



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

5

Том 69 • 2024

Volume 69 • Issue 5 • 2024

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: Russian Science Citation Index, 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, ROAD, HYPERLINK, OPENALEX, FATCAT, ZEITSCHRIFTEN DATENBANK

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>;
<https://www.doaj.org>;
<https://www.elsevier.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 30.10.2024.

Формат 60×90^{1/8}.

Тираж 50 экз.

«Объединенный полиграфический
комплекс». 115114, Москва,
Дербеневская набережная, 7с2.
E-mail: info@opk.bz. www.opk.bz

16+

© ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2024

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

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

(VOPROSY VIRUSOLOGII)

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

5

Том 69 · 2024

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.)

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

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)

Глунов 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 Л.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)

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

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

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

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

Нетёсов 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)

Яшкуллов 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)

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:

Russian Science Citation Index, 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, ROAD, HYPERLINK, OPENALEX, FATCAT, ZEITSCHRIFTEN DATENBANK

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>
<https://www.doaj.org/>;
<https://www.elsevier.com>

PUBLISHER:

Central Research Institute for Epidemiology,
111123, 3A, Novogireevskaya Str.,
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 Str.,
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 October 30, 2024.
Print format 60 × 90^{1/8}.
Circulation 50 copies.

Produced at the «United Printing Complex». 115114, 7b2 Derbenevskaya embankment, Moscow, Russia.
E-mail: info@opk.bz. www.opk.bz

16+

© Central Research Institute for Epidemiology, 2024

**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

5

Volume 69 · 2024

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)

Lukashev A.N. – RAS Corr. Member, 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)

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)

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

ОБЗОРЫ

Бобкова М.Р.

Дефектные провирусы ВИЧ: возможное участие в патогенезе ВИЧ-инфекции* 399

Охлопкова О.В., Кононова Ю.В., Тюменцева М.А., Тюменцев А.И., Шестопалов А.М., Акимкин В.Г.

Гладконосые летучие мыши (семейство Vespertilionidae) как возможный резервуар лисса- и коронавируса в Западной Сибири и на юге европейской части России* 415

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Adeiza S.S., Islam M.A., Mungadi H.U., Shuaibu A.B., Sah R.

Пререгистрированный мета-метаанализ по глобальному распространению гепатотропных вирусов* 429

Калнина Л.Б., Селимова Л.М., Носик Д.Н.Оценка анти-ВИЧ-1 (Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus type 1) активности 6НР и ЗТС *in vitro* с использованием вариантов клеточной линии МТ-4 с различной репликативной активностью* 441**Тихомиров Д.С., Демин М.В., Серикова А.А., Бидерман Б.В., Судариков А.Б., Туполева Т.А.**Мутации в гене *UL97* цитомегаловируса (Orthoherpesviridae: Herpesvirales: Cytomegalovirus: Cytomegalovirus humanbeta 5) увеличивают продолжительность виремии и снижают противовирусный ответ у реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток* 449**Жаппарова Г.А., Мырзахметова Б.Ш., Тленчиева Т.М., Тусипова А.А., Бисенбаева К.Б., Тойтанова А.С., Кутумбетов Л.Б.**

Оценка эффективности химической инактивации и иммуногенности варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2 459

Антонова А.А., Лебедев А.В., Ожмегова Е.Н., Шлыкова А.В., Лаповок И.А., Кузнецова А.И.

Вариабельность неструктурных белков у вариантов ВИЧ-1 суб-субтипа А6 (Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1, sub-subtype А6), циркулирующих в разных регионах Российской Федерации* 470

Чернышев Р.С., Иголкин А.С., Зиняков Н.Г., Чвала И.А.

Сравнительный анализ полногеномных последовательностей изолятов вируса африканской чумы свиней (Asfarviridae: Asfivirus), выделенных на территории левобережья Днепра в 2023 году* 481

CONTENTS

REVIEWS

Bobkova M.R.

Defective HIV proviruses: possible involvement in the HIV infection pathogenesis* 399

Ohlopkova O.V., Kononova Yu.V., Tyumentseva M.A., Tyumentsev A.I., Shestopalov A.M., Akimkin V.G.

Plain-nosed bats (family Vespertilionidae) as a possible reservoir of lyssaviruses and coronaviruses in Western Siberia and the south of European Russia* 415

ORIGINAL RESEARCHES

Adeiza S.S., Islam M.A., Mungadi H.U., Shuaibu A.B., Sah R.

A preregistered meta-meta-analysis on the global distribution of Hepatotropic Viruses* 429

Kalnina L.B., Selimova L.M., Nosik D.N.Evaluation of anti-HIV-1 (Retroviridae: *Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus type 1*) activity of 6HP and 3TC *in vitro* using MT-4 cell line variants with different replicative activity* 441**Tikhomirov D.S., Demin M.V., Serikova A.A., Biderman B.V., Sudarikov A.B., Tupoleva T.A.**Mutations in human cytomegalovirus (Orthoherpesviridae: *Herpesvirales: Cytomegalovirus: Cytomegalovirus humanbeta 5*) UL97 gene lead to increase in viremia duration and poor antiviral response in recipients of allogeneic hematopoietic stem cells* 449**Zhapparova G.A., Myrzakmetova B.Sh., Tlenchiyeva T.M., Tussipova A.A., Bissenbayeva K.B., Toytanova A.S., Kutumbetov L.B.**

Isolation of the Omicron variant of the SARS-CoV-2 virus and assessment of the effectiveness of inactivants for use in vaccine manufacturing technology 459

Antonova A.A., Lebedev A.V., Ozhmegova E.N., Shlykova A.V., Lapavok I.A., Kuznetsova A.I.Variability of non-structural proteins in HIV-1 sub-subtype A6 (Retroviridae: *Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1*, sub-subtype A6) variants circulating in different regions of the Russian Federation* 470**Chernyshev R.S., Igoikin A.S., Zinyakov N.G., Chvala I.A.**Comparative analysis of whole-genome sequences of African swine fever virus (Asfarviridae: *Asfivirus*) isolates collected on the territory of the left bank of the Dnieper River in 2023* 481

ОБЗОРЫ

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-261>

© БОБКОВА М.Р., 2024



Дефектные провирусы ВИЧ: возможное участие в патогенезе ВИЧ-инфекции

Бобкова М.Р.✉

ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва, Россия

Резюме

Обзорная статья содержит анализ информации, полученной в результате поиска литературы по теме «дефектные геномы ВИЧ (ВИЧ, Human immunodeficiency virus-1, Lentivirus, Orthoretrovirinae, Retroviridae)». Рассматриваются вопросы происхождения дефектных геномов ВИЧ, возможность их транскрипции и трансляции, участие дефектных РНК и белков в стимуляции естественного и адаптивного иммунитета, вклад в патогенез ВИЧ-инфекции и гиперактивацию иммунной системы в условиях успешной антиретровирусной терапии (АРТ), эволюционные процессы в популяции провирусов ВИЧ под действием АРТ, возможные проблемы разработок элиминации резервуаров и эрадикации ВИЧ, связанные с существованием дефектных ВИЧ.

Ключевые слова: ВИЧ; провирус; дефектный геном; транскрипция; трансляция; резервуар; гиперактивация; антиретровирусная терапия

Для цитирования: Бобкова М.Р. Дефектные провирусы ВИЧ: возможное участие в патогенезе ВИЧ-инфекции. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(5): 399–414. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-261> EDN: <https://elibrary.ru/pselci>

Финансирование. Исследование выполнено с привлечением средств гранта Российского научного фонда № 22-15-00117, <https://rscf.ru/project/22-15-00117/>

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

REVIEW

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-261>

Defective HIV proviruses: possible involvement in the HIV infection pathogenesis

Marina R. Bobkova✉

I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia

Abstract

This review article analyzes information obtained from a literature search on defective HIV genomes (HIV-1, Human Immunodeficiency Virus, Lentivirus, Orthoretrovirinae, Retroviridae). It discusses the origins of defective HIV genomes, their potential for transcription and translation, and the role of defective RNA and proteins in stimulating both innate and adaptive immunity. The article also explores their contribution to HIV pathogenesis, immune system hyperactivation despite successful antiretroviral therapy (ART), and the evolutionary processes in HIV proviral populations under ART. Additionally, it addresses challenges in reservoir elimination and HIV eradication that arise from the existence of defective HIV viruses.

Keywords: HIV; provirus; defective genome; transcription; translation; reservoir; hyperactivation; antiretroviral therapy

For citation: Bobkova M.R. Defective HIV proviruses: possible involvement in the HIV infection pathogenesis. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(5): 399–414. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-261> EDN: <https://elibrary.ru/pselci>

Funding. The study was supported by a grant from the Russian Science Foundation (project No. 22-15-00117, <https://rscf.ru/project/22-15-00117/>)

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Введение

Широкое внедрение и совершенствование антиретровирусной терапии (АРТ) позволило существенно снизить заболеваемость и смертность людей, живущих с ВИЧ (ЛЖВ). Действие АРТ направлено на одновременное ограничение нескольких этапов репликации вируса и предотвращение заражения новых клеток-мишеней, однако полное излечение ВИЧ-инфекции остается недостижимым вследствие существования резервуаров – как клеточных (латентно инфицированных клеток, содержащих провирусную ДНК ВИЧ), так и анатомических (органов и тканей, где продолжается репликация вируса) [1, 2].

По этой причине отмена лечения даже после длительного отсутствия вирусной нагрузки (ВН) неизбежно приводит к быстрому восстановлению продукции вируса. Пожизненное лечение увеличивает ожидаемый срок жизни ЛЖВ, практически приближая его к среднестатистическому для неинфицированных людей, однако может быть осложнено токсичностью АРТ-препаратов, взаимодействием лекарств, проблемами соблюдения режима лечения, стигматизацией, а также значительными экономическими затратами.

Успех АРТ в клинических условиях принято оценивать снижением ВН до неопределяемого уровня (обычно менее 20–50 копий РНК/мл крови) и ростом абсолютного и относительного числа CD4⁺ Т-клеток. Несмотря на улучшение функции иммунной системы на фоне успешной АРТ, у ЛЖВ отмечается более высокий риск новых заболеваний и смерти от серьезных осложнений, не связанных со СПИДом, по сравнению с неинфицированными лицами того же возраста. Среди состояний повышенного риска находятся рак, не связанный со СПИДом, хронические сердечно-сосудистые заболевания, заболевания печени и почек. Как теперь установлено [3–5], этот повышенный риск обусловлен хорошо известным феноменом повышения маркеров хронического воспаления и иммунной активации (гиперактивации) [2, 6–9]. Маркеры активации не зависят от эффективности подавления ВН и продолжают возрастать в течение жизни даже у самых успешных пациентов с длительно неопределяемой ВН; также практически не зависит от успеха АРТ и объем резервуаров [10, 11].

На сегодняшний день причина ВИЧ-ассоциированной хронической активации иммунной системы у ЛЖВ остается не до конца понятной. Предполагается, что роль в этом феномене играют несколько процессов; к ним относятся микробная транслокация [12], хроническая коинфекция с другими патогенами, такими как цитомегаловирус [13], особенности генетики хозяина [14], факторы образа жизни (например, курение и употребление наркотиков) [15], а также явление так называемой низкой вирусемии (low level viremia) ВИЧ,

источником которой, по всей вероятности, является периодическая активация резервуаров [16–18].

Между тем значительное число работ в последние годы было посвящено так называемым «дефектным» (далее без кавычек) геномам вирусов (к их числу относятся вирус гриппа, буньявирусы, флавивирусы, альфавирусы, коронавирусы, пикорнавирусы) [19, 20], в том числе провирусам ВИЧ (defective provirus). Сам факт их существования был описан очень давно – в 1997 г. было обнаружено значительное присутствие провирусных геномов ВИЧ, имеющих делеции разного размера, в периферических мононуклеарных клетках (peripheral blood mononuclear cells) у ЛЖВ [21]. Как стало очевидно позднее, дефектные провирусы не просто часто встречаются, а составляют от 90% [11] до 99,8% [10] всей провирусной популяции.

Общим свойством дефектных провирусов является их неспособность производить инфекционные вирусные частицы, и в течение ряда лет консенсусное мнение считало их «тупиковым продуктом» размножения ВИЧ, образующим «кладбище» вирусов [22]. Данные последних лет дают основания полностью пересмотреть эту точку зрения и утверждать, что провирусы ВИЧ у пациентов, получающих АРТ и достигших полной супрессии репликации ВИЧ (далее – АРТ-пациенты), не являются дефектными в общем смысле, а скорее, представляют собой неполные формы провирусов, способные производить транскрипты клеточно-ассоциированной РНК и экспрессировать новые белки, связанные с ВИЧ. Эта информация дает основу для анализа возможного участия дефектных вирусов в патофизиологии ВИЧ-инфекции в условиях успешной АРТ, включая феномен хронической активации иммунной системы. Некоторые из известных на данный момент сведений о дефектных провирусах ВИЧ будут изложены в данном обзоре.

Происхождение дефектных геномов ВИЧ

Формирование дефектных геномов ВИЧ является результатом комбинации ошибок, происходящих на разных этапах репликации вируса, действия хозяйских факторов рестрикции и последующего отбора под контролем иммунной системы [23]. Наиболее уязвимым в отношении ошибок является, бесспорно, этап обратной транскрипции (reverse transcription). Обратная транскриптаза (reverse transcriptase, RT) ВИЧ на стадии синтеза кДНК работает с невысокой точностью и совершает около 10^{-5} ошибочных включений нуклеотидов (мутаций)/нуклеотид/цикл репликации, при этом у фермента отсутствует механизм коррекции (proofreading). В дополнение к этому мутации и делеции генерируются в момент смены матрицы в ходе обратной транскрипции, когда RT совершает харак-

терные «прыжки» [24]. Более того, процесс обратной транскрипции включает диссоциацию RT и повторную инициацию синтеза на матрице геномной РНК, что приводит к образованию мутантных и укороченных промежуточных продуктов кДНК ВИЧ [23, 25–27] (рис. 1). Малые делеции (один/несколько нуклеотидов) также способны нанести заметный урон провирусной ДНК, проявляющийся образованием стоп-кодонов или сдвигом рамки считывания [22, 25].

Помимо больших и малых делеций, у дефектных провирусов можно встретить «нехватки» 5'- и 3'-концевых фрагментов генома и инверсии участков генома, образующиеся преимущественно на стадии RT, а также гипермутации и дефекты донорно-акцепторных участков сплайсинга [10, 27–29].

