

## СОДЕРЖАНИЕ

## ОБЗОРЫ

**Сергеев О.В., Бошняк Р.Е., Баринский И.Ф.**

Высокопродуктивное секвенирование в диагностике и профилактике инфекции простого герпеса (*Herpesviridae, Alphaherpesvirinae, Simplexvirus, Human alphaherpesvirus 1*) ..... 126

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Алаторцева Г.И., Доценко В.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Кабаргина В.Ю., Амиантова И.И., Жукина М.В., Жаворонок С.В., Нурматов З.Ш., Нурматов А.З., Зверев В.В.**

Тест-система для выявления IgG-антител к вирусу гепатита E (*Hepeviridae, Orthohepevirus, Orthohepevirus A*) методом линейного иммуноанализа ..... 132

**Никишов О.Н., Кузин А.А., Зобов А.Е., Лаврентьева И.Н., Антипова А.Ю., Останкова Ю.В., Хамитова И.В., Никишов С.Н.**

Результаты исследования распространённости и активности циркуляции парвовируса B19 (*Parvoviridae, Parvovirinae, Erythroparvovirus, Primate erythroparvovirus 1*) среди социально значимых категорий населения ..... 143

**Фалынскова И.Н., Егоров А.Ю., Поддубиков А.В., Вартанова Н.О., Карташова Н.П., Глубокова Е.А., Мхитаров В.А., Джалилова Д.Ш., Макарова О.В., Ленева И.А.**

Эффект вакцинации вирусоподобными частицами, экспрессирующими гемагглютинин, на развитие постгриппозной бактериальной пневмонии у мышей: патоморфологические, вирусологические, микробиологические и клинические данные. .... 150

**Марченко В.А., Барашкова С.В., Зелинская И.А., Торопова Я.Г., Сорокин Е.В., Жилинская И.Н.**

Моделирование гриппозной инфекции у половозрелых крыс стока Wistar ..... 159

## ДИСКУССИЯ

**Гайсёнок О.В.**

Применение ингибиторов вирусных РНК-полимераз в сочетании с ингибитором фузии в лечении пациентов с COVID-19: гипотеза ..... 167

## НЕКРОЛОГ

Памяти Виталия Александровича Сергеева (01.05.1927–14.06.2020) ..... 176

## CONTENTS

## REVIEWS

**Sergeyev O.V., Bosh'ian R.E., Barinsky I.F.**High-throughput sequencing in diagnostics and prevention of herpes simplex virus infection (*Herpesviridae, Alphaherpesvirinae, Simplexvirus, Human alphaherpesvirus 1*) ..... 126

## ORIGINAL RESEARCH

**Alatortseva G.I., Dotsenko V.V., Nesterenko L.N., Luhverchik L.N., Kabargina V.Yu., Amiantova I.I., Zhukina M.V., Zhavoronok S.V., Nurmatov Z.S., Nurmatov A.Z., Zverev V.V.**Line immunoassay for detection of IgG antibodies for hepatitis virus E (*Hepeviridae, Orthohepevirus, Orthohepevirus A*) ..... 132**Nikishov O.N., Kuzin A.A., Zobov A.E., Lavrentieva I.N., Antipova A.Yu., Ostankova Yu.V., Khamitova I.V., Nikishov S.N.**Results of a study of parvovirus B19 (*Parvoviridae, Parvovirinae, Erythroparvovirus, Primate erythroparvovirus 1*) prevalence and circulation activity in socially significant categories of the population ..... 143**Falynskova I.N., Egorov A.Yu., Poddubikov A.V., Vartanova N. O., Kartashova N.P., Glubokova E.A., Mkhitarov V.A., Dzhalilova D.S., Makarova O.V., Leneva I.A.**

Vaccination with virus-like particles containing hemagglutinin protects the lungs of mice with postinfluenza bacterial pneumonia: virological, microbiological and clinical data ..... 150

**Marchenko V.A., Barashkova S.V., Zelinskaya I.A., Toropova Ya. G., Sorokin E.V., Zhilinskaya I.N.**

Modeling influenza virus infection in mature Wistar rats ..... 159

## DISCUSSION

**Gaisenk O.V.**

The use of viral RNA polymerase inhibitors in combination with a fusion inhibitor in the treatment of patients with COVID-19: hypothesis ..... 167

## OBITUARY

In memory of Vitaliy A. Sergeev (01.05.1927–14.06.2020) ..... 176

## ОБЗОРЫ



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

**Высокопродуктивное секвенирование в диагностике и профилактике инфекции простого герпеса (*Herpesviridae*, *Alphaherpesvirinae*, *Simplexvirus*, *Human alphaherpesvirus 1*)**Сергеев О.В.<sup>1</sup>, Бошьян Р.Е.<sup>1</sup>, Баринский И.Ф.<sup>2</sup><sup>1</sup> ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва, Россия;<sup>2</sup> ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия

