электрофорезе после рутинной ПЦР. В каждой постановке использовали отрицательные контрольные образцы выделения РНК.

Одностадийная ОТ-ПЦР

Одностадийные мультиплексные тесты ОТ-рвПЦР и ОТ-цПЦР проводили с помощью набора реагентов Luna Universal Probe One-Step RT qPCR (New England Biolabs, США) согласно инструкции производителя. Реакцию проводили в объеме 30 мкл. В реакционную смесь добавляли два специфических праймера до рабочей концентрации 400 nM каждого праймера, соответствующий зонд до концентрации 200 nM и 3 мкл РНК-матрицы. Условия проведения реакции как для ОТ-рвПЦР, так и для цПЦР включали обратную транскрипцию при 55°C в течение 10 мин, инактивацию ревертазы при 95°C в течение 1 мин и 45 циклов ПЦР: 95°C – 10 сек; Тa°C – 1 сек; 60°C – 20 сек. Интенсивность флуоресценции измеряли на стадии 60°C каждого цикла ПЦР по каналам FAM, ROX и Су5. За цикл количественного определения (Cq) для ОТ-рвПЦР принимали первый цикл, при котором интенсивность флуоресцентного сигнала превышала 10 стандартных отклонений от фона. Флуоресценцию считали фоновой с 1 по 10 цикл. Расчеты для ОТ-рвПЦР выполняли с помощью программы BioRad CFX Manager v3.1 (Bio-Rad Laboratories Inc., США).

Проведение ОТ-цПЦР выполняли с помощью автоматической системы цифровой ПЦР SCI Digital S500 (TurtleBiotech, Китай) в соответствии с инструкцией производителя. Данная платформа основана на распределении образца более чем на 20000 независимых микрокапель одинакового размера в микрополости (ячейки) цифрового ПЦР-чипа с помощью автоматического устройства системы. Каждая микрокапля имеет свой флуоресцентный сигнал, который детектируется и подсчитывается после завершения реакции. Концентрацию специфичных молекул РНК в исходном образце определяли на основе принципа распределения Пуассона с помощью программы SCI Digital v1.0.0.0P1.7 (TurtleBiotech, Китай).

Оценка линейности и эффективности ПЦР

Для каждого образца РНК готовили серию из трех десятикратных разведений в свободной от РНКаз воде от 10^{-2} до 10^{-5} .

1 <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>

2 <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Для полученных в ходе теста ОТ-рвПЦР значений Сq каждого из разведений рассчитывали среднее и стандартное отклонение. По средним значениям строили стандартную кривую. Эффективность ОТ-рвПЦР (E) рассчитывали по формуле $\{(10[-1/k] - 1) \times 100\}$, где k – угловой коэффициент (slope) стандартной кривой и выражали в процентах. Эффективность реакции считали приемлемой при $90\% \leq E \leq 110\%$.

Для оценки линейности ОТ-цПЦР сравнивали ожидаемые концентрации разведений РНК с наблюдаемыми значениями. Для этого, концентрацию РНК в образце с разведением 1×10^{-2} считали стартовой. Ожидаемые значения концентрации РНК в образцах с разведением 1×10^{-3} и 1×10^{-4} рассчитывали путем деления стартовой концентрации на 10 и на 100 соответственно. Для полученных в ходе теста ОТ-цПЦР концентраций каждого из разведений рассчитывали среднее значение, которое использовали в качестве наблюдаемой концентрации, и стандартное отклонение.

Оценка повторяемости ОТ-рвПЦР и ОТ-цПЦР

Внутритестовую повторяемость теста определяли как коэффициент вариации (CV, %) и выражали в десятичных логарифмах (\log_{10}) концентрации в трех независимых повторах ОТ-рвПЦР каждого разведения РНК в ходе одного теста, выполненного в один день и на одном и том же приборе. Значение CV ОТ-цПЦР определяли по двум независимым воспроизведениям каждого разведения образца РНК.

Статистическая обработка

Линейность ОТ-ПЦР оценивали с помощью регрессионного анализа калибровочных кривых. Зависимость Сq от степени разведения образца для ОТ-рвПЦР и зависимость наблюдаемой концентрации РНК от ожидаемой для ОТ-цПЦР считали линейными при коэффициенте детерминации $R^2 > 0,8$. Чтобы оценить вариабельность наблюдений, определяли стандартное отклонение средних значений. Выпадающие значения Сq РНК исключали с помощью квартильного метода [15]. Для выявления корреляции между концентрацией РНК, полученной при ОТ-цПЦР, и показателями Сq, полученными при ОТ-рвПЦР, использовали коэффициент корреляции *r*-Пирсона. Относительную экспрессию *IFN-β* по результатам ОТ-рвПЦР рассчитывали с помощью метода $\Delta\Delta Cq$ и нормализовали по референтным генам *SDHA* и *ACTB*. Нормализованную экспрессию *IFN-β* по результатам ОТ-цПЦР рассчитывали как отношение концентрации мРНК *IFN-β* к среднему геометрическому значению концентрации референтных генов. Расчеты производили с помощью программ MS Office EXCEL 2003, MaxStat Lite v.3.06 и CFX Manager.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Специфичность ПЦР

Выбранные пары праймеров для генов *ACTB*, *SDHA* и *IFN-β* показали высокую специфичность и синтезировали ампликоны ожидаемого размера без дополнительных или неспецифических полос при температуре

отжига 55°C (рис. 1.) Идентичные для всех генов условия проведения ПЦР позволили нам осуществить мультиплексирование реакции, повысив сопоставимость получаемых данных.