Вклад в формирование делеций может вносить клеточный фактор рестрикции SAMHD1 [30–34], который снижает внутриклеточную концентрацию нуклеотидов в покоящихся CD4⁺ Т-клетках и миелоидных клетках, ограничивая таким образом эффективность и завершение обратной транскрипции. Другой рестрикционный фактор хозяйской клетки – APOBEC3G – также действует на этапе обратной транскрипции, выступая в роли цитидиндезаминазы (C→U) в составе вновь синтезированной минус-цепи кДНК. Результатом становится гипермутация ВИЧ,

вызванная заменой гуанина на аденин (G→A) в составе плюс-цепи ДНК и сопряженная с формированием стоп-кодонов [32, 35, 36] (рис. 2).

Наконец, ошибки в последовательности провируса могут появляться и на этапе его интеграции в хромосомную ДНК клетки. Этот сложный процесс, описанный многими авторами [30, 37, 38], здесь детализирован не будет, напомним лишь, что последний этап интеграции – перенос цепи – требует «дотраивания» концевых фрагментов провируса с участием хозяйских ферментов репарации ДНК. Механизм восстановления поврежденных ДНК, как известно, подвержен ошибкам (error-prone) [39], которые и становятся источником дефектных провирусов.

Дефектные геномы могут транскрибироваться

В условиях успешной АРТ большинство клеток, несущих провирусную ДНК, находятся в латентном состоянии и не производят вирусных частиц, тем не менее, как оказалось, до 7% провирусов остаются транскрипционно активными [40]. Транскрипция в латентно инфицированных клетках происходит так же, как и в клетках с активной репликацией ВИЧ, и включает несколько этапов, подробно описанных в литературе [2, 41].

Кратко, длинный концевой повтор ВИЧ (long terminal repeat, LTR) действует как энхансер и промотор,

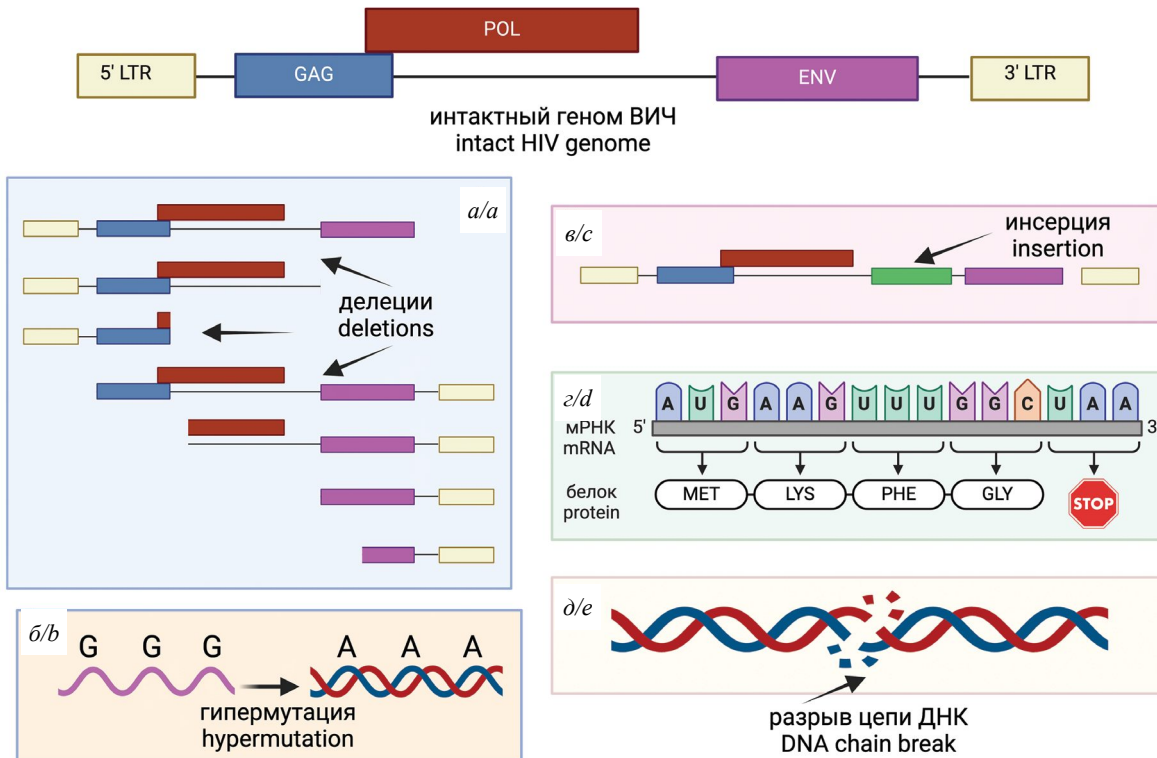


Рис. 1. Причины формирования дефектных ВИЧ.

a – делеции фрагментов генома ВИЧ; *b* – гипермутации G→A на примере APOBEC3G; *c* – инсерция (вставка); *d* – стоп-кодоны; *e* – механическое повреждение ДНК.

Fig. 1. Causes of Defective HIV Virus Formation.

a – deletions in HIV genome fragments; *b* – G→A hypermutations, illustrated with APOBEC3G; *c* – insertions; *d* – stop codons; *e* – mechanical DNA damage.

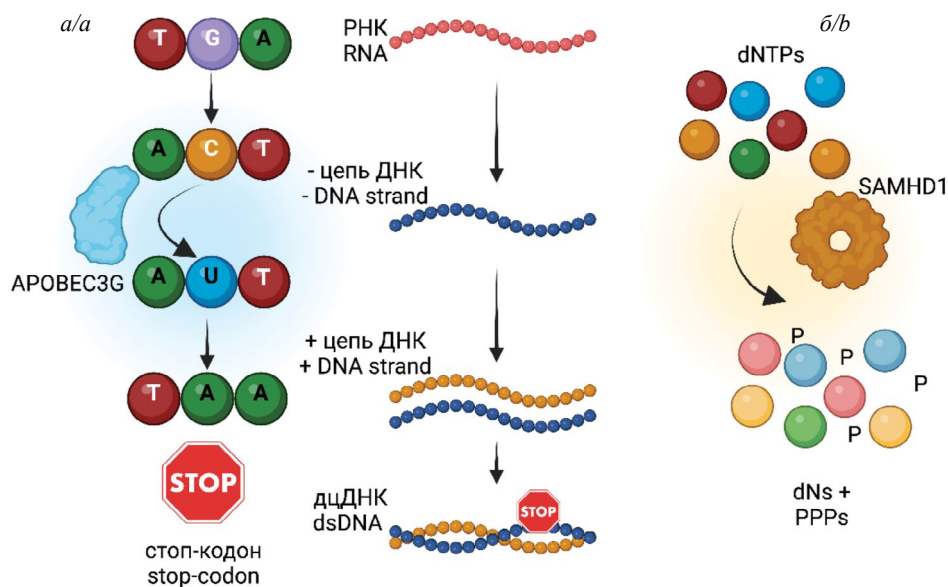


Рис. 2. Вклад рестрикционных факторов хозяйской клетки в формирование мутаций в геноме ВИЧ на этапе обратной транскрипции.

a – APOBEC3G – цитидиндеаминаза; *б* – SAMHD1 – фосфогидролаза.

Fig. 2. Contribution of Host Cell Restriction Factors to the Formation of Mutations in the HIV Genome During Reverse Transcription.

a – APOBEC3G – a cytidine deaminase; *b* – SAMHD1 – a phosphohydrolase.

рекрутирующий активаторы транскрипции клетки-хозяина, репрессоры, факторы ремоделирования хроматина и комплекс РНК-полимеразы – RNAP II, каждый из которых влияет на активацию или репрессию транскрипции. Регуляторный белок ВИЧ Tat связывает петлю TAR (trans-activation response) – элемент на 5'-конце первичного транскрипта ВИЧ – и рекрутирует PTEFb (positive transcription elongation factor b), кофактор, который повышает процессивность RNAPII. Результатом ее активности становятся полноразмерные транскрипты РНК ВИЧ. Часть из них становится в последующем геномной РНК и входит в состав новых вирусных частиц; несплайсированные матричные РНК (мРНК) нужны также для синтеза белков Gag и Pol, другая часть РНК подвергается сплайсингу с образованием белков Env, Vif, Vpr и Vpu (частично (однократно) сплайсированная мРНК) и Tat, Rev и Nef (множественно сплайсированный вариант мРНК) (рис. 3).

Значительная часть провирусных последовательностей, обнаруженных у ЛЖВ, получающих АРТ, являются дефектными и содержат мутации, которые могут затрагивать структуру LTR, основные донорные последовательности сплайсинга и ψ-упаковочный элемент (шпилечная последовательность РНК, необходимая для димеризации геномов в ходе упаковки [42]). Как выяснилось, в крови пациентов с полностью подавленной ВН обнаруживаются транскрипты как интактных, так и дефектных провирусов в сопоставимых количествах [11, 28, 43], при этом результат транскрипции последних зависит от характера и масштаба дефекта.

Отсутствие промоторного 5'-концевого фрагмента приводит к формированию неканонических транс-

криптов РНК, содержащих последовательности *env* и *nef* (рис. 3); в этом случае, по-видимому, используются альтернативные участки для инициации транскрипции, например, такие участки имеются в составе гена *env* [28]. Если дефект затрагивает донорные участки сплайсинга, проблема решается путем использования механизмов альтернативного сплайсинга [44]; в этот процесс активно вмешиваются внутригенные цис-действующие элементы (intragenic cis-acting elements), взаимодействующие с транскрипционным аппаратом клетки.

Еще один способ образования транскриптов на матрице дефектных провирусов – синтез антисмысловой (antisense) РНК на комплементарной цепи ДНК, начиная с 3'-LTR. Факт существования таких транскриптов подтвержден [45], однако неясно пока, регулируется ли антисмысловая транскрипция теми же сигнальными каскадами, что и транскрипция с 5'-LTR.

Нередко у дефектных вирусов бывает делетирована область генома *tat/rev*; в этих случаях уровень транскрипции без белка Tat заметно снижается, а экспорт РНК из ядра клетки оказывается затруднен в отсутствие белка Rev [10].

Наконец, наличие делеций и стоп-кодонов приводит к преждевременной остановке синтеза мРНК, и такие короткие транскрипты также обнаруживаются у АРТ-пациентов [28].

Таким образом, даже в случае успеха АРТ в клетках пациентов на заметном уровне детектируются несплайсированные и частично сплайсированные РНК – производные интактных провирусов, а также разнообразные неканонические РНК, имеющие происхождение от дефектных провирусов.

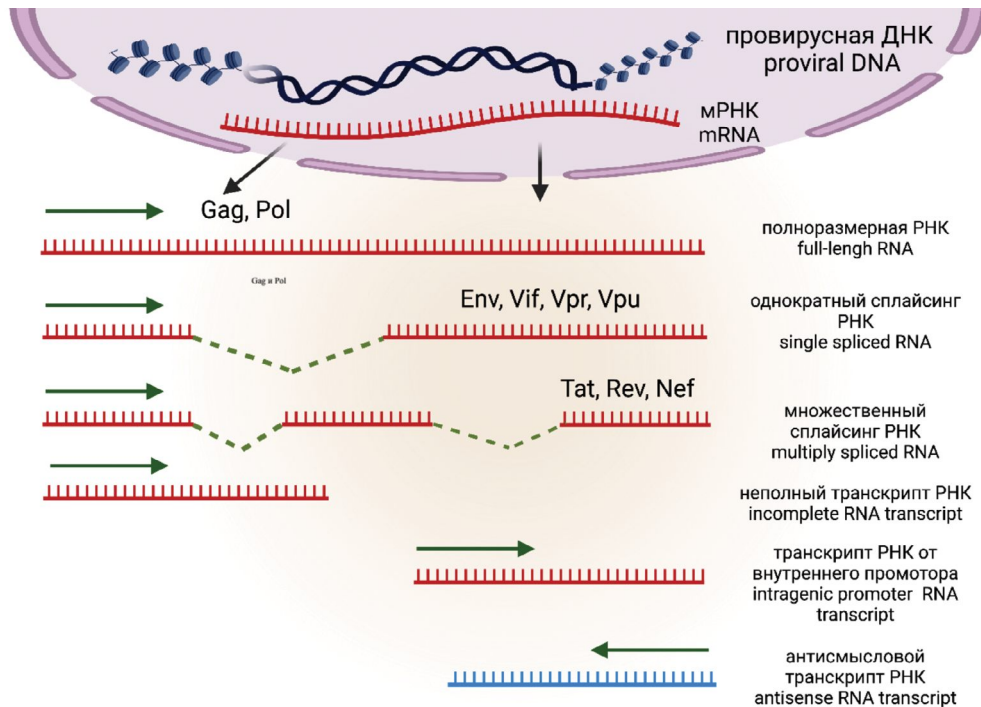


Рис. 3. Варианты сплайсинга полноразмерной РНК ВИЧ.
 Fig. 3. Splicing Variants of Full-Length HIV RNA.

Дефектные геномы могут производить белки

Присутствие в латентно инфицированных клетках значительного количества необычных РНК закономерно поставило вопрос о том, способны ли они служить матрицей для синтеза белков. Ответ на этот вопрос уже получен, и сейчас хорошо известно, что значительная часть неканонических РНК обеспечивает трансляцию белков – таких же аномальных, как и их нуклеотидные матрицы [17, 28, 44].

Чаще всего дефекты провируса – делеции, инверсии и точечные мутации – связаны с нарушением рамок считывания (open reading frame, ORF), и очевидным выходом из этой ситуации является использование альтернативных ORFs; такие, обычно укороченные (криптические), белки действительно можно найти у успешных АРТ-пациентов [22, 28, 46]. Альтернативный сплайсинг РНК аналогичным образом приводит к образованию aberrantных белков [44].

Описаны также случаи использования альтернативных трансляционных стартовых кодонов (например, вместо традиционного AUG-кодона инициация синтеза белков может происходить с участием кодона CUG), трансляции антисмысловых РНК, а также механизма leaky ribosomal scanning, когда рибосома, столкнувшись с «неблагоприятным нуклеотидным контекстом» вокруг стартового кодона, продолжает движение вдоль молекулы РНК в поисках оптимального места «посадки» [23].

Вопрос о том, могут ли аномальные белки формировать вирусоподобные частицы, пока остается открытым. Не менее интересен вопрос об их иммуногенности, и в этом отношении некоторая определенность уже достигнута. Показано, например, что дефектные

рибосомные продукты (defective ribosomal products, DRiPs) быстро деградируют по протеасомному пути и «загружаются» на молекулы МНС-I, экспонирующие их на поверхности клетки [28]. Та же судьба постигает и белки – продукты антисмысловых РНК, при этом они вызывают образование циркулирующих антител [47]. Наконец, неканонические пептиды ВИЧ активируют CD8⁺ Т-клетки от ЛЖВ, получающих АРТ, что также указывает на наличие у них иммуностимулирующей активности [48].