Вирусы простого герпеса (ВПГ) 1-го (ВПГ-1) и 2-го (ВПГ-2) типа относятся к числу наиболее распространённых в человеческой популяции. Клинические проявления простого герпеса широко варьируют, что обуславливает необходимость разработки надёжных молекулярных методов для своевременной диагностики герпесвирусной инфекции, а также для обнаружения мутаций в генах, отвечающих за лекарственную устойчивость. Применение ПЦР часто неспособно идентифицировать изоляты ВПГ с заменами нуклеотидов в участке связывания праймеров. Полногеномное секвенирование по Сэнгеру выявляет мутации в основном на консенсусном уровне, они накапливаются уже на продвинутой стадии вирусной инфекции. Высокопродуктивное секвенирование (секвенирование следующего поколения) имеет явные преимущества как в ранней диагностике герпесвирусной инфекции, так и в идентификации вариантов ВПГ.

**Ключевые слова:** вирус простого герпеса; молекулярная диагностика; геном; варибельность; высокопродуктивное секвенирование; HTS; секвенирование следующего поколения; полногеномное секвенирование; ПЦР; метагеномный анализ.

**Для цитирования:** Сергеев О.В., Бошьян Р.Е., Баринский И.Ф. Высокопродуктивное секвенирование в диагностике и профилактике инфекции простого герпеса (*Herpesviridae*, *Alphaherpesvirinae*, *Simplexvirus*, *Human alphaherpesvirus 1*). *Вопросы вирусологии*. 2020; 65(3): 126-131. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-126-131>

**Для корреспонденции:** Сергеев Олег Витальевич, д-р биол. наук, проф. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Москва. E-mail: [osergeyev123@gmail.com](mailto:osergeyev123@gmail.com)

**Участие авторов:** все авторы в равной мере участвовали в выработке концепции обзорной статьи и её написании. **Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

Поступила 02.03.2020

Принята в печать 18.03.2020

**High-throughput sequencing in diagnostics and prevention of herpes simplex virus infection (*Herpesviridae*, *Alphaherpesvirinae*, *Simplexvirus*, *Human alphaherpesvirus 1*)**Oleg V. Sergeyev<sup>1</sup>, Roman E. Bosh'ian<sup>1</sup>, Igor F. Barinsky<sup>2</sup><sup>1</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119991, Russia;<sup>2</sup> National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russia

Herpes simplex viruses types 1 (HSV-1) and 2 (HSV-2) are among the most common viruses in the human population. The clinical manifestations of HSV infection vary widely, which necessitates reliable molecular methods for the timely diagnosis of herpes virus infection, as well as for detection of mutations in the genes responsible for drug resistance. PCR is often unable to detect HSV isolates with nucleotide substitutions at the primer binding site. Sanger sequencing of the whole genome reveals mutations mainly at the consensus level, which accumulate at advanced stages of viral infection. High-throughput sequencing (HTS, next generation sequencing) offers an obvious advantage both in early diagnosis of herpes virus infection and identification of HSV variants.

**Keywords:** herpes simplex virus; molecular diagnostics; genome; variability; high-throughput sequencing; HTS; next generation sequencing; whole genome sequencing; PCR; metagenomics.

**For citation:** Sergeyev O.V., Bosh'ian R.E., Barinsky I.F. High-throughput sequencing in diagnostics and prevention of herpes simplex virus infection (*Herpesviridae, Alphaherpesvirinae, Simplexvirus, Human alpha-herpesvirus 1*). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2020; 65(3): 126-131. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-126-131>

**For correspondence:** Oleg V. Sergeyev, Doct. Sci. (Biol.), Professor at the Department of microbiology, virology and immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, 119991, Russia. E-mail: [osergeyev123@gmail.com](mailto:osergeyev123@gmail.com)

**Information about the authors:**

Sergeyev O.V., <https://orcid.org/0000-0003-3407-2224>

Bosh'ian R.E., <https://orcid.org/0000-0003-4789-4964>

Barinsky I.F., <https://orcid.org/0000-0002-9909-3598>

**Contribution:** all the authors have equally contributed to the development of the review article concept and to the writing of the article.

**Acknowledgment.** The review article presented has had no financial support.

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

Received 02 March 2020

Accepted 18 March 2020

По данным ВОЗ на 2017 г., из 6 млрд населения земли 3 млрд 700 млн человек были инфицированы вирусом простого герпеса (ВПГ). Статистические исследования, проводимые ВОЗ и опубликованные в 2016 г., показали, что в структуре инфекций, передаваемых половым путём, генитальный герпес продолжает занимать одно из ведущих мест. В 10–20% случаев генитальный герпес имеет рецидивирующее течение, что является серьёзной медико-социальной проблемой здравоохранения. Рецидивы генитального герпеса наблюдаются в течение последующего года у 90% больных, заражённых вирусом простого герпеса 2-го типа (ВПГ-2), и у 60% инфицированных вирусом простого герпеса 1-го типа (ВПГ-1). В России число только госпитализированных с диагнозом «герпетическая инфекция» ежегодно превышает 2,5 млн человек. Герпесвирусные инфекции роговой оболочки глаза отмечены у 900 тыс. человек. Герпесвирусная этиология также прослеживается у 10% больных энцефалитом [1, 2].