Результаты ОТ-рвПЦР показали четко выраженную симмоидную форму кривых амплификации целевых мРНК изучаемых генов и незначительную фоновую составляющую флуоресценции. На всех графиках кривые флуоресценции серийных десятикратных разведений РНК в диапазоне от 10^{-2} до 10^{-4} пересекали

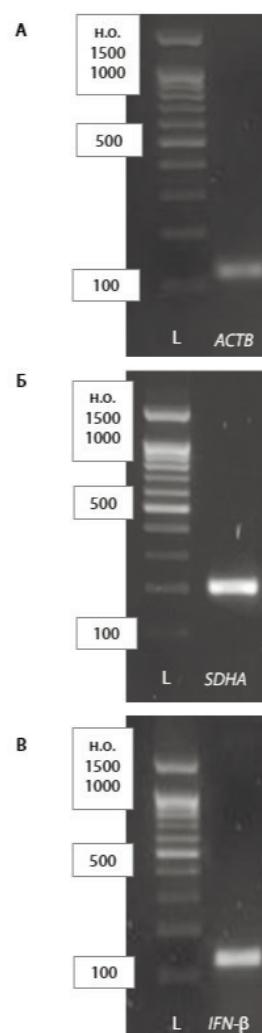


РИС. 1.

Специфичность ПЦР к фрагментам мРНК-транскриптов *ACTB*, *SDHA* и *IFN-β* рукокрылых при температуре отжига 55°C. А – ген *ACTB*, ожидаемая длина фрагмента 120 н.о.; Б – ген *SDHA*, ожидаемая длина фрагмента 209 н.о.; В – ген *IFN-β*, ожидаемая длина фрагмента 119 н.о. L – маркер молекулярного веса ДНК, фрагменты длиной 100, 500, 1000 и 1500 н.о. обозначены по краям электрофореграмм

FIG. 1.

Specificity of PCR for fragments of *ACTB*, *SDHA* and *IFN-β* mRNA transcripts of bats at an annealing temperature of 55°C. A – *ACTB* gene, expected fragment length 120 bp; B – *SDHA* gene, expected fragment length 209 bp; B – *IFN-β* gene, expected fragment length 119 bp. L – DNA size ladder, the bands of 100, 500, 1000 and 1500 base pairs are labeled aside of the gel

пороговую линию с интервалом три цикла, что соответствует десятикратному разведению образцов. Образцы в разведении 10^{-5} для генов *ACTB* и *SDHA* на основе квартильного теста были отнесены к выпадающим значениям, и в дальнейшем анализе это разведение не учитывалось. В отрицательных контрольных образцах нарастание флуоресцентного сигнала не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии ДНК-контаминации и о специфичности детекции мРНК генов *ACTB*, *SDHA* и *IFN-β* в клетках рукокрылых. Общий динамический диапазон теста составил 10000:1.

Линейность и эффективность ПЦР

Значение коэффициента детерминации R^2 (линейность) в ОТ-рвПЦР превышало 0,99 для всех калибровочных кривых (рис. 2). Это позволяет утверждать, что во всех исследованных вариантах ОТ-рвПЦР зависимость Cq от концентрации целевой РНК соответствует регрессионной линейной модели и хорошо описывает наблюдаемые данные. Средние значения эффективности ОТ-рвПЦР попадали в диапазон оптимальных значений от 90 % до 110 % включительно [16, 17] и составили 105 % (*ACTB*), 92 % (*SDHA*) и 101 % (*IFN-β*) с угловыми коэффициентами калибровочных кривых 3,22, 3,53 и 3,31 соответственно.

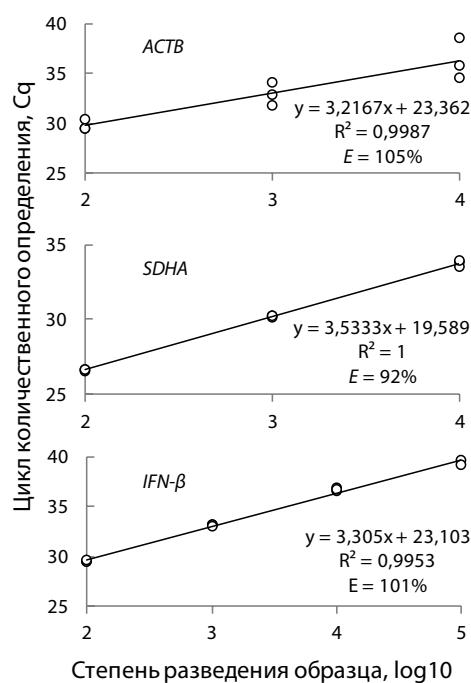


РИС. 2.