Все эти наблюдения наводят на мысль о том, что дефектные провирусы ВИЧ, не способные дать жизнеспособное потомство и не являющиеся по этой причине вполне «живыми» (один из исследователей назвал их «зомби-вирусами» [22]), сохраняют способность генерировать важные для патогенеза инфекции макромолекулы. Вопрос о том, каким образом криптические транскрипты и белки – продукты дефектных провирусов становятся иммуномодуляторами и влияют на иммунные реакции хозяина, активно изучается.

Неканонические РНК и естественный иммунитет

В цикле размножения ВИЧ участвуют несколько видов нуклеиновых кислот вируса: вирусная РНК, кДНК, РНК-транскрипты провирусной ДНК – в цитозоле, провирусная ДНК и РНК-транскрипты – в ядре клетки. Все эти молекулы способны выступить в роли внутриклеточных патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (intracellular pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) и взаимодействовать с патоген-распознающими рецепторами (pathogen recognition receptors, PRRs) [23].

К PRRs, распознающим молекулы ДНК, прежде всего относится цитозольный ДНК-сенсор cGAS (cyclic guanosine adenosine synthase) [49]. В норме ДНК в цитоплазме находиться не должна, и обнаружение чужеродной ДНК вирусного или бактериального происхождения является решающим элементом иммунитета у многих организмов. В клетках млекопитающих для решения этой задачи имеется система cGAS-STING (cyclic GMP-AMP synthase – stimulator of interferon genes).

После связывания ДНК cGAS выступает в роли аллостерического триггера реакции между GMP и AMP с образованием циклического cGAMP, который, в свою очередь, связывает молекулы стимулятора генов интерферона (STING), стимулирующего фосфорилирование IRF3 (interferon regulatory factor 3). Цепочка событий завершается перемещением IRF3 в ядро клетки и транскрипцией генов интерферонов α и β (рис. 4) [49].

Белок IFI16 (gamma-interferon-inducible protein 16) – еще один ДНК-сенсор, который также рекрутирует STING после связывания с ДНК. Последующие события приводят к индукции интерферонов и провоспалительных цитокинов. В дополнение к этому наблюдается пироптоз (pyroptosis) CD4⁺ Т-клеток – ускоренная программируемая гибель клеток, сопровождающаяся активным выделением клеткой интерлейкина (IL) 1 β и IL-18 [50].

РНК ВИЧ, в свою очередь, привлекает к себе внимание цитозольных РНК-сенсоров; одним из примеров

служит тандем белков MAVS (mitochondrial antiviral-signaling protein) и RIG-1 (retinoic acid-inducible gene I) [51].

Белок MAVS расположен на внешней мембране митохондрий, пероксисом и эндоплазматического ретикулула. При вирусной инфекции цитозольный белок RIG-1 (иногда вместо него работает Toll-like рецептор TLR-3) обнаруживает присутствие вируса и связывается с MAVS. После присоединения нескольких клеточных белков [51] формируется MAVS-сигнальный комплекс, результатом деятельности которого становится фосфорилирование и перемещение в ядро уже упомянутого фактора IRF3, а вслед за этим – традиционная активация транскрипции генов интерферонов и провоспалительных цитокинов (рис. 4) [23].

Таким образом, в инфицированной клетке всегда находятся ВИЧ-ассоциированные молекулы ДНК и РНК, действующие как PAMPs и инициирующие воспалительный ответ естественных механизмов иммунной системы. Данных, прямо указывающих на участие в этих процессах неканонических ДНК и РНК – продуктов дефектных геномов ВИЧ, в литературе пока нет. Впрочем, поскольку описанный процесс распознавания РНК/ДНК носит неспецифический характер, нет оснований считать, что эти молекулы могут вести себя принципиально иначе, чем интактные РНК, и на сегодняшний момент большинство специалистов убеждены в том, что именно дефектные РНК и ДНК являются основными триггерами сигнальных каскадов воспа-

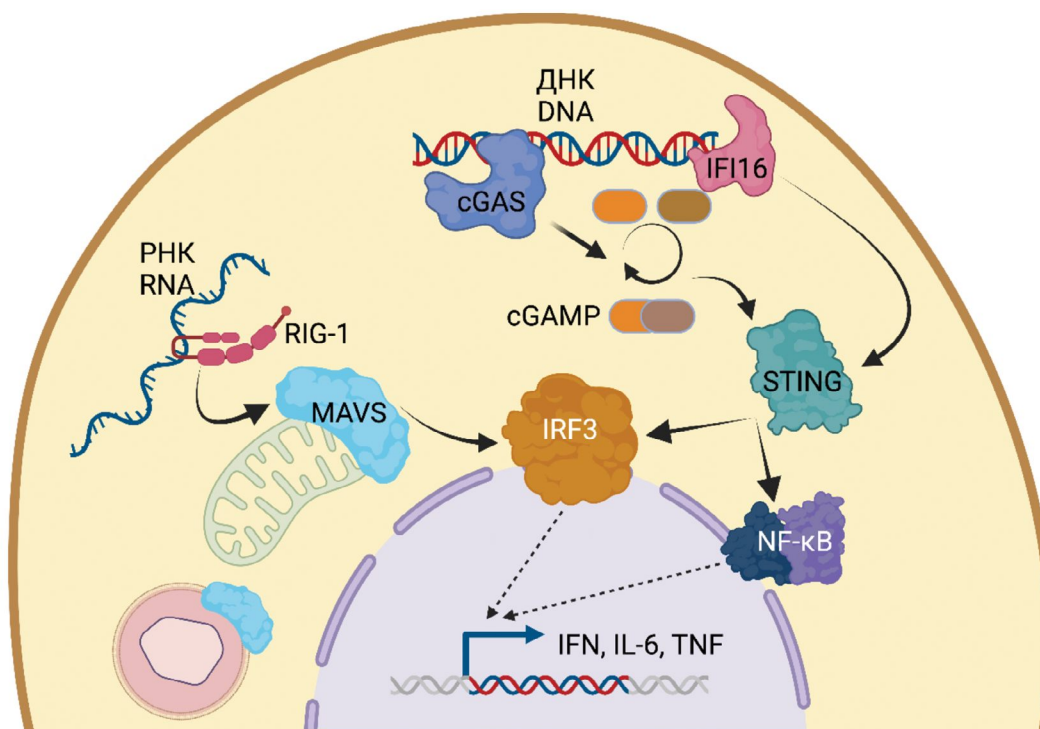


Рис. 4. Молекулы РНК и ДНК ВИЧ – стимуляторы естественного иммунитета.

ДНК-сенсоры: IFI16 и комплексе cGAS-STING; РНК-сенсоры: MAVS и RIG-1; IRF3 – фактор регуляции интерферона.

Fig. 4. HIV RNA and DNA Molecules as Stimulators of Innate Immunity.

DNA sensors: IFI16 and the cGAS-STING complex; RNA sensors: MAVS and RIG-1; IRF3 – interferon regulatory factor.

лительной реакции естественного звена иммунитета у пациентов в отсутствие ВН ВИЧ.

Белки – продукты дефектных геномов ВИЧ и гиперактивация иммунной системы

Образующиеся в ходе транскрипции дефектных провирусов ВИЧ неканонические РНК также имеют разнообразные дефекты, поэтому, как уже упоминалось выше, если таким РНК суждено стать матрицей для трансляции, образующиеся (аберрантные, криптические) белки отличаются от обычных белков вируса размерами, структурой и антигенными свойствами [28, 44]. Тем не менее дефекты не обязательно затрагивают все гены вируса, и в случае сохранения рамок считывания и целостности отдельных генов после завершения процессов созревания РНК (сплайсинга и модификации) такие РНК вполне могут стать матрицей для трансляции полноценных белков ВИЧ. Так, в работе [46] было продемонстрировано длительное присутствие белков Nef и Gag у АРТ-пациентов после достижения неопределяемой ВН. Авторы исследования [52] наблюдали сходные результаты и сделали правомерные выводы о том, что продукция белка Nef в условиях отсутствия активной репликации вируса, хотя бы частично, объясняется наличием пула клеток, несущих трансляционно-компетентные дефектные провирусы.

Аберрантные белки наряду с интактными белками ВИЧ сохраняли способность вызывать CD4 и CD8 Т-клеточный ответ [22, 28]. В работе [4] в качестве суррогатного маркера количества вирусных белков в плазме крови АРТ-пациентов использовали интенсивность полос на вестерн-блоте, параллельно оценивая количество интактных провирусов. Как оказалось, антитела к белкам ВИЧ сохранялись у таких пациентов в течение 10–20 лет после достижения неопределяемой ВН, т.е. прекращения репликации вируса. К этому моменту интактных геномов почти не оставалось, а пул провирусов был представлен в основном дефектными геномами, которые и выполняли роль матрицы для синтеза вирусных белков-антигенов.

Таким образом, набор белков в клетке, несущей дефектный провирус, включает как интактные, так и криптические белки ВИЧ, при этом и те и другие способны вызывать иммунный ответ – как гуморальный, так и клеточный (рис. 5). Независимо от направленности этого ответа, иммунные клетки у АРТ-успешных пациентов оказываются вовлеченными в непрерывный процесс антигенной стимуляции, которая, по мнению многих экспертов, и является причиной хронической активации иммунной системы [4, 17, 22, 28]. Этот же феномен лежит в основе так называемого «истощения» ВИЧ-специфических CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов [53, 54].

Поиски прямых подтверждений наличия ассоциации между персистенцией неполноразмерных (т.е. дефектных) клеточно-ассоциированных (cell associated, CA) РНК ВИЧ, гуморальным ответом на ВИЧ (количеством антител) и маркерами воспаления (цитокин IL-6, D-димер) привели к обнаружению прямой корреляции между ними [4]. Аналогично, в работе

[43] содержание коротких (т.е. неканонических) CA РНК было сильно ассоциировано со степенью хронической иммунной активации, определяемой коэкспрессией HLA-DR и CD38 на CD8⁺ Т-клетках. Эти и другие наблюдения послужили доказательством связи между экспрессией дефектных ВИЧ и активацией иммунной системы; авторы отмечают, что этот феномен, в свою очередь, может приводить к недостаточному увеличению количества клеток CD4⁺, несмотря на высокую эффективность АРТ (т.е. в отсутствие репликации вируса); клиницисты называют такие результаты дискордантными.

В совокупности результаты исследования дефектных РНК и белков ВИЧ все ближе подводят к выводу о том, что персистирующие дефектные провирусы, особенно те из них, которые транскрипционно активны, не являются «генетическим мусором», не имеющим отношения к патогенезу ВИЧ-инфекции и ее лечению, а, напротив, в ходе успешной АРТ обеспечивают непрерывное (и, к сожалению, избыточное) взаимодействие между «остаточной экспрессией» генов ВИЧ и иммунной системой [10, 55].

Дефектные геномы ВИЧ и методы оценки резервуаров

Сохранение латентных вирусных геномов у ЛЖВ, получающих АРТ, является основным препятствием на пути излечения от ВИЧ-инфекции [1, 2]. Вирусные резервуары – это прежде всего клетки, содержащие геномы ВИЧ, которые обладают способностью продуцировать инфекционные вирионы. Разработки, направленные на эрадикацию или функциональное излечение ВИЧ-инфекции, обязательно должны основываться на том или ином методе количественной оценки объема резервуара, позволяющем измерить эффект воздействия испытываемого препарата. Важно подчеркнуть здесь, что истинным резервуаром можно считать только те клетки, в которых латентный вирус может быть индуцирован (активирован) с последующим образованием новых вирионов.

Точная количественная оценка клеточных резервуаров ВИЧ является сложной задачей и основана на двух основных подходах – с применением культуральных либо молекулярных методов. Первая группа методов (дорогих и трудоемких) действительно измеряет количество только индуцируемых («живых», или репликативно компетентных) провирусов, однако условия индукции в культуре клеток заметно отличаются от природных, и значительную часть провирусов индуцировать не удается. По этой причине результаты применения таких методов оказываются многократно занижены по отношению к реальному объему резервуара. Вторая группа, основанная на вариантах ПЦР, проста и экономически эффективна, но эти методы так же многократно переоценивают объем резервуаров, поскольку не способны различить между собой интактные и дефектные геномы ВИЧ [29, 56]. Таким образом, единый простой подход, который позволил бы одновременно оценить генетическую целостность и индуцируемость резервуара, все

еще отсутствует. Попытки объединить в одном методе достоинства каждого из подходов делаются постоянно, и многие из них демонстрируют впечатляющие результаты [2], однако до сих пор не позволяют сравнивать между собой данные, полученные в разных лабораториях мира. Тем не менее существует возможность производить сравнительные оценки в динамике наблюдения пациента либо между группами пациентов, обследуемых в одном эксперименте. Именно так были получены данные, касающиеся изучения состава популяции персистирующих геномов ВИЧ («провирусного ландшафта»).

Клональная экспансия и активация латентных провирусов ВИЧ

Вопросы происхождения так называемой «остаточной вирусемии», т.е. присутствия единичных копий РНК ВИЧ в плазме крови у пациентов с ВН, не определяемой обычными методами, давно и много дебатированы в литературе [18, 57–59] и в данном обзоре детально обсуждаться не будут. Кратко, общепринятое мнение состоит в том, что появление новых вирусных частиц у таких пациентов связано главным образом не с продолжающейся репликацией вируса, которая ингибирована препаратами АРТ, а является результатом продукции вируса из латентно инфицированных клеток, время от времени размножающихся в ходе клональной экспансии (рис. 6).

Клональной экспансией называют процесс быстрого деления клеток, приводящий к размножению

генетически идентичных клонов клеток из одной родительской клетки. Свидетельства такого развития событий применительно к латентно инфицированным ВИЧ клеткам были получены в работах, посвященных анализу участков интеграции провирусной ДНК у вирусов, выделенных от АРТ-пациентов с отсутствием ВН.

Основная гипотеза этих исследований была основана на том, что встраивание провируса в хромосомную ДНК – процесс случайный, поэтому в случае повторяющихся циклов заражения будут выявлены разные участки локализации провирусов в хозяйской ДНК. Если же источником вируса являются одни и те же покоящиеся клетки, содержащие один вид ДНК с одинаковой точкой интеграции, генетический анализ выявит полное единообразие провирусов и их локализации, поскольку независимая интеграция ДНК ВИЧ с идентичной локализацией в разных клетках очевидно невозможна (рис. 7). Именно последний вариант был обнаружен в указанных исследованиях [60, 61]. Важно заметить, что для большинства латентных клеток деление в ходе экспансии не является поводом для активации провируса, и по окончании митоза они сохраняют свое «бездеятельное» состояние.