### Ранняя диагностика вируса простого герпеса

Семейство *Herpesviridae* включает свыше 200 вирусов, поражающих разных животных. Общей характеристикой герпесвирусов является их способность вызывать пожизненную медленно текущую или латентную инфекцию в организме хозяина. При латентной инфекции зрелые вирионы не формируются, а продуктами транскрипции являются несколько РНК продуктов, ассоциированных с латенцией [3].

ВПГ-1 и -2 входят в подсемейство *Alphaherpesvirinae*. Для них характерны быстрый инфекционный цикл в культуре клеток и латентная инфекция в нейронах, прежде всего в сенсорных ганглиях [1, 2]. Этот признак является критическим в стратегии выживания вируса и осложняет диагностику ВПГ, так как латентно инфицированные клетки служат резервуаром для периодической реактивации и распространения вируса.

Инфекция простого герпеса начинается на поверхности эпителия или слизистой. Она может быть симптоматической или асимптоматической в зависимости от иммунного статуса хозяина и других факторов.

Первичная инфекция приводит к проникновению вируса в сенсорные или симпатические нейроны, которые иннервируют поверхность эпителия. В периферийной нервной системе устанавливается латентное состояние. Точный механизм перехода вируса из эпителия в нервные клетки неясен. После реактивации в нервной ткани вирус может перемещаться по нервному тракту обратно в эпителиальные клетки, вызывая повреждение тканей и инфицирование новых хозяев [4].

Высокопродуктивное секвенирование (англ. high-throughput sequencing, HTS), или секвенирование следующего поколения (англ. next generation sequencing), произвело революцию в исследовании и диагностике патогенов. Сейчас возможна полногеномная характеристика многих патогенов [5].

HTS также положило начало новому направлению, мегагеномике. Этот подход позволяет объективно охарактеризовать все микроорганизмы в данной экосистеме или в клиническом образце без каких-либо предварительных сведений [6–8]. Рутинное использование HTS в клинической диагностике, в том числе инфекционных болезней, стало возможным в связи со снижением стоимости оборудования.

Более того, существует реальная возможность одновременного секвенирования геномов множества изолятов для каждого вируса [9–13]. Это позволяет выявить генетические вариации в пределах одного вида вируса. Применение HTS даёт возможность осуществлять раннюю диагностику инфекции, идентифицировать мутации, приводящие к лекарственной устойчивости. С помощью HTS патогены можно исследовать как генетически гетерогенные популяции, не клоны. Также данный метод выявляет генетические вариации, возникающие с низкой частотой, включая большие делеции, инсерции, инверсии и транслокации нуклеотидных последовательностей [14, 15].

В частности, лекарственная устойчивость ВПГ, как правило, обусловлена мутациями в вирусных генах тимидинкиназы (ТК) и полимеразы [16]. Продолжительное применение ацикловира и его производных может привести к селекции вариантов, устойчивых к препарату, особенно у индивидов с низкой иммуно-

реактивностью. Раннее выявление субконсенсусных мутаций, способствующих развитию лекарственной устойчивости, может позволить в будущем корректно разработать противовирусную терапию. Например, показано преимущество HTS по сравнению с секвенированием по Сэнгеру для выявления устойчивых к ацикловиру мутантов среди изолятов ВПГ-1, выделенных от пациентов после пересадки гемопоэтических стволовых клеток [17].

Мутации в гене ТК на субконсенсусном уровне можно выявить с помощью HTS примерно на 1 нед раньше, чем они достигнут консенсусного уровня (когда их можно выявить методом Сэнгера). Известно, что вирусный генотип, обладающий лекарственной устойчивостью и присутствующий в популяции в малом количестве, может быстро стать преобладающим при подходящих факторах селекции. В недавнем проведённом исследовании метагеномный анализ образцов сыворотки крови от пациентов с тяжёлой печёночной недостаточностью позволил идентифицировать лекарственно-устойчивые варианты ВПГ-1 наряду с вирусами гепатита А и В [18]. HTS также успешно применяются для изучения лекарственной устойчивости цитомегаловируса и вируса варицелла-зостер [19, 20].

Помимо точечных мутаций, гомологичная рекомбинация между геномами разных штаммов ВПГ является сильным фактором эволюции. Рекомбинация между аттенуированными изолятами ВПГ может приводить к появлению высоковирулентных вариантов как в натуральных, так и в лабораторных условиях [21–26]. HTS предоставляет лучшие возможности для изучения рекомбинации ВПГ и других вирусов данного семейства [27].

### Обнаружение генов, связанных с вирулентностью

С появлением HTS сопоставление фенотипов и генотипов вирусных вариантов претерпело значительные изменения. Сформировалось направление «генетика вперёд» (forward genetics), имеющее целью поиск геномов, определяющих выраженные фенотипические вариации [24, 28, 29].

Ценность описываемых методов диагностики определяется и тем фактом, что клинические проявления простого герпеса у пациентов различаются и, следовательно, их недостаточно для корректного диагноза.