Оценка линейности (R^2) и эффективности (E) ОТ-рвПЦР с праймерами к генам рукокрылых: бета-актина (*ACTB*), субъединицы А сукцинатдегидрогеназного комплекса (*SDHA*) и интерферона бета (*IFN-β*). Планки погрешностей отражают стандартное отклонение по результатам трех повторов ОТ-рвПЦР

FIG. 2.

Evaluation of the linearity (R^2) and efficiency (E) of RT-qPCR targeting bat genes for beta-actin (*ACTB*), succinate dehydrogenase subunit A (*SDHA*) and interferon beta (*IFN-β*). Error bars indicate standard deviations of three replicates of RT-qPCR

В ОТ-цПЦР, при высоких нагрузках матрицы (разведение 1:100), положительные ячейки по поверхности чипа распределялись неравномерно с очевидным истощением к правому краю изображения. Визуально, погрешность занимала порядка 10–20 % емкости чипа (рис. 3, ряд « 1×10^{-2} »). Поскольку подобная картина воспроизводилась и во втором повторе ОТ-цПЦР (изображение доступно по запросу), можно предположить, что это явление не связано с дефектом одного конкретного чипа. Для установления природы и возможных последствий наблюдаемого неравномерного распределения положительных сигналов необходимы дополнительные исследования и оптимизация платформы SCI Digital S500 для работы с высокими (вплоть до насыщения) концентрациями мРНК. При разведениях матрицы РНК 1:1000 и 1:10000 распределение положительных ячеек на чипе было случайным и равномерным (рис. 3, ряды « 1×10^{-3} » и « 1×10^{-4} »), что позволило провести дальнейший анализ.

Теоретически, в серии десятикратных разведений суммарной матрицы, концентрация целевой мРНК должна изменяться также десятикратно с каждым разведением. Для оценки достоверности анализа ОТ-цПЦР на платформе SCI Digital S500 мы рассчитали ожидаемые концентрации мРНК, используя данные по разведению 1:100 в качестве исходных. Далее мы провели регрессионный анализ соответствия наблюдаемого изменения концентрации мРНК ожидаемым значениям.

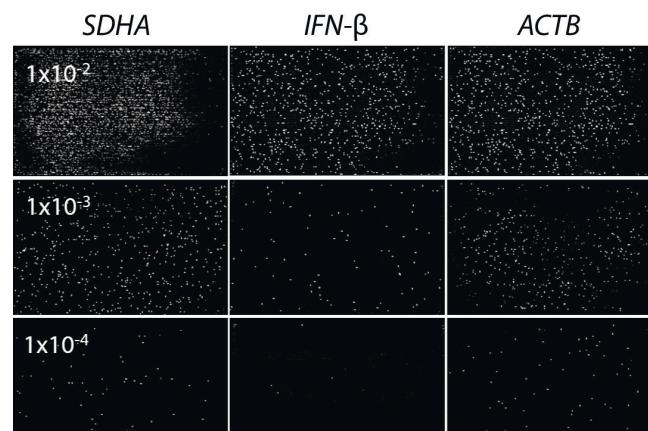


РИС. 3.

Распределение положительных ячеек в чипах ОТ-цПЦР « 1×10^{-2} », « 1×10^{-3} » и « 1×10^{-4} » с мультиплексными ОТ-цПЦР-реакциями по каналам флуоресценции FAM (для детекции транскриптов *SDHA*), ROX (*IFN-β*) и Cy5 (*ACTB*). Степень разведения образца РНК в каждом чипе составляет 1:100, 1:1000 и 1:10000 соответственно. Белые точки означают положительный сигнал ПЦР-амплификации по соответствующему каналу

FIG. 3.

Positive droplets distribution in the chips « 1×10^{-2} », « 1×10^{-3} » and « 1×10^{-4} » with triplex RT-dPCR reactions in the FAM (for detection of *SDHA* transcripts), ROX (*IFN-β*), and Cy5 (*ACTB*) fluorescence channels. The RNA template dilution in each chip was 1:100, 1:1000, and 1:10000, respectively. White dots indicate a positive PCR-amplification signal in the corresponding channel

Оказалось, что реально наблюдаемые данные по всем генам-мишениям соответствуют ожидаемым и хорошо соответствуют линейной модели ($R^2 > 0,98$, рис. 4). Это позволяет предположить, что, несмотря на неравномерность распределения сигнала при высокой концентрации матрицы, полученные данные достоверно отображают реальную концентрацию мРНК и могут быть использованы для оценки экспрессии *IFN-β*.

Повторяемость ОТ-рвПЦР и ОТ-цПЦР-тестов

Коэффициенты вариации при оценке внутритестовой сходимости определения *SDHA*, *ACTB* и *IFN-β* приведены в таблице 1.