С пониманием причин активации провируса в покоящихся Т-клетках дело обстоит сложнее, и вероятных причин, по-видимому, несколько. Наиболее обсуждаемая тема – влияние участка интеграции провирусного генома в хромосомную ДНК на вероятность его транскрипции. Все больше данных сви-

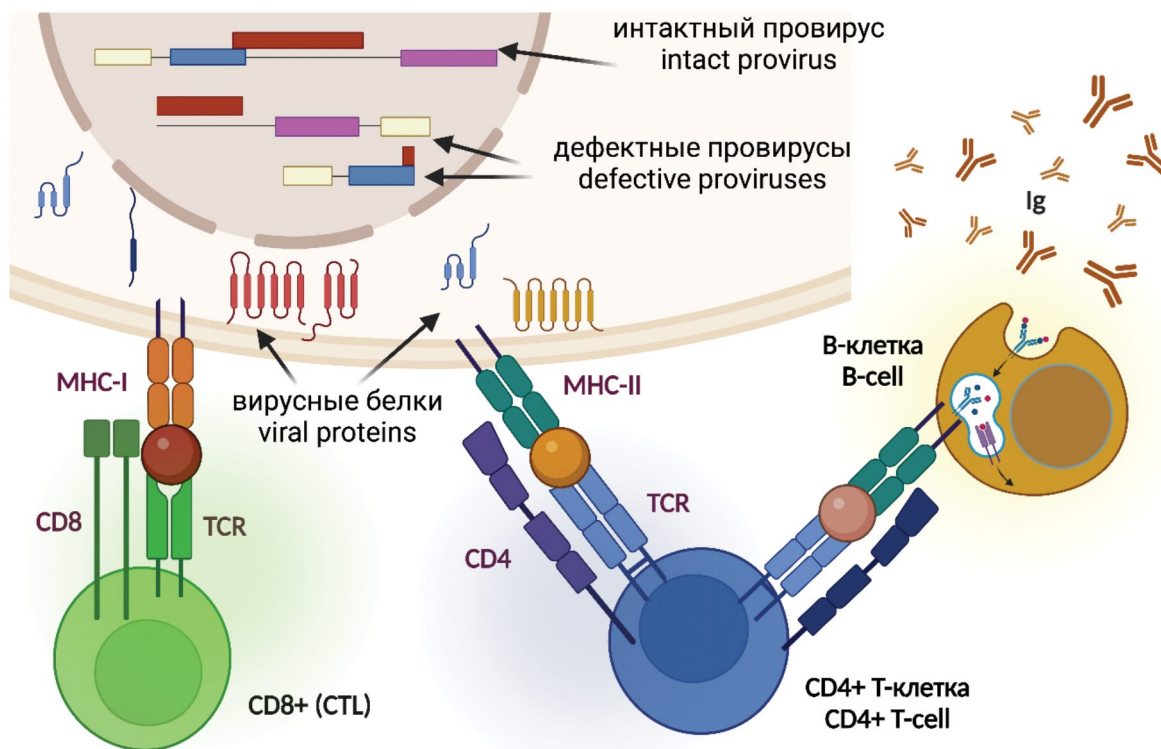


Рис. 5. Формирование клеточного иммунного ответа на интактные и дефектные белки ВИЧ.

Fig. 5. Formation of the Cellular Immune Response to Intact and Defective HIV Proteins.

детельствуют о том, что интеграция провируса ВИЧ вблизи транскрипционно активных участков хромосомы (геномный контекст провируса) может влиять на его экспрессию (рис. 8) [17, 55, 62]. Провирус, встроившийся вблизи активно транскрибируемого хозяйского гена, имеет больше шансов на собственную экспрессию, т.к. предположительно оказывается в благоприятном окружении способствующих транскрипции эпигенетических факторов. Одним из таких факторов оказался H3K36me3 – модифицированный гистон H3, известный своим участием в экспрессии генов человека [63]. Среди других причин активации провируса ВИЧ – воздействие факторов физической и химической природы, инфекционные заболевания, вакцинация, а также уровень гиперактивации иммунной системы в целом [18, 64].

Эти рассуждения относятся прежде всего к интактным провирусам, и специальных исследований, оценивающих эффективность транскрипции дефектных геномов ВИЧ, пока почти нет. Ответ на этот вопрос требует технически сложных экспериментов, поскольку для него необходима комбинированная оценка целостности провируса и его транскрипционной активности в одной и той же клетке. В недавнем уникальном исследовании был использован флуоресцентный метод гибридизации *in situ* (flow-fluorescence *in situ* hybridization, FISH) в одной клетке для идентификации ВИЧ-инфицированных клеток, кото-

рые экспрессируют вирусную РНК в ходе АРТ [65]. Как показали результаты исследования, почти все провирусы ВИЧ, секвенированные из клеток, содержащих клеточно-ассоциированную РНК (СА) ВИЧ, были дефектными. Даже если предположить, что эффективность транскрипции таких провирусов снижена по отношению к интактным геномам, следует не забывать о значительном преобладании дефектных вариантов ВИЧ; даже низкого уровня транскрипции и трансляции этих персистирующих провирусов может быть достаточно, чтобы вызвать и поддерживать воспалительные и иммунные реакции у АРТ-пациентов [23, 28].

Эволюция популяции латентных провирусов ВИЧ

Итак, в поддержании хронической активации иммунной системы у АРТ-пациентов принимают участие оба вида провирусов – интактные и дефектные, однако, как выяснилось, провирусный ландшафт в динамике лечения претерпевает изменения.

Во-первых, анализ интактных провирусных последовательностей у ЛЖВ до и после начала АРТ указывает на то, что подавляющая часть скрытого интактного резервуара ВИЧ у АРТ-пациентов состоит из вирусов, циркулировавших в момент начала лечения. После достижения неопределяемой ВН механизмом эволюции, в роли которых прежде всего выступают CD8⁺ цитотоксические клетки, становится «не с чем

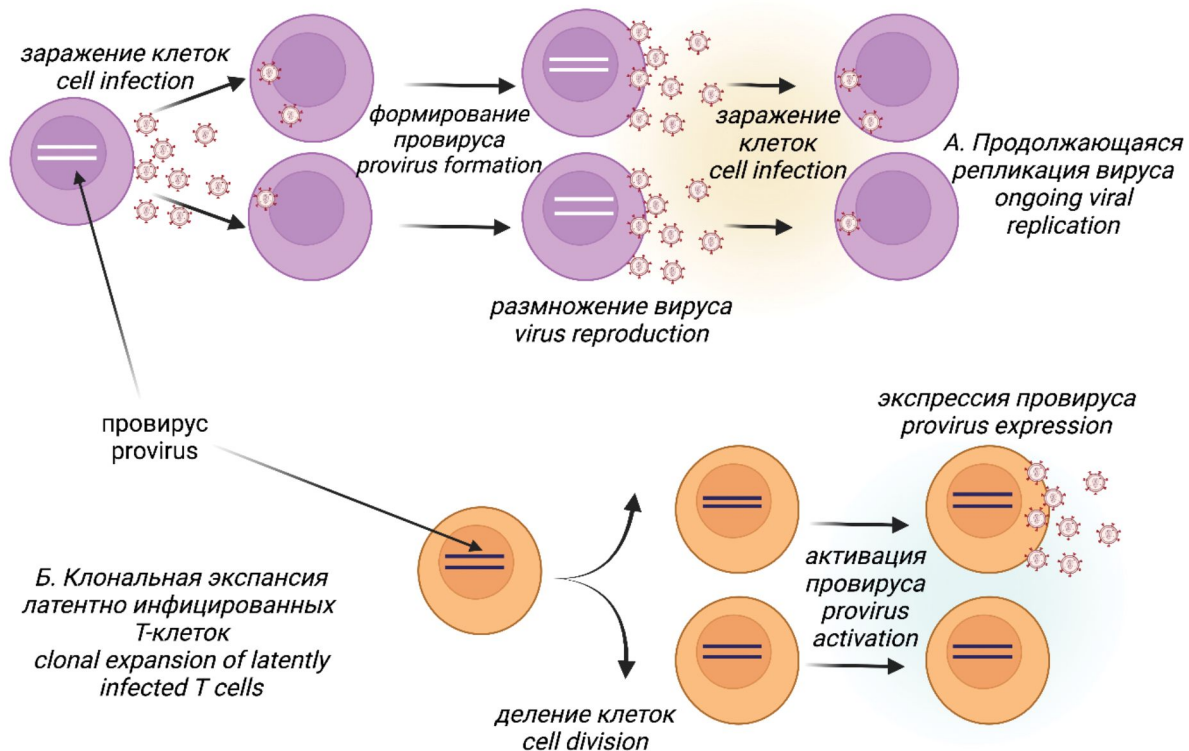


Рис. 6. Происхождение вирусных частиц ВИЧ.

a – продолжающаяся репликация ВИЧ с повторными циклами заражения; *b* – клональная экспансия с последующей периодической активацией провируса.

Fig. 6. Origin of HIV Viral Particles.

a – ongoing HIV replication with repeated infection cycles; *b* – clonal expansion followed by periodic activation of the provirus.

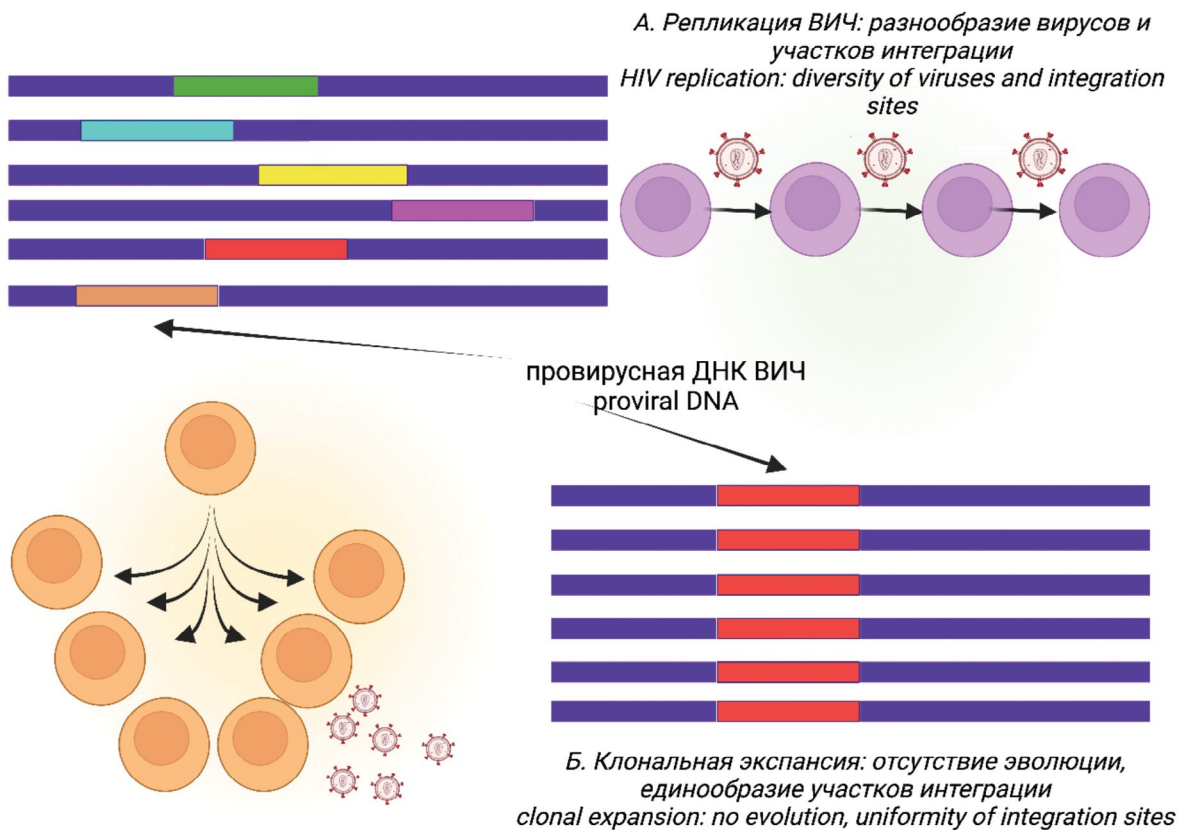


Рис. 7. Вариабельность ВИЧ и участков интеграции провируса в условиях продолжающейся репликации (а) и клональной экспансии (б).
Fig. 7. Variability of HIV and Provirus Integration Sites Under Conditions of ongoing replication (a); clonal expansion (b).

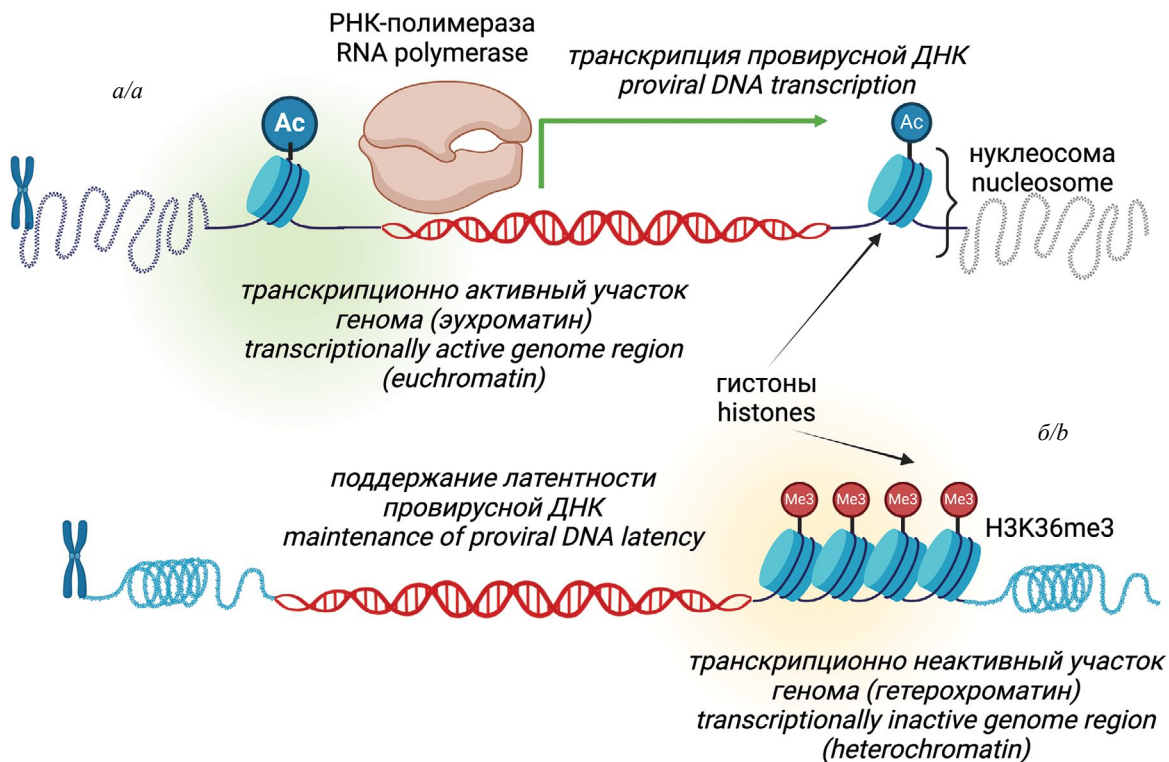


Рис. 8. Влияние геномного контекста провируса ВИЧ на эффективность его транскрипции.
 а – интеграция в участок эухроматина; б – интеграция в гетерохроматиновую область генома.