На животных моделях показана корреляция генетической вариаций между штаммами ВПГ-1 и вызываемой ими патологией, включая реактивацию из латентного состояния и тяжесть изъязвлений [15, 24, 26]. Корреляция между генетическими вариациями изолятов ВПГ и различиями в тяжести заболевания давно проявлялась в опытах на лабораторных животных с использованием культуральных вариантов вируса. Анализ полных последовательностей клинических изолятов ВПГ-1 показал, что 10 из 74 генов коррелировали с тяжестью болезни глаз у мышей [24]. Однако о том, как изменчивость вируса коррелирует с характером болезни при натуральной ВПГ-инфекции человека, известно мало. Для выявления клинически

значимых маркеров вирулентности в геноме ВПГ необходимы дополнительные исследования генома изолятов вируса, выделенных от пациентов с той или иной формой патологии [30].

Наряду с вирусной генетикой, генетика организма-хозяина не менее важна для определения восприимчивости к заболеванию и его клинического проявления. В настоящее время высокопродуктивное секвенирование в комбинации с полногеномным поиском ассоциаций (HTS/GWAS) часто используют для выявления генетических факторов человека, коррелирующих с различными болезнями, включая ВПГ-инфекцию. С одной стороны, обнаружены вариации в гене *c21orf91* (CSSG1) хромосомы 21, коррелирующие с частотой простудных заболеваний [28]. С другой стороны, полногеномный поиск ассоциаций для идентификации генетических факторов, коррелирующих с интенсивностью выделения инфекционного ВПГ-2, не дал надёжных результатов [31]. В связи со сложным фенотипом ВПГ-инфекции установление корреляции между характером болезни и генотипом организма-хозяина затруднено. Кроме того, результаты полногеномного поиска ассоциаций зависят от других факторов, таких как число пациентов, участвующих в исследовании, и их аллельные вариации. Поэтому отсутствие корреляции при использовании одного фенотипического фактора не уменьшает значение этого метода в изучении патогенеза ВПГ.

### Разработка терапевтических и диагностических средств с применением HTS

В настоящее время доказано, что ВПГ-1 и -2 являются этиологическими агентами генитального герпеса [1, 2]. Генитальный герпес представляет существенный риск для новорождённых, и в течение десятилетий учёные пытаются разработать профилактическую вакцину для предотвращения симптоматического и асимптоматического генитального герпеса. Все существующие на сегодняшний день вакцины и кандидаты в вакцины малоэффективны [32]. Одна из причин их низкой эффективности – генетическая гетерогенность циркулирующих штаммов ВПГ. Так, недавние исследования генома ВПГ-1 показали, что независимые изоляты вируса различаются по нуклеотидной последовательности на 2–4% генома [9], что может составлять тысячи нуклеотидных вариантов. Также показано, что независимые изоляты ВПГ-1 генетически более вариабельны, чем изоляты ВПГ-2 [33]. Знание вариаций генома ВПГ в больших выборках изолятов из различных географических регионов должно способствовать оптимизации вакцинных препаратов в мире. Недавнее исследование штаммов ВПГ-2, циркулирующих в Северной Америке, Южной Америке и Африке, основанное на полноразмерных геномах, выявило низкую частоту встречаемости двух и более штаммов этого вируса в одном организме [34]. Эти данные предполагают, что вакцинальный иммунный ответ может быть протективным в отношении более чем одного циркулирующего штамма ВПГ-2.

Исследования полногеномного генома изолятов ВПГ не менее важны при разработке диагностических методов для клинических лабораторий. В настоящее время большинство клинических лабораторий используют ПЦР для обнаружения генома ВПГ. Однако замена нуклеотидов в участке связывания праймера или зонда приводит к неспособности этого высокочувствительного метода выявить конкретный вариант (изолят) ВПГ [35]. Набор полногеномных геномов, полученный методом HTS, поможет идентифицировать более консервативные регионы в геноме для создания праймеров, которые позволят повысить эффективность (чувствительность) ПЦР тест-систем.

### Использование HTS для понимания передачи вируса простого герпеса

ВПГ-1 и -2 – наиболее широко распространённые представители семейства *Herpesviridae* [36]. Инфицирование происходит при их выделении из слизистых рта или гениталий вирусоносителя (донора). Изъятия на эпителиальных поверхностях служат источником вируса в больших концентрациях, однако инфекционные вирионы могут выделяться и при отсутствии симптомов инфекции. Высокая контагиозность ВПГ затрудняет отслеживание передачи и распространения вируса. Клинически наиболее тяжёлой является передача ВПГ новорождённым и ВИЧ-инфицированным. Так, в США на 3200 родов приходится примерно один случай инфицирования ВПГ [3], поэтому неонатальный герпес является значимой причиной заболеваемости и смертности новорождённых. Передача вируса происходит перинатально (во время родов) или постнатально (при контакте с медицинским персоналом или членами семьи). Понимание деталей различных путей передачи вируса и генетических особенностей, лежащих в её основе, определяет направление клинического лечения и разработки стратегии здравоохранения. По традиции доказательство передачи ВПГ базируется на данных метода полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (RFLP) или выборочного секвенирования по Сэнгеру [37]. Однако эти методы недостаточно чувствительные, так как не выявляют однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) и малые инсерции/делеции. Развитие HTS обеспечивает исследователей мощным инструментом для полномасштабного (всестороннего) изучения генетической вариативности вирусной популяции, которая переносится от одного хозяина к другому [15].