В клетках сибирской ночницы MdbK3-14 детекция мРНК *IFN-β* была более стабильна при ОТ-рвПЦР, чем при ОТ-цПЦР ($CV = 0,2\%$ против $CV = 1,4\%$), хотя оба значения CV укладываются в оптимальный диапазон ($CV \leq 2\%$). Отмечена более высокая чувствительность ОТ-рвПЦР при детекции мРНК *IFN-β* – в разведении 10^{-5} мРНК стабильно детектировалась в ОТ-рвПЦР ($Cq = 39,9$, $CV = 0,3\%$), хотя в ОТ-цПЦР получены воспроизводимо отрицательные результаты (табл. 1). Поскольку и реакционные смеси и подготовка препаратов РНК были идентичны в обоих тестах, очевидно, требуется оптимизация условий эксперимента с учетом особенностей платформы цПЦР.

Стабильность детекции транскриптов гена *SDHA* при ОТ-цПЦР и ОТ-рвПЦР была сопоставимой ($CV = 0,8\%$ и $CV = 0,5\%$ соответственно) и соотносилась

с диапазоном приемлемых значений внутритестовой вариабельности.

Детекция мРНК *ACTB* при ОТ-цПЦР происходила равномерно во всех образцах ($CV = 0,8\%$), мало отклоняясь от среднего количественного значения. В то же время, при ОТ-рвПЦР была выявлена некоторая нестабильность детекции бета-актина ($CV = 3,6\%$). В настоящее время считается, что для получения валидных результатов количественной ПЦР, внутритестовая сходимость результатов должна соответствовать значениям $CV \leq 2\%$ [17]. Превышение допустимых значений коэффициента вариации указывает на более высокую изменчивость данных в исследуемой совокупности, что в случае с *ACTB*, вероятно, обусловлено техническими погрешностями при проведении ОТ-рвПЦР. Это сигнализирует о необходимости оптимизации условий ОТ-рвПЦР для повышения стабильности детекции мРНК *ACTB* на всех этапах эксперимента путем автоматизации большинства ручных процедур, таких как приготовление разведений образца РНК и внесение проб в ПЦР-смесь, что, вероятно, снизит вариабельность получаемых количественных данных.

Анализ согласованности результатов ОТ-рвПЦР и ОТ-цПЦР

Корреляционный анализ по Пирсону показал, что для всех исследованных генов значение Cq в ОТ-рвПЦР имеет очень сильную отрицательную корреляционную связь с концентрацией мРНК в ОТ-цПЦР

ТАБЛИЦА 1
ПОВТОРЯЕМОСТЬ ОТ-рвПЦР И ОТ-цПЦР ПРИ ДЕТЕКЦИИ мРНК ГЕНОВ ACTB, SDHA И IFN-β В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ MdbK3-14

TABLE 1
REPEATABILITY OF RT-qPCR AND RT-dPCR ASSAYS FOR mRNA OF ACTB, SDHA AND IFN-β GENES IN MdbK3-14 CELL LINE

Ген	Разведение РНК	Цифровая ОТ-ПЦР, мРНК-транскрипты, log ₁₀ копий/мкл			ОТ-ПЦР в реальном времени, Сq		
		log ₁₀ копий/мкл	SD	CV, %	в.т.*Сq	SD	CV, %
<i>IFN-β</i>	10^{-2}	2,8	1,5	0,8	30,2	0,1	0,1
	10^{-3}	1,6	0,8	1,2	34,1	0,1	0,1
	10^{-4}	0,5	0	1,5	37,1	0,6	0,3
	10^{-5}	0	0	0	39,9	0,6	0,3
Средняя внутритестовая повторяемость детекции <i>IFN-β</i> , %: 1,4				Средняя внутритестовая повторяемость детекции <i>IFN-β</i> , %: 0,2			
<i>SDHA</i>	10^{-2}	3,5	1,8	0,3	26,7	0,02	0,1
	10^{-3}	2,6	1,5	0,8	30,2	0,05	0,2
	10^{-4}	1,6	0,8	1,3	33,7	0,23	0,7
Средняя внутритестовая повторяемость детекции <i>SDHA</i> , %: 0,8				Средняя внутритестовая повторяемость детекции <i>SDHA</i> , %: 0,5			
<i>ACTB</i>	10^{-2}	3,4	2,4	1	29,9	0,51	1,7
	10^{-3}	2,6	1,1	0,5	32,9	1,11	3,4
	10^{-4}	1,6	0,7	1	36,3	2,03	5,6
Средняя внутритестовая повторяемость детекции <i>ACTB</i> , %: 0,8				Средняя внутритестовая повторяемость детекции <i>ACTB</i> , %: 3,6			

Примечание: * – «в.т. Сq» – средние циклы количественного определения четырех внутритестовых повторов.