Fig. 8. Effect of the Genomic Context of the HIV Provirus on Transcription Efficiency.

а – integration into a euchromatic region; б – integration into a heterochromatic region of the human genome.

работать», и в ходе АРТ заметных эволюционных событий в популяции вируса не происходит [66]. Эти результаты вновь поддерживают точку зрения о том, что репликация ВИЧ не является механизмом поддержания резервуара ВИЧ в ходе успешной терапии, и после начала АРТ основным источником ВН становится периодическая активация резервуаров, содержащих однородные провирусные геномы (рис. 9).

Во-вторых, соотношение интактных и дефектных вирусов в динамике АРТ оказалось непостоянным, и во многих исследованиях было показано, что в ходе лечения доля интактных провирусов постепенно снижается [10, 28, 55]. Если перед началом АРТ она составляла до 36%, то спустя 3 года после достижения неопределяемой ВН пропорция снижалась до 6% [22].

В-третьих, были получены важные данные о локализации провирусных геномов ВИЧ. Весьма любопытно выглядят результаты сравнительного исследования локализации интактных и дефектных провирусов у элитных контроллеров, поддерживающих неопределяемую ВН в отсутствие АРТ: как оказалось, первые из них преимущественно обнаруживаются в участках гетерохроматина, характеризующихся низким уровнем транскрипции, а вторые – в активно транскрибируемых эухроматиновых

участках [67]. Это позволило авторам высказать гипотезу о том, что иммунная система с течением времени формирует резервуар вируса, отдавая предпочтение тем из провирусов, которые располагаются в «безмолвных» регионах хозяйского генома. Эксперименты по реактивации провируса подтвердили это предположение: относительно небольшие группы латентно инфицированных клеток легко индуцировались с образованием новых вирионов, в то время как вторая, более крупная группа инфицированных клеток содержала интактный провирус, более устойчивый к реактивации [55]. Авторы считают, что интактные провирусы, интегрированные в участки гетерохроматина и демонстрирующие признаки «глубокой латентности», по-видимому, обладают преимуществами для отбора и сохраняются в течение длительного времени, вероятно, из-за очень низкой или отсутствия провирусной транскрипции и последующей защиты от антивирусного иммунного распознавания.

Все вышесказанное однозначно указывает на то, что популяция резервуарных клеток, содержащих провирусы ВИЧ, с течением времени претерпевает существенную эволюцию под действием иммунной системы, при этом критическим моментом является начало

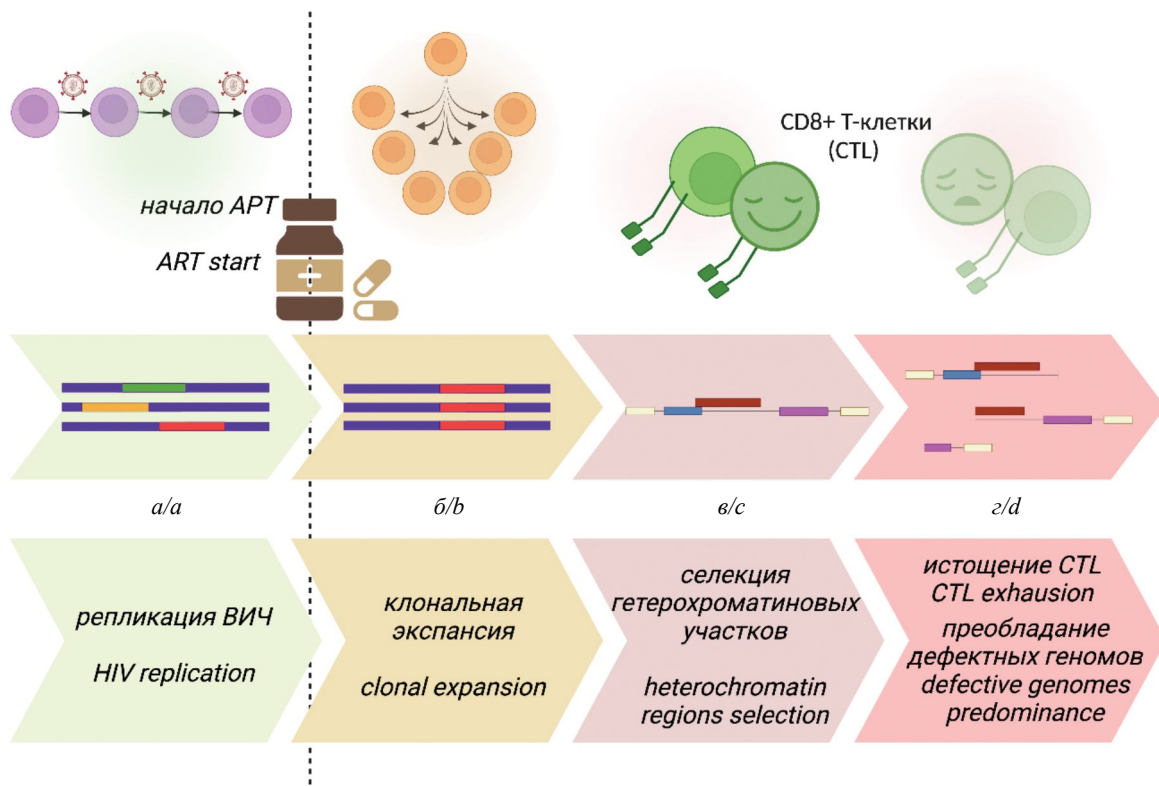


Рис. 9. Основные события эволюции популяции провирусов ВИЧ.

a – период от заражения до начала АРТ; *б–г* – клональная экспансия как основной источник вирусной нагрузки; *в* – отбор провирусов, встроенных в гетерохроматиновые участки генома хозяина; *г* – отбор дефектных провирусов. Этапы *в* и *г* происходят параллельно.

Fig. 9. Key Events in the Evolution of the HIV Proviral Population.

a – the period from infection to the start of ART; *b–d* – clonal expansion as the main source of HIV; *c* – selection of proviruses integrated into heterochromatin regions of the host genome; *d* – selection of defective proviruses. Stages *C* and *D* occur in parallel.

АРТ (рис. 9). Картина в целом выглядит примерно следующим образом: формирование резервуара ВИЧ происходит в течение 7–10 сут после заражения, при этом провирусный ландшафт достаточно разнообразен и включает дефектные провирусы. Главным фактором иммунной системы, воздействующим на процесс эволюции провирусной популяции, становится цитотоксический ответ Т-лимфоцитов (CD8⁺), устраняющих клетки, экспрессирующие чужеродные вирусные белки [10].

Быстрые эволюционные изменения, наблюдаемые в популяции ВИЧ до начала АРТ, сменяются стабилизацией и снижением вариабельности провирусов вскоре после ее назначения. В ходе лечения иммунная система непрерывно удаляет репликативно компетентные провирусы и отбирает интактные провирусы, которые находятся в состоянии «глубокой латентности», т.е. в составе гетерохроматина. Некоторые авторы [10, 19] называют этот процесс «естественным излечением» на фоне АРТ, которое, впрочем, никогда не заканчивается эрадикацией вируса. В условиях хронической ВИЧ-инфекции клетки, несущие дефектные провирусы, могут не распознаваться хозяином как чужеродные из-за неадекватной презентации главным комплексом гистосовместимости [46]. Это может служить объяснением преимущественной клональной экспансии и персистенции клеток, несущих дефектные провирусы, которые со временем занимают доминирующее положение [55].

У пациентов, в течение длительного времени получающих успешную АРТ, более 90% провирусов представлены дефектными геномами. Эти геномы вносят заметный вклад в гиперактивацию иммунной системы и истощение цитотоксических клеток, но не являются источником «возвращения» вируса в случае прекращения АРТ. Напротив, большинство интактных провирусов теоретически способны продуцировать репликативно компетентные вирусы, однако в реальности доля таких провирусов невелика, и большинство из них не удается вывести из состояния латентности путем индукции [68].

Дефектные провирусы и эрадикация ВИЧ

Главная практическая цель АРТ на сегодняшний день – неограниченно долгое поддержание неопределяемой ВН. Для большинства ЛЖВ эта цель является вполне достижимой, однако по мере приобретения опыта лечения и получения новых знаний становится понятно, что отсутствие ВН – не всегда достаточное условие восстановления здоровья, и риски коморбидных заболеваний повышены даже у самых успешных АРТ-пациентов. Новой целью исследователей закономерно стала полная эрадикация ВИЧ-инфекции либо ее функциональное излечение, и литература последних лет содержит лавинообразно увеличивающееся количество информации на эту тему.

Текущие стратегии излечения ВИЧ-инфекции сосредоточены либо на ликвидации провирусного резервуара ВИЧ, либо на перманентной инактивации латентных провирусов, либо на генно-терапевтиче-

ских подходах [1, 2]. Примерами первой группы предлагаемых подходов являются многообразные технологии «kick-and-kill», включающие активацию пула латентных провирусов с последующей интенсивной АРТ и параллельным применением терапевтической вакцины. Предполагается, что все активированные провирусы произведут вирусные частицы, которые будут уничтожены CTL-клетками, а новые раунды заражения будут предотвращены при помощи АРТ-ингибиторов. Альтернативный подход «block-and-lock» из второй группы методов основан на применении инактивирующих агентов или специально сконструированных транскрипционных репрессоров, которые надежно и стойко ингибируют транскрипцию провирусов ВИЧ, оставшиеся же в составе хромосомной ДНК геномы ВИЧ должны будут «мирно сосуществовать» со своим генным окружением, как это делают эндогенные ретровирусы. Наконец, многочисленная группа методов генной терапии основывается на всех существующих технологиях, например, CRISPR-Cas9 или нуклеазах с «цинковыми пальцами»; основная проблема здесь – сложность доставки генного инструментария во все инфицированные клетки взрослого организма.

Существование дефектных провирусов способно осложнить разработку и внедрение всех перечисленных методов, поскольку можно предположить, что все они будут иметь минимальное влияние на присутствие дефектных геномов ВИЧ. Информация о том, как регулируется транскрипция дефектных провирусных последовательностей, носит крайне ограниченный характер, и неизвестно, повлияют ли агенты реверсии латентности (latency reversing agents), используемые kick-and-kill для активации провирусов, или репрессоры транскрипции, необходимые для реализации стратегии block-and-lock, на активность внутригенных цис-транскрипционных элементов и экспрессию криптических пептидов [11, 55]. Кроме того, существует большая вероятность того, что дефектные белки не будут распознаны терапевтической вакциной [28], созданной в расчете на обычные белки вируса.

Технологии редактирования генов в зависимости от того, на какие последовательности нацелены сконструированные нуклеазы, таят в себе опасность создания дополнительных дефектных провирусов [28]. Кроме того, сообщалось, что CRISPR-Cas9 может производить негомологичное соединение концов ДНК и тем самым способствовать образованию транскрипционно активных эписомальных элементов [69].

О сложностях создания универсальных методов оценки объема резервуаров ВИЧ было написано выше, и здесь мы лишь подчеркнем, что в отсутствие таких методов оценить результат применения любого из подходов будет крайне затруднительно. Это означает, что, изучая способы воздействия на латентный резервуар ВИЧ, необходимо развивать исследования, направленные на детальное понимание способов формирования, регуляции и функциональных последствий активности дефектных провирусов.

Заключение

Наблюдения и экспериментальные работы последнего десятилетия позволили по-новому взглянуть на события, происходящие в популяции ВИЧ после установления неопределяемого уровня ВН в результате АРТ. Как стало понятно, прекращение репликации вируса – это не «конец истории», и патогенез инфекции продолжается даже в условиях длительного подавления ВН ВИЧ. Главную роль в «патофизиологии успешной АРТ» играют клетки-резервуары, содержащие провирусную ДНК ВИЧ, а среди них, как ни парадоксально, – клетки, содержащие дефектные провирусы.

Традиционное отношение к дефектным геномам ВИЧ как к побочному малозначительному продукту репликации вируса сменяется уверенностью в том, что эти провирусы могут быть биологически активны, а образуемые РНК-транскрипты и белки – служить триггерами естественного и адаптивного иммунного ответа с последующей хронической активацией иммунной системы, имеющей долгосрочные клинические последствия. Именно персистенцией таких провирусов объясняется многолетнее сохранение серопозитивности и гиперактивации у АРТ-пациентов.

В дополнение к этому, дефектные провирусы могут стать серьезным препятствием на пути к созданию средств эрадикации ВИЧ, а это означает, что без специальных усилий, направленных на элиминацию клеток, несущих дефектные провирусы, реализовать не удастся ни одну из существующих на данный момент стратегий.

Влияние дефектных геномов на клинический исход инфекции и эволюцию популяции ВИЧ можно считать доказанным. Более того, наблюдается быстрый прогресс в понимании молекулярных механизмов, которые регулируют формирование дефектных геномов ВИЧ и объясняют их противоречивую роль в персистенции вирусов. Поиск средств излечения ВИЧ-инфекции остается сложной задачей, но в случае успеха он окажется важнейшим шагом на пути к достижению «поколения, свободного от СПИДа». Исследования «дефектных» провирусов должны стать ключевыми для будущей работы в этом направлении.