При передаче вируса из всей популяции организма донора реципиенту передаётся лимитированное число вирионов. Для ряда РНК-вирусов экспериментально показано, что от донора реципиенту передаётся генетически относительно гомогенная популяция вируса, которая в новом организме даёт генетическое разнообразие *de novo* [38]. Таким образом, гетерогенность вируса между хозяевами увеличивается. О генетическом разнообразии ВПГ при передаче от человека к человеку известно очень мало. Для цитомегаловируса человека доказано, что от матери плоду передаются десятки и даже сотни вирусных частиц

[10]. Поэтому похоже, что ДНК-вирусы сохраняют генетическую гетерогенность при передаче другому организму. Однако параллели с другими ДНК-вирусами следует проводить с осторожностью.

### Практические замечания по высокопродуктивному секвенированию вируса простого герпеса

Содержание G+C в уникальных регионах генома ВПГ составляет около 68% [4]. В повторяющихся регионах генома эта цифра может достигать порядка 90%. Сборка этих последовательностей после HTS представляется проблематичной, поскольку многие платформы секвенирования делают большое число ошибок в данных участках ДНК [39].

HTS генома ВПГ можно проводить в зависимости от конкретной поставленной задачи клинического или научного исследования. Можно провести полногеномное секвенирование определённых регионов, соответствующих ампликонам. Полногеномное секвенирование позволяет конструировать полный геном вируса, что предпочтительно для идентификации переменных регионов и филогенетического анализа данного изолята вируса относительно полных последовательностей геномов различных штаммов [9, 15]. В то же время полногеномное секвенирование требует большего числа прочтений последовательностей от каждого штамма вируса для реконструкции полного генома, что лимитирует число изолятов, которые можно секвенировать за один заход.

Для секвенирования отдельных ампликонов, напротив, используют определённые регионы генома. Например, можно подобрать праймеры для амплификации гена полимеразы (UL30) и гена ТК (UL23) из большего числа штаммов ВПГ за один заход. Также секвенирование ампликонов информативно при типировании большого числа изолятов. Если интересные регионы в геноме ВПГ неизвестны, можно применять полногеномное секвенирование для идентификации наиболее переменных локусов, а затем эту информацию использовать для разработки тестов адресного генотипирования [34].

Следует учитывать, что ранние версии HTS для ВПГ были отработаны на лабораторных штаммах, адаптированных к культуре клеток и прошедших много серийных пассажей. Применение HTS в клинических исследованиях вызвало развитие подходов, позволяющих проводить HTS прямо из клинических образцов, без выделения вируса в культуре клеток. Клинические образцы ВПГ часто собирают с помощью тампонов. Такие образцы легко собирать и хранить в течение долгого периода, но в них мало вирусных геномов и они часто контаминированы ДНК хозяина. Данный факт привёл к развитию методов обогащения, когда амплификация вирусной ДНК проводится прямо из образца, одновременно уменьшая количество ДНК хозяина [30, 40]. Этот подход основан на использовании коротких ДНК-зондов (олигонуклеотидов), комплементарных геному ВПГ. Зонд соединён с меткой, которая обеспечивает иммобилизацию в суспензии с последующим отделением вирусной нуклеиновой

кислоты, связанной этими олигонуклеотидными зондами. Выделенная вирусная ДНК проходит несколько циклов ПЦР, очистку и создание сиквенс-библиотеки. Высокая надёжность данного метода была показана при реконструкции генома ВПГ из клинических образцов [30].

В отличие от амплификации с использованием олигонуклеотидов, которая нацелена на нуклеиновую кислоту интересующего патогена, существуют коммерческие наборы, позволяющие амплифицировать все типы ДНК в данном образце. Этот метод называется полногеномной амплификацией (WGA). Повышая количество ДНК как вируса, так и хозяина в данном образце, WGA повышает вероятность обнаружения и секвенирования ДНК патогена. Так, в метагеномном исследовании цереброспинальной жидкости, взятой от пациентов с подозрением на вирусный менингоэнцефалит, с помощью WGA были успешно выявлены ВПГ-1 и -2 как этиологические агенты [41]. В данном исследовании была использована коммерческая система WGA4 производства компании Sigma-Aldrich (США).