(рис. 5). Таким образом, количественные оценки концентрации мРНК, полученные на основе ОТ-рвПЦР и ОТ-цПЦР анализов, хорошо согласуются друг с другом и описываются обратной линейной зависимостью, при которой увеличение концентрации молекул мРНК в ОТ-цПЦР соответствует уменьшению значений Сq.

Оценка фоновой экспрессии *IFN-β* в клеточной линии *MdbK3-14*

Полученные результаты позволяют предположить, что в клеточной линии *MdbK3-14* идет непрерывная фоновая экспрессия бета-интерферона (рис. 6). Можно отметить, что при измерении с помощью ОТ-цПЦР уровень экспрессии оказался примерно в 10 раз ниже, чем экспрессия генов домашнего хозяйства (в среднем $0,13 \pm 0,05$ отн.ед.), тогда как в ОТ-рвПЦР экспрессия *IFN-β* и референтных генов была сопоставима ($0,97 \pm 0,15$ отн.ед.).

Наблюдаемые различия в относительных уровнях экспрессии *IFN-β* можно объяснить двумя фактами. С одной стороны, показатели экспрессии *IFN-β* в ОТ-цПЦР возможно несколько занижены за счет технических проблем. Действительно, наблюдаемая

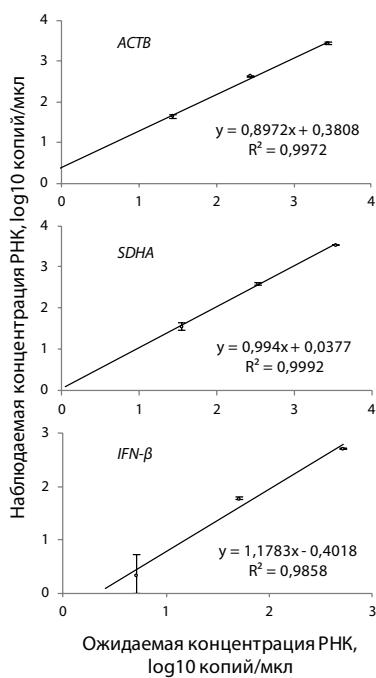


РИС. 4.

Линейность ОТ-цПЦР (R^2) оценивали с помощью линейной регрессии на основе изменения наблюдавшихся концентраций мРНК в сравнении с изменением расчётных ожидаемых концентраций. Концентрации РНК выражали в логарифмической форме (\log_{10}). Планки погрешностей отражают стандартное отклонение по результатам двух повторов ОТ-цПЦР

FIG. 4.

The linearity (R^2) of the RT-dPCR was evaluated using linear regression model of observed changes in mRNA concentrations in comparison to the changes in estimated expected concentrations. RNA concentrations were expressed in \log_{10} . Error bars represent the standard deviation of two RT-dPCR replicates

неравномерность в распределении положительных ячеек на чипе (рис. 3) может существенно влиять на точность измерения мРНК. С другой стороны, высокая вариабельность уровней экспрессии *IFN-β* в ОТ-рвПЦР

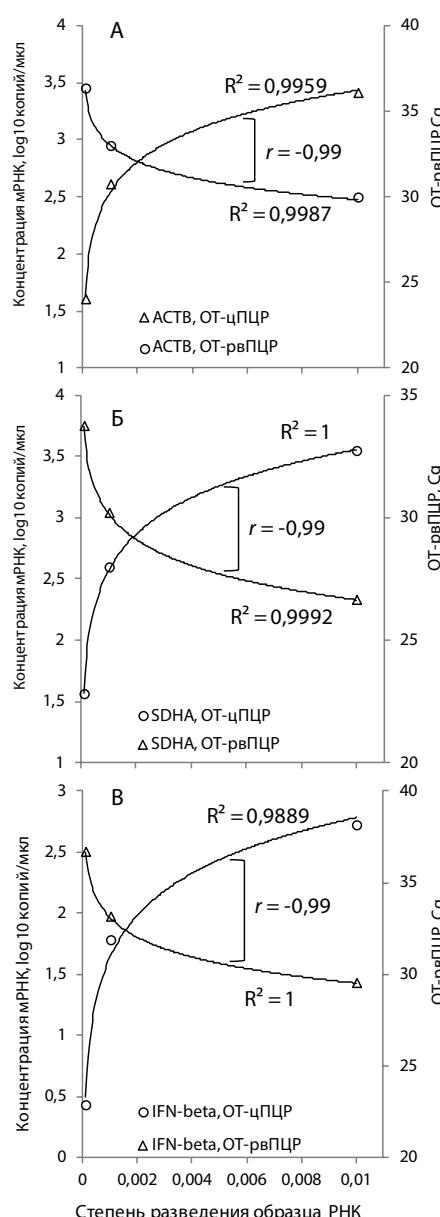


РИС. 5.

Зависимость средних значений Сq и концентрации транскриптов мРНК генов рукокрылых: А – бета-актина (ACTB), Б – субъединицы А сукцинатдегидрогеназного комплекса (SDHA), В – интерферона бета (IFN-β). Сплошной чертой обозначены линии тренда (логарифмическая аппроксимация); R^2 – достоверность аппроксимации; r – коэффициент корреляции Пирсона

FIG. 5.