ЛИТЕРАТУРА

- Бобкова М.Р. Стратегии излечения ВИЧ-инфекции: основные методологические подходы и проблемы их реализации. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2020; 12(1): 22–31. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2020-12-1-22-31> <https://elibrary.ru/gslxf>
- Бобкова М.Р. *Латентность ВИЧ*. М.: Человек; 2021.
- Grund B., Baker J.V., Deeks S.G., Wolfson J., Wentworth D., Cozzi-Lepri A., et al. Relevance of interleukin-6 and D-dimer for serious non-AIDS morbidity and death among HIV-positive adults on suppressive antiretroviral therapy. *PLoS One*. 2016; 11(5): e0155100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155100>
- Singh K., Natarajan V., Dewar R., Rupert A., Badralmaa Y., Zhai T., et al. Long-term persistence of transcriptionally active ‘defective’ HIV-1 proviruses: implications for persistent immune activation during antiretroviral therapy. *AIDS*. 2023; 37(14): 2119–30. <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000003667>
- Trickey A., May M.T., Vehreschild J., Obel N., Gill M.J., Crane H., et al. Cause-specific mortality in HIV-positive patients who survived ten years after starting antiretroviral therapy. *PLoS One*. 2016; 11(8): e0160460. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160460>
- Bandera A., Colella E., Rizzardini G., Gori A., Clerici M. Strategies to limit immune-activation in HIV patients. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2017; 15(1): 43–54. <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1250624>
- Elvstam O., Medstrand P., Jansson M., Isberg P.E., Gisslén M., Björkman P. Is low-level HIV-1 viraemia associated with elevated levels of markers of immune activation, coagulation and cardiovascular disease? *HIV Med.* 2019; 20(9): 571–80. <https://doi.org/10.1111/hiv.12756>
- Utay N.S., Hunt P.W. Role of immune activation in progression to AIDS. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2016; 11(2): 131–7. <https://doi.org/10.1097/coh.0000000000000242>
- Younas M., Psomas C., Reynes C., Cezar R., Kundura L., Portalès P., et al. Residual viremia is linked to a specific immune activation profile in HIV-1-infected adults under efficient antiretroviral therapy. *Front. Immunol.* 2021; 12: 663843. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.663843>
- Fombellida-Lopez C., Berkhout B., Darcis G., Pasternak A.O. Persistent HIV-1 transcription during ART: time to reassess its significance? *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2024; 19(3): 124–32. <https://doi.org/10.1097/coh.0000000000000849>
- Kuniholm J., Armstrong E., Bernabe B., Coote C., Berenson A., Patalano S.D., et al. Intragenic proviral elements support transcription of defective HIV-1 proviruses. *PLoS Pathog.* 2021; 17(12): e1009982. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009982>
- Marchetti G., Tincati C., Silvestri G. Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26(1): 2–18. <https://doi.org/10.1128/cmr.00050-12>
- Freeman M.L., Lederman M.M., Gianella S. Partners in Crime: The Role of CMV in immune dysregulation and clinical outcome during HIV infection. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 2016; 13(1): 10–9. <https://doi.org/10.1007/s11904-016-0297-9>
- Sherman B.T., Hu X., Singh K., Haine L., Rupert A.W., Neaton J.D., et al. Genome-wide association study of high-sensitivity C-reactive protein, D-dimer, and interleukin-6 levels in multiethnic HIV+ cohorts. *AIDS*. 2021; 35(2): 193–204. <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000002738>
- Shirley D.K., Kaner R.J., Glesby M.J. Effects of smoking on non-AIDS-related morbidity in HIV-infected patients. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 57(2): 275–82. <https://doi.org/10.1093/cid/cit207>
- Rapid Response Service. Low-level HIV viremia: Definitions, predictors, mechanisms, and clinical outcomes. Toronto, ON: The Ontario HIV Treatment Network; 2022. Available at: https://www.ohtn.on.ca/wp-content/uploads/2022/01/RR166_Low-level-viremia_version2.pdf
- Wu F., Simonetti F.R. Learning from persistent viremia: mechanisms and implications for clinical care and HIV-1 cure. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 2023; 20(6): 428–39. <https://doi.org/10.1007/s11904-023-00674-w>
- Бобкова М.Р. Низкая виремия при ВИЧ-инфекции: причины и следствия. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2024; 16(2): 7–22. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2024-16-2-7-22> <https://elibrary.ru/zlmcgr>
- Genoyer E., Lopez C.B. The impact of defective viruses on infection and immunity. *Annu. Rev. Virol.* 2019; 6(1): 547–66. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015652>
- Wang H., Cui X., Cai X., An T. Recombination in positive-strand RNA viruses. *Front. Microbiol.* 2022; 13: 870759. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.870759>
- Sanchez G., Xu X., Chermann J.C., Hirsch I. Accumulation of defective viral genomes in peripheral blood mononuclear cells of human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* 1997; 71(3): 2233–40. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.3.2233-2240.1997>
- Imamichi H., Dewar R.L., Adelsberger J.W., Rehm C.A., O’Doherty U., Paxinos E.E., et al. Defective HIV-1 proviruses produce novel protein-coding RNA species in HIV-infected patients on combination antiretroviral therapy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2016; 113(31): 8783–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609057113>
- Kilroy J.M., Leal A.A., Henderson A.J. Chronic HIV transcription, translation, and persistent inflammation. *Viruses*. 2024; 16(5): 751. <https://doi.org/10.3390/v16050751>
- Berkhout B., van Wamel J., Klaver B. Requirements for DNA strand transfer during reverse transcription in mutant HIV-1 virions. *J. Mol. Biol.* 1995; 252(1): 59–69. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.0475>
- Ho Y.C., Shan L., Hosmane N.N., Wang J., Laskey S.B., Rosenbloom D.I., et al. Replication-competent noninduced

- proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell*. 2013; 155(3): 540–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.020>
26. López CB. Defective viral genomes: critical danger signals of viral infections. *J. Virol.* 2014; 88(16): 8720–3. <https://doi.org/10.1128/jvi.00707-14>
 27. Vignuzzi M., Lopez C.B. Defective viral genomes are key drivers of the virus-host interaction. *Nat. Microbiol.* 2019; 4(7): 1075–87. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0465-y>
 28. Kuniholm J., Coote C., Henderson A.J. Defective HIV-1 genomes and their potential impact on HIV pathogenesis. *Retrovirology*. 2022; 19(1): 13. <https://doi.org/10.1186/s12977-022-00601-8>
 29. Reeves D.B., Gaebler C., Oliveira T.Y., Peluso M.J., Schiffer J.T., Cohn L.B., et al. Impact of misclassified defective proviruses on HIV reservoir measurements. *Nat. Commun.* 2023; 14(1): 4186. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39837-z>
 30. Бобкова М.Р. Клеточные белки – потенциальные мишени антиретровирусной терапии. *Вопросы вирусологии*. 2023; 68(6): 488–504. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-207> <https://elibrary.ru/klgwak>
 31. Hadpech S., Moonmuang S., Chupradit K., Yasamut U., Tayapiwatana C. Updating on roles of HIV intrinsic factors: a review of their antiviral mechanisms and emerging functions. *Intervirology*. 2022; 65(2): 67–79. <https://doi.org/10.1159/000519241>
 32. Ramdas P., Sahu A.K., Mishra T., Bhardwaj V., Chande A. From entry to egress: strategic exploitation of the cellular processes by HIV-1. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 559792. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.559792>
 33. Nchioua R., Bosso M., Kmiec D., Kirchhoff F. Cellular factors targeting HIV-1 transcription and viral RNA transcripts. *Viruses*. 2020; 12(5): 495. <https://doi.org/10.3390/v12050495>
 34. Ghimire D., Rai M., Gaur R. Novel host restriction factors implicated in HIV-1 replication. *J. Gen. Virol.* 2018; 99(4): 435–46. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001026>
 35. Colomer-Lluch M., Ruiz A., Moris A., Prado J.G. Restriction factors: from intrinsic viral restriction to shaping cellular immunity against HIV-1. *Front. Immunol.* 2018; 9: 2876. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02876>
 36. Schaller T., Herold N. The early bird catches the worm – can evolution teach us lessons in fighting HIV? *Curr. HIV Res.* 2016; 14(3): 183–210. <https://doi.org/10.2174/1570162x14999160224094914>
 37. Bedwell G.J., Engelman A.N. Factors that mold the nuclear landscape of HIV-1 integration. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49(2): 621–35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1207>
 38. Craigie R., Bushman F.D. HIV DNA integration. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012; 2(7): a006890. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006890>
 39. Rodgers K., McVey M. Error-prone repair of DNA double-strand breaks. *J. Cell. Physiol.* 2016; 231(1): 15–24. <https://doi.org/10.1002/jcp.25053>
 40. Wiegand A., Spindler J., Hong F.F., Shao W., Cyktor J.C., Cillo A.R., et al. Single-cell analysis of HIV-1 transcriptional activity reveals expression of proviruses in expanded clones during ART. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2017; 114(18): E3659–68. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617961114>
 41. Dutilleul A., Rodari A., Van Lint C. Depicting HIV-1 transcriptional mechanisms: a summary of what we know. *Viruses*. 2020; 12(12): 1385. <https://doi.org/10.3390/v12121385>
 42. Ding P., Kharytonchik S., Waller A., Mbaekwe U., Basappa S., Kuo N., et al. Identification of the initial nucleocapsid recognition element in the HIV-1 RNA packaging signal. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2020; 117(30): 17737–46. <https://doi.org/10.1073/pnas.2008519117>
 43. Ishizaka A., Sato H., Nakamura H., Koga M., Kikuchi T., Hosoya N., et al. Short intracellular HIV-1 transcripts as biomarkers of residual immune activation in patients on antiretroviral therapy. *J. Virol.* 2016; 90(12): 5665–76. <https://doi.org/10.1128/jvi.03158-15>
 44. Sertznig H., Hillebrand F., Erkelenz S., Schaal H., Widera M. Behind the scenes of HIV-1 replication: Alternative splicing as the dependency factor on the quiet. *Virology*. 2018; 516: 176–88. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.01.011>
 45. Mancarella A., Procopio F.A., Achsel T., De Crignis E., Foley B.T., Corradin G., et al. Detection of antisense protein (ASP) RNA transcripts in individuals infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *J. Gen. Virol.* 2019; 100(5): 863–76. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001244>
 46. Imamichi H., Smith M., Adelsberger J.W., Izumi T., Scrimieri F., Sherman B.T., et al. Defective HIV-1 proviruses produce viral proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2020; 117(7): 3704–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1917876117>
 47. Vanhee-Brossollet C., Thoreau H., Serpente N., D'Auriol L., Levy J.P., Vaquero C. A natural antisense RNA derived from the HIV-1 env gene encodes a protein which is recognized by circulating antibodies of HIV+ individuals. *Virology*. 1995; 206(1): 196–202. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(95\)80034-4](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(95)80034-4)
 48. Pollack R.A., Jones R.B., Perlea M., Bruner K.M., Martin A.R., Thomas A.S., et al. Defective HIV-1 proviruses are expressed and can be recognized by cytotoxic T lymphocytes, which shape the proviral landscape. *Cell Host Microbe*. 2017; 21(4): 494–506.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.008>
 49. Decout A., Katz J.D., Venkatraman S., Ablasser A. The cGAS-STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol.* 2021; 21(9): 548–69. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00524-z>
 50. Unterholzner L., Keating S.E., Baran M., Horan K.A., Jensen S.B., Sharma S., et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat. Immunol.* 2010; 11(11): 997–1004. <https://doi.org/10.1038/ni.1932>
 51. Wu B., Hur S. How RIG-I like receptors activate MAVS. *Curr. Opin. Virol.* 2015; 12: 91–8. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.04.004>
 52. Ferdin J., Goričar K., Dolžan V., Plemenitaš A., Martin J.N., Peterlin B.M., et al. Viral protein Nef is detected in plasma of half of HIV-infected adults with undetectable plasma HIV RNA. *PLoS One*. 2018; 13(1): e0191613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191613>
 53. Fenwick C., Joo V., Jacquier P., Noto A., Banga R., Perreau M., et al. T-cell exhaustion in HIV infection. *Immunol. Rev.* 2019; 292(1): 149–63. <https://doi.org/10.1111/immr.12823>
 54. Verdon D.J., Mulazzani M., Jenkins M.R. Cellular and molecular mechanisms of CD8(+) T cell differentiation, dysfunction and exhaustion. *Int. J. Mol. Sci.* 2020; 21(19): 7357. <https://doi.org/10.3390/ijms21197357>
 55. Lichterfeld M., Gao C., Yu X.G. An ordeal that does not heal: understanding barriers to a cure for HIV-1 infection. *Trends Immunol.* 2022; 43(8): 608–16. <https://doi.org/10.1016/j.it.2022.06.002>
 56. Roux H., Chomont N. Measuring human immunodeficiency virus reservoirs: do we need to choose between quantity and quality? *J. Infect. Dis.* 2024; 229(3): 635–43. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiad381>
 57. Halvas E.K., Joseph K.W., Brandt L.D., Guo S., Sobolewski M.D., Jacobs J.L., et al. HIV-1 viremia not suppressible by antiretroviral therapy can originate from large T cell clones producing infectious virus. *J. Clin. Invest.* 2020; 130(11): 5847–57. <https://doi.org/10.1172/jci138099>
 58. Virgilio M.C., Collins K.L. The impact of cellular proliferation on the HIV-1 reservoir. *Viruses*. 2020; 12(2): 127. <https://doi.org/10.3390/v12020127>
 59. White J.A., Wu F., Yasin S., Moskovljevic M., Varriale J., Dragoni F., et al. Clonally expanded HIV-1 proviruses with 5'-leader defects can give rise to nonsuppressible residual viremia. *J. Clin. Invest.* 2023; 133(6): e165245. <https://doi.org/10.1172/jci165245>
 60. Bui J.K., Sobolewski M.D., Keele B.F., Spindler J., Musick A., Wiegand A., et al. Proviruses with identical sequences comprise a large fraction of the replication-competent HIV reservoir. *PLoS Pathog.* 2017; 13(3): e1006283. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006283>
 61. Maldarelli F., Wu X., Su L., Simonetti F.R., Shao W., Hill S., et al. HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science*. 2014; 345(6193): 179–83. <https://doi.org/10.1126/science.1254194>
 62. Linden N., Jones R.B. Potential multi-modal effects of provirus integration on HIV-1 persistence: lessons from other viruses. *Trends Immunol.* 2022; 43(8): 617–29. <https://doi.org/10.1016/j.it.2022.06.001>
 63. Mohammadi A., Etemad B., Zhang X., Li Y., Bedwell G.J., Sharaf R., et al. Viral and host mediators of non-suppressible HIV-1 viremia. *Nat. Med.* 2023; 29(12): 3212–23. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02611-1>
 64. Crespo-Bermejo C., de Arellano E.R., Lara-Aguilar V., Valle-Millares D., Gomez-Lus M.L., Madrid R., et al. Persistent low-level viremia in persons living with HIV undertreatment: An unresolved status. *Virulence*. 2021; 12(1): 2919–31. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2004743>
 65. Sannier G., Dubé M., Dufour C., Richard C., Brassard N., Delgado G.G., et al. Combined single-cell transcriptional, translational, and genomic profiling reveals HIV-1 reservoir diversity. *Cell Rep.* 2021; 36(9): 109643. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109643>
 66. Brodin J., Zanini F., Thebo L., Lanz C., Bratt G., Neher R.A., et al. Establishment and stability of the latent HIV-1 DNA reservoir. *Elife*. 2016; 5: e18889. <https://doi.org/10.7554/elifel18889>
 67. Lian X., Gao C., Sun X., Jiang C., Einkauf K.B., Seiger K.W., et al. Signatures of immune selection in intact and defective proviruses

distinguish HIV-1 elite controllers. *Sci. Transl. Med.* 2021; 13(624): eabl4097. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abl4097>