### Заключение

ВПГ-1 и -2 – широко распространены и чрезвычайно опасны для здоровья человека. Своевременная и точная диагностика простого герпеса актуальна как для взрослых, так и для детей. В настоящее время методы диагностики ВПГ значительно усовершенствованы. Если раньше основным подходом было выделение вируса в культуре клеток с последующим выявлением вирусного антигена, то теперь методы диагностики основаны на ПЦР. Несмотря на прогресс диагностика ВПГ-инфекции проблематична, когда этиология заболевания неясна. Генетическая основа вирулентности ВПГ остаётся малоизвестной. Также почти неизвестна эволюция ВПГ на фоне интенсивной противовирусной терапии. Глубокое понимание отмеченных аспектов необходимо для эффективного клинического контроля ВПГ-инфекции.

HTS признано высокоэффективным подходом в решении трудных задач. Пожалуй, наиболее важным в применении HTS при ВПГ-инфекции является понимание возникающей лекарственной устойчивости. Этот метод позволил клиницистам не только документировать мутации, приводящие к лекарственной устойчивости, но также оценить скорость и частоту их возникновения в том или ином организме [17]. Данным методом ВПГ идентифицирован как этиологический агент при энцефалите и некоторых атипичных клинических проявлениях, например, болезни печени [18]. Ещё HTS использовали для установления передачи ВПГ как на индивидуальном, так и на популяционном уровне [15, 34]. Эти исследования позволили по-новому взглянуть на передачу генотипа вируса между индивидами и на эпидемиологию в целом. Оценка генетических вариаций в ходе секвенирования изолятов ВПГ выявила потенциальные факторы, обуславливающие неэффективность ранних анти-ВПГ вакцин и помогла сформулировать

стратегии их разработки [9, 34]. Сравнение геномов ВПГ также способствует идентификации участков генома, которые могут определять вирулентность [24, 30]. В то же время HTS геномов пациентов с тяжёлой формой ВПГ-инфекции позволяет выявлять гены и их участки в геноме, которые могут обуславливать тяжёлое течение болезни у людей [28].

Таким образом, вклад HTS в лучшее понимание патогенеза ВПГ и в усовершенствование методов диагностики трудно переоценить. Поэтому следует понимать практические рекомендации по секвенированию и сборке генома ВПГ. Частота GC-оснований в геноме ВПГ мешает безошибочному секвенированию и сборке генома с использованием стандартных сиквенс-платформ. Следовательно, необходим биоинформатический подход для корректной интерпретации данных секвенирования и конструирования полноразмерных геномов [40, 42–46]. Дороговизна метода HTS является главным препятствием для его повседневного использования в клинических лабораториях. Для таких лабораторий рентабельным может быть мультиплексное секвенирование образцов, обогащённых ДНК ВПГ с использованием олигонуклеотидов.

### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. WHO. Fact sheet. Herpes simplex virus. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>
2. Looker M.J., Magaret A.S., Turner K.M.E., Vickerman P., Gottlieb S.L., Newman L.M. Global estimates of prevalent and incident herpes simplex virus type 2 infections in 2012. *PLoS One*. 2015; 10(1): 114989. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0114989>
3. Colby L., Wald A., Celum C.L., Quinn T.C. The effects of herpes simplex virus-2 on HIV-1 acquisition and transmission: a review of two overlapping epidemics. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2004; 35(5): 435-45. DOI: <http://doi.org/10.1097/00126334-200404150-00001>
4. Knipe D.M., Howley P. *Fields Virology*. New York: Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
5. Behjati S., Tarpey P.S. What is next generation sequencing? *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* 2013; 98(6): 236-8. DOI: <http://doi.org/10.1136/archdischild-2013-304340>
6. Handelsman J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2004; 68(4): 669-85. DOI: <http://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.669-685.2004>
7. Deurenberg R.H., Bathoorn E., Chlebowicz M.A., Couto N., Ferdous M., Garcia-Cobos S., et al. Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention. *J. Biotechnol.* 2017; 243: 16-24. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.12.022>
8. Buchman T.G., Simpson T., Nosal C., Roizman B., Nahmias A.J. The structure of herpes simplex virus DNA and its application to molecular epidemiology. *Ann. NY Acad. Sci.* 1980; 354: 279-90. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1980.tb27972.x>
9. Szpara M.L., Gatherer D., Ochoa A., Greenbaum B., Dolan A., Bowden R.J., et al. Evolution and diversity in human herpes simplex virus genomes. *J. Virol.* 2014; 88(2): 1209-27. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01987-13>
10. Renzette N., Gibson L., Bhattacharjee B., Fisher D., Schleiss M.R., Jensen J.D., et al. Rapid intrahost evolution of human cytomegalovirus is shaped by demography and positive selection. *PLoS Genet.* 2013; 9(9): e1003735. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003735>
11. Sanjuán R., Domingo-Calap P. Mechanisms of viral mutation. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016; 73(23): 4433-48. DOI: <http://doi.org/10.1007/s00118-016-2299-6>
12. Drake J.W., Hwang C.B.C. On the mutation rate of herpes simplex virus type I. *Genetics.* 2005; 170(2): 969-70. DOI: <http://doi.org/10.1534/genetics.104.040410>
13. Szpara M.L., Tafuri Y.R., Parsons L., Shamim S.R., Verstrepen K.J., Legendre M., et al. A wide extent of inter-strain diversity in viru-