There are strong negative correlation between mean Cq values and mRNA transcripts targeting bat genes. A –beta-actin (ACTB), B – succinate dehydrogenase subunit A (SDHA), B –interferon beta (IFN-β). Solid lines reflect the logarithmic trend model; R^2 reflects the goodness-of-fit of logarithmic model; r – Pearson’s correlation coefficient between two datasets (brackets)

делает диапазон реальных значений довольно широким – от 0,4 до 1,6 отн. ед. (рис. 6). Комбинируя оба подхода, можно предположить, что реальный фоновый уровень экспрессии *IFN-β* находится в диапазоне от 0,2 до 1.

В целом, фоновый уровень экспрессии *IFN-β* сопоставим или несколько ниже, чем экспрессия белков домашнего хозяйства, в частности бета-актина и субъединицы А сукцинатдегидрогеназного комплекса. Возможно, это свидетельствует о наличии функциональной роли интерферона бета в поддержании жизнеспособности клеток почек *M. sibiricus*, либо о непрерывной активации системы врождённого иммунного ответа в организме сибирской ночницы.

Таким образом, показатели линейности, чувствительности и повторяемости ОТ-рвПЦР и ОТ-цПЦР указывают на то, что для достоверной оценки врожденного иммунного ответа необходимо повысить чувствительность ОТ-цПЦР *IFN-β* и повысить воспроизводимость ОТ-рвПЦР в отношении АСТВ. Количественное определение мРНК *SDHA* проходит корректно в обоих вариантах ОТ-ПЦР и не требует оптимизации.

Ранее было установлено, что результаты, полученные с помощью ОТ-цПЦР, сопоставимы с ОТ-рвПЦР, при этом цПЦР демонстрирует более высокую чувствительность при оценке концентрации РНК [18], детектируя следовые количества матрицы в образце. В указанном исследовании анализ ОТ-цПЦР позволял количественно определить РНК вируса гепатита В (ВГВ, HBV) в образцах сыворотки с концентрацией всего лишь 10^2 копий/мл. Показано также, что ОТ-цПЦР улучшает интерпретацию значений Сq ОТ-ПЦР в диагностике коронавируса SARS-CoV-2, поэтому может применяться как вспомогательный метод для повышения точности и достоверности количественного определения концентрации РНК и более корректной интерпретации результатов ОТ-ПЦР [19]. Полученные нами результаты хорошо согласуются с опубликованными данными, и мы полагаем, что в исследованиях экспрессии генов ОТ-цПЦР является очень ценным инструментом, особенно перспективным при необходимости изучения малых различий в уровнях экспрессии целевых генов. Однако, такие особенности как высокая стоимость расходных материалов (прежде всего, чипов), относительно большие затраты труда и времени при подготовке и проведении цПЦР, необходимость дополнительной оптимизации и валидации ОТ-ПЦР для конкретной технологической платформы цПЦР, затрудняют исследования больших наборов образцов. Следует отметить, что для проведения валидации процедуры ОТ-цПЦР необходимо использовать минимум три синтетических положительных контрольных образца РНК с заведомо известной концентрацией, моделирующих высокую (10000–10000000 копий на реакцию), среднюю (100–10000) и низкую (1–100) нагрузку целевых фрагментов. Результаты ОТ-цПЦР можно будет считать достоверными в том случае, если в каждом из диапазонов наблюдаемые концентрации РНК совпадут с ожидаемыми. Такое осложнение процедуры ПЦР особенно существенно

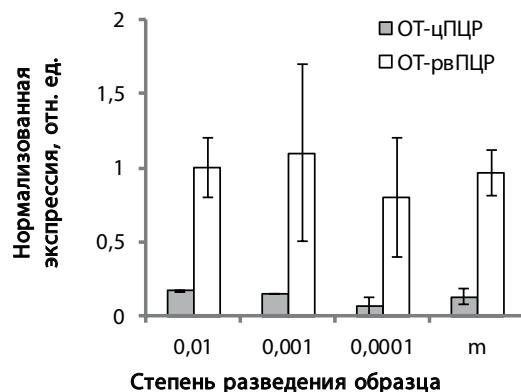


РИС. 6.

Относительная нормализованная экспрессия *IFN-β* в клеточной линии *MdbK3-14*. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение средних значений; *m* – средний уровень экспрессии *IFN-β* в трех разведениях образцов РНК. Значения экспрессии нормализованы относительно референс-генов *ACTB* и *SDHA* и отображены относительно нулевого уровня экспрессии

FIG. 6.