68. Abrahams M.R., Joseph S.B., Garrett N., Tyers L., Moeser M., Archin N., et al. The replication-competent HIV-1 latent reservoir is primarily established near the time of therapy initiation. *Sci. Transl. Med.* 2019; 11(513): eaaw5589. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw5589>

69. Lai M., Maori E., Quaranta P., Matteoli G., Maggi F., Sgarbanti M., et al. CRISPR/Cas9 ablation of integrated HIV-1 accumulates proviral DNA circles with reformed long terminal repeats. *J. Virol.* 2021; 95(23): e0135821. <https://doi.org/10.1128/jvi.01358-21>

REFERENCES

1. Bobkova M.R. HIV infection cure strategies: basic methodological approaches and difficulties of their implementation. *VICH-infektsiya i immunosupressii.* 2020; 12(1): 22–31. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2020-12-1-22-31> <https://elibrary.ru/gsl1xf> (in Russian)

2. Bobkova M.R. *HIV Latency [Latentnost' VICH]*. Moscow: Chelovek; 2021. (in Russian)

3. Grund B., Baker J.V., Deeks S.G., Wolfson J., Wentworth D., Cozzi-Lepri A., et al. Relevance of interleukin-6 and D-dimer for serious non-AIDS morbidity and death among HIV-positive adults on suppressive antiretroviral therapy. *PLoS One.* 2016; 11(5): e0155100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155100>

4. Singh K., Natarajan V., Dewar R., Rupert A., Badralmaa Y., Zhai T., et al. Long-term persistence of transcriptionally active 'defective' HIV-1 proviruses: implications for persistent immune activation during antiretroviral therapy. *AIDS.* 2023; 37(14): 2119–30. <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000003667>

5. Trickey A., May M.T., Vehreschild J., Obel N., Gill M.J., Crane H., et al. Cause-specific mortality in HIV-positive patients who survived ten years after starting antiretroviral therapy. *PLoS One.* 2016; 11(8): e0160460. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160460>

6. Bandera A., Colella E., Rizzardini G., Gori A., Clerici M. Strategies to limit immune-activation in HIV patients. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2017; 15(1): 43–54. <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1250624>

7. Elvstam O., Medstrand P., Jansson M., Isberg P.E., Gisslén M., Björkman P. Is low-level HIV-1 viraemia associated with elevated levels of markers of immune activation, coagulation and cardiovascular disease? *HIV Med.* 2019; 20(9): 571–80. <https://doi.org/10.1111/hiv.12756>

8. Utay N.S., Hunt P.W. Role of immune activation in progression to AIDS. *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2016; 11(2): 131–7. <https://doi.org/10.1097/coh.0000000000000242>

9. Younas M., Psomas C., Reynes C., Cezar R., Kundura L., Portalès P., et al. Residual viremia is linked to a specific immune activation profile in HIV-1-infected adults under efficient antiretroviral therapy. *Front. Immunol.* 2021; 12: 663843. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.663843>

10. Fombellida-Lopez C., Berkhout B., Darcis G., Pasternak A.O. Persistent HIV-1 transcription during ART: time to reassess its significance? *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2024; 19(3): 124–32. <https://doi.org/10.1097/coh.0000000000000849>

11. Kuniholm J., Armstrong E., Bernabe B., Coote C., Berenson A., Patalano S.D., et al. Intragenic proviral elements support transcription of defective HIV-1 proviruses. *PLoS Pathog.* 2021; 17(12): e1009982. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009982>

12. Marchetti G., Tincati C., Silvestri G. Microbial translocation in the pathogenesis of HIV infection and AIDS. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26(1): 2–18. <https://doi.org/10.1128/cmr.00050-12>

13. Freeman M.L., Lederman M.M., Gianella S. Partners in Crime: The Role of CMV in immune dysregulation and clinical outcome during HIV infection. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 2016; 13(1): 10–9. <https://doi.org/10.1007/s11904-016-0297-9>

14. Sherman B.T., Hu X., Singh K., Haine L., Rupert A.W., Neaton J.D., et al. Genome-wide association study of high-sensitivity C-reactive protein, D-dimer, and interleukin-6 levels in multiethnic HIV+ cohorts. *AIDS.* 2021; 35(2): 193–204. <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000002738>

15. Shirley D.K., Kaner R.J., Glesby M.J. Effects of smoking on non-AIDS-related morbidity in HIV-infected patients. *Clin. Infect. Dis.* 2013; 57(2): 275–82. <https://doi.org/10.1093/cid/cit207>

16. Rapid Response Service. Low-level HIV viremia: Definitions, predictors, mechanisms, and clinical outcomes. Toronto, ON: The Ontario HIV Treatment Network; 2022. Available at: https://www.ohrn.on.ca/wp-content/uploads/2022/01/RR166_Low-level-viremia_version2.pdf

17. Wu F., Simonetti F.R. Learning from persistent viremia: mechanisms and implications for clinical care and HIV-1 cure. *Curr. HIV/AIDS Rep.* 2023; 20(6): 428–39. <https://doi.org/10.1007/s11904-023-00674-w>

18. Bobkova M.R. Low-level viremia in HIV infection: causes and consequences. *VICH-infektsiya i immunosupressii.* 2024; 16(2): 7–22. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2024-16-2-7-22> <https://elibrary.ru/zlmcgr> (in Russian)

19. Genoyer E., Lopez C.B. The impact of defective viruses on infection and immunity. *Annu. Rev. Virol.* 2019; 6(1): 547–66. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015652>

20. Wang H., Cui X., Cai X., An T. Recombination in positive-strand RNA viruses. *Front. Microbiol.* 2022; 13: 870759. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.870759>

21. Sanchez G., Xu X., Chermann J.C., Hirsch I. Accumulation of defective viral genomes in peripheral blood mononuclear cells of human immunodeficiency virus type 1-infected individuals. *J. Virol.* 1997; 71(3): 2233–40. <https://doi.org/10.1128/jvi.71.3.2233-2240.1997>

22. Imamichi H., Dewar R.L., Adelsberger J.W., Rehm C.A., O'Doherty U., Paxinos E.E., et al. Defective HIV-1 proviruses produce novel protein-coding RNA species in HIV-infected patients on combination antiretroviral therapy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2016; 113(31): 8783–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.1609057113>

23. Kilroy J.M., Leal A.A., Henderson A.J. Chronic HIV transcription, translation, and persistent inflammation. *Viruses.* 2024; 16(5): 751. <https://doi.org/10.3390/v16050751>

24. Berkhout B., van Wamel J., Klaver B. Requirements for DNA strand transfer during reverse transcription in mutant HIV-1 virions. *J. Mol. Biol.* 1995; 252(1): 59–69. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.0475>

25. Ho Y.C., Shan L., Hosmane N.N., Wang J., Laskey S.B., Rosenbloom D.I., et al. Replication-competent noninduced proviruses in the latent reservoir increase barrier to HIV-1 cure. *Cell.* 2013; 155(3): 540–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.09.020>

26. López CB. Defective viral genomes: critical danger signals of viral infections. *J. Virol.* 2014; 88(16): 8720–3. <https://doi.org/10.1128/jvi.00707-14>

27. Vignuzzi M., Lopez C.B. Defective viral genomes are key drivers of the virus-host interaction. *Nat. Microbiol.* 2019; 4(7): 1075–87. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0465-y>

28. Kuniholm J., Coote C., Henderson A.J. Defective HIV-1 genomes and their potential impact on HIV pathogenesis. *Retrovirology.* 2022; 19(1): 13. <https://doi.org/10.1186/s12977-022-00601-8>

29. Reeves D.B., Gaebler C., Oliveira T.Y., Peluso M.J., Schiffer J.T., Cohn L.B., et al. Impact of misclassified defective proviruses on HIV reservoir measurements. *Nat. Commun.* 2023; 14(1): 4186. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39837-z>

30. Bobkova M.R. Cellular proteins as potential targets for antiretroviral therapy. *Voprosy virusologii.* 2023; 68(6): 488–504. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-207> <https://elibrary.ru/klgwak> (in Russian)

31. Hadjeh S., Moonmuang S., Chupradit K., Yasamut U., Tayapiwatana C. Updating on roles of HIV intrinsic factors: a review of their antiviral mechanisms and emerging functions. *Intervirology.* 2022; 65(2): 67–79. <https://doi.org/10.1159/000519241>

32. Ramdas P., Sahu A.K., Mishra T., Bhardwaj V., Chande A. From entry to egress: strategic exploitation of the cellular processes by HIV-1. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 559792. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.559792>

33. Nchioua R., Bosso M., Kmiec D., Kirchhoff F. Cellular factors targeting HIV-1 transcription and viral RNA transcripts. *Viruses.* 2020; 12(5): 495. <https://doi.org/10.3390/v12050495>

34. Ghimire D., Rai M., Gaur R. Novel host restriction factors implicated in HIV-1 replication. *J. Gen. Virol.* 2018; 99(4): 435–46. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001026>

35. Colomer-Lluch M., Ruiz A., Moris A., Prado J.G. Restriction factors: from intrinsic viral restriction to shaping cellular immunity against HIV-1. *Front. Immunol.* 2018; 9: 2876. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02876>

36. Schaller T., Herold N. The early bird catches the worm – can evolution teach us lessons in fighting HIV? *Curr. HIV Res.* 2016; 14(3): 183–210. <https://doi.org/10.2174/1570162x14999160224094914>

37. Bedwell G.J., Engelman A.N. Factors that mold the nuclear landscape of HIV-1 integration. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49(2): 621–35. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1207>


38. Craigie R., Bushman F.D. HIV DNA integration. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012; 2(7): a006890. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006890>

39. Rodgers K., McVey M. Error-prone repair of DNA double-strand breaks. *J. Cell. Physiol.* 2016; 231(1): 15–24. <https://doi.org/10.1002/jcp.25053>

REVIEWS

40. Wiegand A., Spindler J., Hong F.F., Shao W., Cyktor J.C., Cillo A.R., et al. Single-cell analysis of HIV-1 transcriptional activity reveals expression of proviruses in expanded clones during ART. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2017; 114(18): E3659–68. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617961114>
41. Dutilleul A., Rodari A., Van Lint C. Depicting HIV-1 transcriptional mechanisms: a summary of what we know. *Viruses*. 2020; 12(12): 1385. <https://doi.org/10.3390/v12121385>
42. Ding P., Kharytonchik S., Waller A., Mbaekwe U., Basappa S., Kuo N., et al. Identification of the initial nucleocapsid recognition element in the HIV-1 RNA packaging signal. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2020; 117(30): 17737–46. <https://doi.org/10.1073/pnas.2008519117>
43. Ishizaka A., Sato H., Nakamura H., Koga M., Kikuchi T., Hosoya N., et al. Short intracellular HIV-1 transcripts as biomarkers of residual immune activation in patients on antiretroviral therapy. *J. Virol*. 2016; 90(12): 5665–76. <https://doi.org/10.1128/jvi.03158-15>
44. Sertznig H., Hillebrand F., Erkelenz S., Schaal H., Widera M. Behind the scenes of HIV-1 replication: Alternative splicing as the dependency factor on the quiet. *Virology*. 2018; 516: 176–88. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.01.011>
45. Mancarella A., Procopio F.A., Achsel T., De Crignis E., Foley B.T., Corradin G., et al. Detection of antisense protein (ASP) RNA transcripts in individuals infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *J. Gen. Virol*. 2019; 100(5): 863–76. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001244>
46. Imamichi H., Smith M., Adelsberger J.W., Izumi T., Scrimieri F., Sherman B.T., et al. Defective HIV-1 proviruses produce viral proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2020; 117(7): 3704–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1917876117>
47. Vanhee-Brossollet C., Thoreau H., Serpente N., D'Auriol L., Levy J.P., Vaquero C. A natural antisense RNA derived from the HIV-1 env gene encodes a protein which is recognized by circulating antibodies of HIV+ individuals. *Virology*. 1995; 206(1): 196–202. [https://doi.org/10.1016/s0042-6822\(95\)80034-4](https://doi.org/10.1016/s0042-6822(95)80034-4)
48. Pollack R.A., Jones R.B., Perteau M., Bruner K.M., Martin A.R., Thomas A.S., et al. Defective HIV-1 proviruses are expressed and can be recognized by cytotoxic T lymphocytes, which shape the proviral landscape. *Cell Host Microbe*. 2017; 21(4): 494–506.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.03.008>
49. Decout A., Katz J.D., Venkatraman S., Ablasser A. The cGAS-STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Nat. Rev. Immunol*. 2021; 21(9): 548–69. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00524-z>
50. Unterholzner L., Keating S.E., Baran M., Horan K.A., Jensen S.B., Sharma S., et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA. *Nat. Immunol*. 2010; 11(11): 997–1004. <https://doi.org/10.1038/ni.1932>
51. Wu B., Hur S. How RIG-I like receptors activate MAVS. *Curr. Opin. Virol*. 2015; 12: 91–8. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.04.004>
52. Ferdin J., Goričar K., Dolžan V., Plemenitaš A., Martin J.N., Peterlin B.M., et al. Viral protein Nef is detected in plasma of half of HIV-infected adults with undetectable plasma HIV RNA. *PLoS One*. 2018; 13(1): e0191613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191613>
53. Fenwick C., Joo V., Jacquier P., Noto A., Banga R., Perreau M., et al. T-cell exhaustion in HIV infection. *Immunol. Rev*. 2019; 292(1): 149–63. <https://doi.org/10.1111/imr.12823>
54. Verdon D.J., Mulazzani M., Jenkins M.R. Cellular and molecular mechanisms of CD8(+) T cell differentiation, dysfunction and exhaustion. *Int. J. Mol. Sci*. 2020; 21(19): 7357. <https://doi.org/10.3390/ijms21197357>
55. Lichterfeld M., Gao C., Yu X.G. An ordeal that does not heal: understanding barriers to a cure for HIV-1 infection. *Trends Immunol*. 2022; 43(8): 608–16. <https://doi.org/10.1016/j.it.2022.06.002>
56. Roux H., Chomont N. Measuring human immunodeficiency virus reservoirs: do we need to choose between quantity and quality? *J. Infect. Dis*. 2024; 229(3): 635–43. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiad381>
57. Halvas E.K., Joseph K.W., Brandt L.D., Guo S., Sobolewski M.D., Jacobs J.L., et al. HIV-1 viremia not suppressible by antiretroviral therapy can originate from large T cell clones producing infectious virus. *J. Clin. Invest*. 2020; 130(11): 5847–57. <https://doi.org/10.1172/jci138099>
58. Virgilio M.C., Collins K.L. The impact of cellular proliferation on the HIV-1 reservoir. *Viruses*. 2020; 12(2): 127. <https://doi.org/10.3390/v12020127>
59. White J.A., Wu F., Yasin S., Moskovljevic M., Varriale J., Dragoni F., et al. Clonally expanded HIV-1 proviruses with 5'-leader defects can give rise to nonsuppressible residual viremia. *J. Clin. Invest*. 2023; 133(6): e165245. <https://doi.org/10.1172/jci165245>
60. Bui J.K., Sobolewski M.D., Keele B.F., Spindler J., Musick A., Wiegand A., et al. Proviruses with identical sequences comprise a large fraction of the replication-competent HIV reservoir. *PLoS Pathog*. 2017; 13(3): e1006283. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006283>
61. Maldarelli F., Wu X., Su L., Simonetti F.R., Shao W., Hill S., et al. HIV latency. Specific HIV integration sites are linked to clonal expansion and persistence of infected cells. *Science*. 2014; 345(6193): 179–83. <https://doi.org/10.1126/science.1254194>
62. Linden N., Jones R.B. Potential multi-modal effects of provirus integration on HIV-1 persistence: lessons from other viruses. *Trends Immunol*. 2022; 43(8): 617–29. <https://doi.org/10.1016/j.it.2022.06.001>
63. Mohammadi A., Etemad B., Zhang X., Li Y., Bedwell G.J., Sharaf R., et al. Viral and host mediators of non-suppressible HIV-1 viremia. *Nat. Med*. 2023; 29(12): 3212–23. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02611-1>
64. Crespo-Bermejo C., de Arellano E.R., Lara-Aguilar V., Valle-Millares D., Gomez-Lus M.L., Madrid R., et al. Persistent low-Level viremia in persons living with HIV undertreatment: An unresolved status. *Virulence*. 2021; 12(1): 2919–31. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.2004743>
65. Sannier G., Dubé M., Dufour C., Richard C., Brassard N., Delgado G.G., et al. Combined single-cell transcriptional, translational, and genomic profiling reveals HIV-1 reservoir diversity. *Cell Rep*. 2021; 36(9): 109643. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109643>
66. Brodin J., Zanini F., Thebo L., Lanz C., Bratt G., Neher R.A., et al. Establishment and stability of the latent HIV-1 DNA reservoir. *Elife*. 2016; 5: e18889. <https://doi.org/10.7554/elifesc18889>
67. Lian X., Gao C., Sun X., Jiang C., Einkauf K.B., Seiger K.W., et al. Signatures of immune selection in intact and defective proviruses distinguish HIV-1 elite controllers. *Sci. Transl. Med*. 2021; 13(624): eab14097. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abl4097>
68. Abrahams M.R., Joseph S.B., Garrett N., Tyers L., Moeser M., Archin B., et al. The replication-competent HIV-1 latent reservoir is primarily established near the time of therapy initiation. *Sci. Transl. Med*. 2019; 11(513): eaaw5589. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw5589>
69. Lai M., Maori E., Quaranta P., Matteoli G., Maggi F., Sgarbanti M., et al. CRISPR/Cas9 ablation of integrated HIV-1 accumulates proviral DNA circles with reformed long terminal repeats. *J. Virol*. 2021; 95(23): e0135821. <https://doi.org/10.1128/jvi.01358-21>