- lent and vaccine strains of alphaherpesviruses. *PLoS Pathog.* 2011; 7(10): 1-23. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002282>
14. Pandey U., Bell A.S., Renner D.W., Kennedy D.A., Shreve J.T., Cairns C.L., et al. DNA from dust: comparative genomics of large DNA viruses in field surveillance samples. *mSphere.* 2016; 1(5): e00132-16. DOI: <http://doi.org/10.1128/mSphere.00132-16>
  15. Pandey U., Renner D.W., Thompson R.L., Szpara M.L., Sawtell N.M. Inferred father-to-son transmission of herpes simplex virus results in near-perfect preservation of viral genome identity and in vivo phenotypes. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 13666. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41598-017-13936-6>
  16. Morfin F., Thouvenot D. Herpes simplex virus resistance to antiviral drugs. *J. Clin. Virol.* 2003; 26(1): 29-37. DOI: [http://doi.org/10.1016/s1386-6532\(02\)00263-9](http://doi.org/10.1016/s1386-6532(02)00263-9)
  17. Fujii H., Kakiuchi S., Tsuji M., Nishimura H., Yoshikawa T., Yamada S., et al. Application of next-generation sequencing to detect acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 variants at low frequency in thymidine kinase gene of the isolates recovered from patients with hematopoietic stem cell transplantation. *J. Virol. Methods.* 2018; 251: 123-8. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.10.019>
  18. Somasekar S., Lee D., Rule J., Naccache S.N., Stone M., Busch M.P., et al. Viral surveillance in serum samples from patients with acute liver failure by metagenomic next-generation sequencing. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 65(9): 1477-85. DOI: <http://doi.org/10.1093/cid/cix596>
  19. Mercier-Darty M., Boutolleau D., Lepeule R., Rodriguez C., Burrel S. Utility of ultra-deep sequencing for detection of varicella-zoster virus antiviral resistance mutations. *Antiviral Res.* 2018; 151: 20-3. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.01.008>
  20. Houldcroft C.J., Bryant J.M., Depledge D.P., Margetts B.K., Simmonds J., Nicolaou S., et al. Detection of low frequency multi-drug resistance and novel putative maribavir resistance in immunocompromised pediatric patients with cytomegalovirus. *Front. Microbiol.* 2016; 7: 1317. DOI: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.010317>
  21. Bowden R., Sakaoka H., Donnelly P., Ward R. High recombination rate in herpes simplex virus type 1 natural populations suggests significant co-infection. *Infect. Genet. Evol.* 2004; 4(2): 115-23. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.meegid.2004.01.009>
  22. Lee S.W., Markham P.F., Coppo M.J., Legione A.R., Markham J.F., Noormohammadi A.H., et al. Attenuated vaccines can recombine to form virulent field viruses. *Science.* 2012; 37(6091): 188. DOI: <http://doi.org/10.1126/science.1217134>
  23. Lee K., Kolb A.W., Sverchkov Y., Cuellar J.A., Craven M., Brandt C.R. Recombination analysis of herpes simplex virus 1 reveals a bias toward GC content and the inverted repeat regions. *J. Virol.* 2015; 89(14): 7214-23. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.00880-15>
  24. Kolb A.W., Lee K., Larsen I., Craven M., Brandt C.R. Quantitative trait locus based virulence determinant mapping of the HSV-1 genome in murine ocular infection: genes involved in viral regulatory and innate immune networks contribute to virulence. *PLoS Pathog.* 2016; 12(3): e1005499. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005499>
  25. Koelle D.M., Norberg P., Fitzgibbon M.P., Russell R.M., Greninger A.L., Huang M.L., et al. Worldwide circulation of HSV-2 x HSV-1 recombinant strains. *Sci. Rep.* 2017; 7: 44084. DOI: <http://doi.org/10.1038/srep44084>
  26. Javier R.T., Sedarati F., Stevens J.G. Two avirulent herpes simplex viruses generate lethal recombinants in vivo. *Science.* 1986; 234(4777): 746-8. DOI: <http://doi.org/10.1126/science.3022376>
  27. Lassalle F., Depledge D.P., Reeves M.B., Brown A.C., Christiansen M.T., Tutill H.J., et al. Islands of linkage in an ocean of pervasive recombination reveals two-speed evolution of human cytomegalovirus genomes. *Virus Evol.* 2016; 2(1): vew017. DOI: <http://doi.org/10.1093/ve/vew017>
  28. Kriesel J.D., Bhatia A., Thomas A. Cold sore susceptibility gene-1 genomes affect the expression of herpes labialis in unrelated human subjects. *Hum. Genome Var.* 2014; 1: 14024. DOI: <http://doi.org/10.1038/hgv.2014.24>
  29. Thompson R.L., Williams R.W., Kotb M., Sawtell N.M. A forward phenotypically driven unbiased genetic analysis of host genes that moderate herpes simplex virus virulence and stromal keratitis in mice. *PLoS One.* 2014; 9(3): e92342. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0092342>