*Relative normalized expression of IFN-β in the MdbK3-14 cell line. Error bars represent the standard deviation of the mean values; *m* – the mean expression level of IFN-β in three dilutions of RNA samples. Expression values are normalized to the reference genes ACTB and SDHA and are shown relative to the zero expression level*

в случае использования нескольких целевых и референтных генов с учетом полноценного набора контрольных тестов в последующих рутинных постановках ОТ-цПЦР. Это подразумевает использование в каждом запуске ОТ-цПЦР отрицательного контрольного образца (без матрицы) для контроля контаминации при очистке образца РНК, подготовке реакционной смеси и загрузке чипа, и одного положительного контрольного образца с известной концентрацией каждой из целевых матриц для подтверждения эффективности реакции. Кроме того, желательно в каждой индивидуальной реакции использовать внутренний контрольный образец РНК с известной концентрацией для оценки реальной эффективности ОТ-ПЦР и наличия ингибиторов в каждом исследуемом образце РНК. В связи с этим, на данном этапе развития технологии, для масштабных скрининговых исследований научного или медицинского назначения более предпочтительными, по нашему мнению, являются рутинные тесты в формате ОТ-рвПЦР, а ОТ-цПЦР целесообразно использовать в качестве вспомогательного подтверждающего метода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования двумя независимыми методами (количественная ОТ-ПЦР и цифровая ОТ-ПЦР) показано, что в клеточной линии почки сибирской ночницы наблюдается не индуцированная фоновая экспрессия бета-интерферона. Уровень экспрессии сопоставим или несколько ниже, чем экспрессия белков

домашнего хозяйства, в частности, бета-актина и субъединицы А сукцинатдегидрогеназного комплекса.

Разработанные наборы праймеров и зондов пригодны для детекции мРНК генов *ACTB*, *SDHA* и *IFN-β* в клетках рукокрылых. Оба использованных в работе подхода – как ОТ-рвПЦР, так и ОТ-цПЦР – продемонстрировали сопоставимую линейность и дали статистически сходные результаты. Проведение ОТ-рвПЦР требует более тщательной оптимизации для снижения технических погрешностей и вариабельности определения концентрации мРНК, однако ОТ-рвПЦР имеет меньшее время выполнения и является более экономичным подходом, чем ОТ-цПЦР.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Центр разработки прогрессивных персонализированных технологий здоровья» ФГБНУ НЦ ПЗСРЧ, Иркутск.

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Ботвинкин А.Д. Вирусы и летучие мыши: междисциплинарные проблемы. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(4): 259-268. [Botvinkin AD. Viruses and bats: interdisciplinary problems. *Voprosy virusologii*. 2021; 66(4): 259-268. (In Russ.)]. doi: 10.36233/0507-4088-79
2. Baker ML, Schountz T, Wang LF. Antiviral immune responses of bats: a review. *Zoonoses Public Health*. 2013; 60(1): 104-16. doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01528.x
3. Liang YZ, Wu LJ, Zhang Q, et al. Cloning, expression, and antiviral activity of interferon β from the Chinese microbat, *Myotis davidii*. *Virol Sin.* 2015; 30(6): 425-32. doi: 10.1007/s12250-015-3668-2
4. Li J, Zhang G, Cheng D, Ren H, et al. Molecular characterization of RIG-I, STAT-1 and IFN-beta in the horseshoe bat. *Gene*. 2015; 561(1): 115-23. doi: 10.1016/j.gene.2015.02.013
5. Höller M, Schoen A, Wulle J, et al. Virus- and Interferon Alpha-Induced Transcriptomes of Cells from the Microbat *Myotis daubentonii*. *iScience*. 2019; 19: 647-661. doi: 10.1016/j.isci.2019.08.016
6. Schountz T, Baker ML, Butler J, Munster V. Immunological Control of Viral Infections in Bats and the Emergence of Viruses Highly Pathogenic to Humans. *Front Immunol*. 2017; 8: 1098. doi: 10.3389/fimmu.2017.01098
7. Zhou P, Tachedjian M, Wynne JW, et al. Contraction of the type I IFN locus and unusual constitutive expression of IFN-α in bats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016; 113(10): 2696-701. doi: 10.1073/pnas.1518240113
8. Ляпунова Н.А., Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А. Оптимизация методики количественной ОТ-ПЦР для оценки концентрации геномной +РНК вируса клещевого энцефалита. *Acta biomedica scientifica*. 2019; 4(5): 116-121. [Liapunova NA, Khasnatinov MA, Danchinova GA. Optimization of a Quantitative Real-Time RT-PCR Technique for Evaluation of Concentration of Genomic +RNA of Tick-Borne Encephalitis Virus. *Acta Biomedica Scientifica*. 2019; 4(5): 116-121. (In Russ.)]. doi: 10.29413/ABS.2019-4.5.18
9. Ляпунова Н.А., Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А. Особенности репродукции вируса клещевого энцефалита в новой перевиваемой линии клеток сибирской ночной Myotis sibiricus (Kastschenko, 1905). *Acta biomedica scientifica*. 2020; 5(6): 271-275. [Liapunova NA, Khasnatinov MA, Danchinova GA. Features of Reproduction of Tick-Borne Encephalitis Virus in a New Cell Line of the Siberian Bat Myotis sibiricus (Kastschenko, 1905). *Acta Biomedica Scientifica*. 2020; 5(6): 271-275. (In Russ.)]. doi: 10.29413/ABS.2020-5.6.36
10. Ляпунова Н.А. Особенности репродукции вируса клещевого энцефалита в перевиваемых линиях клеток диких млекопитающих – резервуарных и случайных хозяев вируса. Автореф. дис. канд. биол. наук. Кольцово: ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»; 2021. [Liapunova NA. Features of reproduction of tick-borne encephalitis virus in transplantable cell lines of wild mammals – reservoir and accidental hosts of the virus. Avtoref. dis. kand. biol. nauk. Kol'tsovo: FBUN GNTS VB «Vektor»; 2021. (In Russ.)].
11. Gu Y, Tang S, Wang Z, et al. A pan-cancer analysis of the prognostic and immunological role of β-actin (ACTB) in human cancers. *Bioengineered*. 2021; 12(1): 6166-6185. doi: 10.1080/21655979.2021.1973220
12. Higuera A, Muñoz M, López MC, et al. Succinate dehydrogenase gene as a marker for studying *Blastocystis* genetic diversity. *Heliyon*. 2020; 6(11): e05387. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e05387
13. Ляпунова Н.А., Хаснатинов М.А., Данчинова Г.А., Соловаров И.С. Разработка ОТ-рвПЦР для оценки экспрессии генов «домашнего хозяйства» *ACTB* и *SDHA* в культурах клеток млекопитающих-хозяев зоонозных инфекций. *Acta Biomedica Scientifica*. 2024; 9(5): 84-95. [Liapunova NA, Khasnatinov MA, Danchinova GA, Sоловаров IS. Development of RT-qPCR assay for assessing the expression of ACTB and SDHA housekeeping genes in the cell cultures of mammalian hosts of zoonotic infections. *Acta Biomedica Scientifica*. 2024; 9(5): 84-95. (In Russ.)]. doi: 10.29413/ABS.2024-9.5.9
14. Taylor SC, Laperriere G, Germain H. Droplet digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 2409. doi: 10.1038/s41598-017-02217-x
15. Walpole RE, Myers RH, Myers SL, et al. *Probability and statistics for engineers and scientists*, 8th ed. Upper Saddle River: Pearson Education. 2007: 791.
16. Rogers-Broadway KR, Karteris E. Amplification efficiency and thermal stability of qPCR instrumentation: Current landscape and future perspectives. *Exp Ther Med*. 2015; 10(4): 1261-1264. doi: 10.3892/etm.2015.2712
17. Hays A, Islam R, Matys K, et al. Best Practices in qPCR and dPCR Validation in Regulated Bioanalytical Laboratories. *AAPS J*. 2022; 24(2): 36. doi: 10.1208/s12248-022-00686-1

18. Limothai U, Chuaypen N, Poovorawan K, et al. Reverse transcriptase droplet digital PCR vs reverse transcriptase quantitative real-time PCR for serum HBV RNA quantification. *J. Med. Virol.* 2020; 92(12): 3365-3372. doi: 10.1002/jmv.25792
19. Whale AS, von der Heide EK, Kohlenberg M, et al. Digital PCR can augment the interpretation of RT-qPCR Cq values for SARS-CoV-2 diagnostics. *Methods.* 2022; 201: 5-14. doi: 10.1016/j.ymeth.2021.08.006

Сведения об авторах

Ляпунова Наталья Андреевна – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций, Институт эпидемиологии и микробиологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»; e-mail: nataly2193@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6039-0854>

Хаснатинов Максим Анатольевич – доктор биологических наук, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории трансмиссивных инфекций, Институт эпидемиологии и микробиологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»; e-mail: khasnatinov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8441-3640>

Данчинова Галина Анатольевна – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций, Институт эпидемиологии и микробиологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»; e-mail: dan-chin@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6705-3970>

Соловаров Иннокентий Сергеевич – кандидат биологических наук, младший научный сотрудник лаборатории трансмиссивных инфекций, Институт эпидемиологии и микробиологии, ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», e-mail: keschass@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9936-5330>

Information about the authors

Natalia A. Liapunova – Cand. Sc. (Biol.), Research Officer at the Laboratory of Arthropod-Borne Infections, Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems; e-mail: nataly2193@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6039-0854>

Maxim A. Khasnatinov – Dr. Sc. (Biol.), Chief Researcher, Head of the Laboratory of Arthropod-Borne Infections, Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems; e-mail: khasnatinov@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8441-3640>

Galina A. Danchinova – Dr. Sc. (Biol.), Chief Researcher at the Laboratory of Arthropod-Borne Infections, Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems; e-mail: dan-chin@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6705-3070>.

Innokentii S. Solovarov – Cand. Sc. (Biol.), Junior Research Officer at the Laboratory of Arthropod-Borne Infections, Institute of Epidemiology and Microbiology, Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems; e-mail: keschass@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9936-5330>