  30. Shipley M.M., Renner D.W., Ott M., Bloom D.C., Koelle D.M., Johnston C., et al. Genome-wide surveillance of genital herpes simplex virus type 1 from multiple anatomic over time. *J. Infect. Dis.* 2018; 218(4): 595-605. DOI: <http://doi.org/10.1093/infdis/jiy216>
  31. Kleinstein S.E., Shea P.R., Allen A.S., Koelle D.M., Wald A., Goldstein D.B. Genome-wide association study (GWAS) of human host factors influencing viral severity of herpes simplex virus type 2 (HSV-2). *Genes Immun.* 2018; 20(2): 112-20. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41435-018-0013-4>
  32. Johnston C., Koelle D.M., Wald A. Current status and prospects for development of an HSV vaccine. *Vaccine.* 2014; 32(14): 1553-60. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.08.066>
  33. Newman R.M., Lamers S.L., Weiner B., Ray S.C., Colgrove R.C., Diaz F., et al. Genome sequencing and analysis of geographically diverse clinical isolates of herpes simplex virus 2. *J. Virol.* 2015; 89(16): 8219-32. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01303-15>
  34. Johnston C., Magaret A., Roychoudhury P., Greninger A.L., Reeves D., Schiffer J., et al. Dual-strain genital herpes simplex virus type 2 (HSV-2) infection in the US, Peru, and 8 countries in sub-Saharan Africa: a nested cross-sectional viral genotyping study. *PLoS Med.* 2017; 14(12): e1002475. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002475>
  35. Anderson T.P., Werno A.M., Beynon K.A., Murdoch D.R. Failure to genotype herpes simplex virus by real-time PCR assay and melting curve analysis due to sequence variation within probe binding sites. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(5): 2135-7. DOI: <http://doi.org/10.1128/jcm.41.5.2135-2137.2003>
  36. Wald A., Corey L. Persistence in the population: epidemiology, transmission. In: Arvin A., Campadelli-Fiume G., Mocarski E., Moore P.S., Roizman B., Whitley R., et al. *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.* Cambridge: Cambridge University Press; 2007.
  37. Sataoka H., Sabeji Y., Uzuki K., Nakakita T., Saito H., Sekine K., et al. Two outbreaks of herpes simplex virus type 1 nosocomial infection among newborns. *J. Clin. Microbiol.* 1986; 24(1): 36-40.
  38. Gutierrez S., Michalakis Y., Blanc S. Virus population bottlenecks during within-host progression and host-to-host transmission. *Curr. Opin. Virol.* 2012; 2(5): 546-55. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.08.001>
  39. Nakamura K., Oshima T., Morimoto T., Ikeda S., Yoshikawa H., Shiwa Y., et al. Sequence-specific error profile of Illumina sequencers. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(13): e90. DOI: <http://doi.org/10.1093/nar/gkr344>
  40. Greninger A.L., Roychoudhury P., Xie H., Casto A., Cent A., Pepper G., et al. Ultrasensitive capture of human herpes simplex virus genomes directly from clinical samples reveals extraordinarily limited evolution in cell culture. *mSphere.* 2018; 3(3): e00283-18. DOI: <http://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00283-18>
  41. Guan H., Shen A., Lv X., Yang X., Ren H., Zhao Y., et al. Detection of virus in CSF from the cases with meningoencephalitis by next-generation sequencing. *J. Neurovirol.* 2016; 22(2): 240-5. DOI: <http://doi.org/10.1007/s13365-015-0390-7>
  42. Naccache S.N., Federman S., Veeraraghavan N., Zaharia M., Lee D., Samayoa E., et al. A cloud-compatible bioinformatics pipeline for ultrarapid pathogen identification from next-generation sequencing of clinical samples. *Genome Res.* 2014; 24(7): 1180-92. DOI: <http://doi.org/10.1101/gr.171934.113>
  43. Oliver G.R., Hart S.N., Klee E.W. Bioinformatics for clinical next generation sequencing. *Clin. Chem.* 2015; 61(1): 124-35. DOI: <http://doi.org/10.1373/clinchem.2014.224360>
  44. Parsons L.R., Tafuri Y.R., Shreve J.T., Bowen C.D., Shipley M.M., Enquist L.W., et al. Rapid genome assembly and comparison decode intrastrain variation in human alphaherpesviruses. *mBio.* 2015; 6(2): e02213-14. DOI: <http://doi.org/10.1128/mBio.02213-14>
  45. Wan Y., Renner D.W., Albert I., Szpara M.L. VirAmp: a galaxy-based viral genome assembly pipeline. *Gigascience.* 2015; 4: 19. DOI: <http://doi.org/10.1186/s13742-015-0060-y>
  46. Lavezzo E., Barzon L., Toppo S., Palù G. Third generation sequencing technologies applied to diagnostic microbiology: benefits and challenges in applications and data analysis. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2016; 16(9): 1011-23. DOI: <http://doi.org/10.1080/14737159.2016.1217158>