Информация об авторе:


Бобкова Марина Ридовна  – д-р биол. наук, главный специалист лаборатории биологии лентивирусов ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия. E-mail: mrbobkova@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5481-8957>

Участие автора: Бобкова М.Р. – разработка концепции, создание рисунков, написание и научное редактирование обзора.

Все рисунки выполнены автором с применением программы BioRender (BioRender.com).

Поступила 29.08.2024
Принята в печать 10.10.2024
Опубликована 31.10.2024

Information about the author:

Marina R. Bobkova  – D.Sci. (Biol.), Chief Researcher of the laboratory of biology of lentiviruses, Federal State Budgetary Research Institution I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia. E-mail: mrbobkova@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5481-8957>.

Contribution: Marina R. Bobkova – concept development, creation of drawings, writing and scientific editing of the review.

All drawings were made by the author using the BioRender program (BioRender.com).

Received 29 August 2024
Accepted 10 October 2024
Published 31 October 2024

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-267>

© ОХЛОПКОВА О.В., КОНОНОВА Ю.В., ТЮМЕНЦЕВА М.А., ТЮМЕНЦЕВ А.И., ШЕСТОПАЛОВ А.М., АКИМКИН В.Г., 2024



Гладконосые летучие мыши (семейство Vespertilionidae) как возможный резервуар лисса- и коронавируса в Западной Сибири и на юге европейской части России

Охлопкова О.В.^{1,2}✉, Кононова Ю.В.², Тюменцева М.А.¹, Тюменцев А.И.¹, Шестопалов А.М.², Акимкин В.Г.¹

¹ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Россия;

²Научно-исследовательский институт вирусологии ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», 630060, г. Новосибирск, Россия

Резюме

В обзоре приведены современные данные относительно хироптерофауны, обитающей в Западной Сибири и на юге европейской части России. Дана общая характеристика рода лиссавирусов и семейства коронавирусов. Рассмотрен потенциал вирусоносительства в отношении лисса- и коронавирусов в популяциях рукокрылых двух географически отдаленных регионов.

Ключевые слова: отряд рукокрылых (*Chiroptera*); семейство *Vespertilionidae*; лиссавирусы; коронавирусы; эпидемиологические риски; Сибирь; юг европейской части России

Для цитирования: Охлопкова О.В., Кононова Ю.В., Тюменцева М.А., Тюменцев А.И., Шестопалов А.М., Акимкин В.Г. Гладконосые летучие мыши (семейство *Vespertilionidae*) как возможный резервуар лисса- и коронавирусов в Западной Сибири и на юге европейской части России. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(5): 415–428. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-267> EDN: <https://elibrary.ru/vpenkk>

Благодарность. Коллектив авторов выражает признательность за помощь в подготовке материалов для обзора И.В. Попову (Донской государственный технический университет, г. Ростов-на-Дону), А.А. Маслову (Институт систематики и экологии животных, г. Новосибирск), Ю.Н. Давидюку (Казанский федеральный университет, г. Казань) и А.Д. Мошкину (НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ, г. Новосибирск).

Источник финансирования. Обзор подготовлен в рамках исследований по изучению и определению генетического разнообразия вирусов из семейств хантавирусов, коронавирусов, рабдовирусов и филловирусов, циркулирующих в популяциях рукокрылых, обитающих в Новосибирской и Ростовской областях, поддержанных грантом РНФ № 23-24-00276.

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

REVIEW

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-267>

Plain-nosed bats (family Vespertilionidae) as a possible reservoir of lyssaviruses and coronaviruses in Western Siberia and the south of European Russia

Olesia V. Ohlopkova^{1,2}✉, Yulia V. Kononova², Marina A. Tyumentseva¹, Alexander I. Tyumentsev¹, Alexander M. Shestopalov², Vasily G. Akimkin¹

¹Central Research Institute of Epidemiology, Rosпотребнадзор, 111123, Moscow, Russia;

²Virology Research Institute of the Federal Research Center for Fundamental and Translational Medicine, 630060, Novosibirsk, Russia

Abstract

The review presents current data on the chiropteroфауна inhabiting Western Siberia and the south of the European part of Russia. A general description of the genus of lyssaviruses and the family of coronaviruses is given. The potential for virus carriage in relation to lyssaviruses and coronaviruses in bat populations of two geographically distant regions is considered.

Keywords: *Chiroptera*; *Vespertilionidae*; *lyssaviruses*; *coronaviruses*; *epidemiological risks*; *Siberia*; *south of the European part of Russia*

For citation: Ohlopkova O.V., Kononova Yu.V., Tyumentseva M.A., Tyumentsev A.I., Shestopalov A.M., Akimkin V.G. Plain-nosed bats (family Vespertilionidae) as a possible reservoir of lyssaviruses and coronaviruses in Western Siberia and the south of European Russia *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(5): 415–428. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-267> EDN: <https://elibrary.ru/vpenkk>

Funding. The review was prepared as part of research to study and determine the genetic diversity of viruses from the hantavirus, coronavirus, rhabdovirus and filovirus families circulating in bat populations living in the Novosibirsk and Rostov regions, supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-24-00276.

Acknowledgement. The authors express their gratitude for assistance in preparing the materials for the review to I.V. Popov (Don State Technical University, Rostov-on-Don), A.A. Maslov (Institute of Animal Taxonomy and Ecology, Novosibirsk), Yu.N. Davidiuk (Kazan Federal University, Kazan) and A.D. Moshkin (Research Institute of Virology, Federal Research Center for Physics and Microbiology, Novosibirsk).

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Введение

Возникающие время от времени вспышки инфекционных заболеваний, вызываемых вирусами, обуславливают необходимость исследований, направленных на поиск очагов таких заболеваний и оценку опасности появления новых вирусных эпидемий. Так, изучение вируса SARS-CoV-2 – возбудителя COVID-19 – и путей его передачи человеку выявило важную роль летучих мышей как природных резервуаров потенциально опасных вирусов. Помимо этого, летучие мыши являются источником многих видов лисса-вирусов, масштабы распространения, которых, высокая патогенность и практически абсолютная летальность определяют их актуальность и первостепенную значимость для изучения.

В представленном обзоре литературы основное внимание сосредоточено на фауне рукокрылых и потенциале вирусносительства у некоторых представителей этого отряда в Западной Сибири и на юге европейской части России. Эти географические районы представляют особый интерес для изучения циркуляции лисса- и коронавирусов по нескольким причинам. Во-первых, оба региона отличаются значительным биоразнообразием и наличием различных экосистем и биотопов. Во-вторых, географическое отдаление этих территорий дает возможность провести сравнительный анализ вирусов, циркулирующих в разных климатических и экологических условиях. Также отдельно следует упомянуть о близости Сибирского федерального округа к Китаю, где в силу различных причин могут возникать очаги новых вирусных инфекций. В-третьих, анализируемые регионы характеризуются высокой плотностью населения и активной антропогенной деятельностью, что создает условия для взаимодействия между людьми и дикими животными и потенциально увеличивает риск межвидовой передачи вирусов.

В настоящее время у представителей отряда рукокрылых (Chiroptera) изолированы или выявлены молекулярно-генетическими методами РНК- и ДНК-содержащие вирусы позвоночных, относящиеся к 35 семействам [1]. У видов рукокрылых частота встречаемости вирусных РНК/ДНК в организмах животных различается и зависит как от вируса и его хозяина (переносчика), так и географического распространения [1, 2]. Большая часть идентифицированных у рукокрылых вирусов не связана с забо-

леваниями людей, вместе с тем для этих животных установлены носительство и передача вирусов, патогенных для человека (вирус бешенства, вирус Нипах, вирус Марбург и др.). В частности, в России доказано 4 летальных случая лиссавирусной инфекции в период 1977–2007 гг. после контакта с гладконосыми летучими мышами (г. Луганск – 2 случая; Белгородская область – 1 случай; Приморский край – 1 случай) и 3 новых случая в период 2019–2021 гг. на территориях Дальнего Востока [3]. Таким образом, при оценке эпидемиологической значимости рукокрылых следует учитывать совокупность факторов: видовое разнообразие, численность, экологические условия и поведение, ассоциации с известными вирусами.

Согласно информации, приведенной в международной базе данных Higher Taxonomy (<https://www.mammaldiversity.org/taxa.html>), в настоящее время на территории России зарегистрированы 52 вида рукокрылых. Семейство гладконосых (Vespertilionidae) составляет большую часть хироптерофауны России и включает 18 видов ночниц (*Myotis*), по 5 видов ушанов (*Plecotus*) и нетопырей (*Pipistrellus*), по 4 вида вечерниц (*Nyctalus*) и кожанов (*Eptesicus*), 3 вида широкоушек (*Barbastella*) и по 2 вида кожановидных нетопырей (*Hypsugo*), трубконосов (*Murina*) и двухцветных кожанов (*Vespertilio*). Гладконосые летучие мыши встречаются на всей территории России – от отдельных районов тундры на севере [4] до субтропических районов на юге [5], от балтийского побережья на западе [6] и до Дальнего Востока [7–9]. Вышеперечисленное обуславливает значительный исследовательский интерес именно к этому семейству летучих мышей как к наиболее активно контактирующему с человеческой популяцией посредством селения вблизи человеческих жилищ, зимовки на чердаках и в подвалах.

Рукокрылые других семейств представлены 4 видами подковоносов (*Rhinolophus*), 2 видами длиннокрылов (*Miniopterus*) и 1 видом складчатогубов (*Tadarida*). Представители 4 видов подковоносов, обыкновенный длиннокрыл (*M. schreibersii*) и широкоухий складчатогуб (*T. teniotis*) встречаются в некоторых районах юга Европейской части России – на Кавказе и Причерноморье [5, 10], ареал восточного длиннокрыла (*M. fuliginosus*) в России ограничен югом Приморского края [7].

Видовое разнообразие отряда Chiroptera зависит от совокупности факторов, основными из которых яв-

ляются наличие благоприятных экологических условий и доступность кормовой базы. Вследствие этого наибольшее число видов характерно для экваториальных, тропических и субтропических широт, с постепенным снижением к северу в Северном полушарии и к югу в Южном [11]. Ростовская и Новосибирская области, исследуемые как территории риска в представленном анализе научной литературы, располагаются в пределах умеренного климатического пояса Северной Евразии, но существенно отличаются между собой по средним годовым температурам, ландшафтному разнообразию и степени антропогенной трансформации естественных биоценозов. Изучение вирусов рукокрылых, циркулирующих в этих двух удаленных друг от друга регионах, может дать представление о характере генетического разнообразия и предположительных границах распространения отдельных видов или генетических вариантов вирусов. Хироптерофауна и вирусы рукокрылых именно этих регионов совместно формируют единый виромный ландшафт, представленный на Евразийском континенте, в котором значительное место занимают вирусы, циркулирующие среди представителей семейства гладконосых летучих мышей.

Целью настоящей работы является сравнительный анализ потенциала вирусносительства в отношении лисса- и коронавирусов в популяциях гладконосых летучих мышей двух отдаленных регионов Российской Федерации. Полученная информация о взаимосвязи фауны рукокрылых и видовой восприимчивости к потенциально опасным для человека вирусам может быть использована для прогнозирования эпидемиологических рисков в системе мониторинга некоторых ассоциированных с рукокрылыми вирусных инфекций.

Характеристика лиссавирусов и коронавирусов, циркулирующих среди представителей семейства Vespertilionidae

Лиссавирусы (Rhabdoviridae: Lyssavirus). Лиссавирусы являются одним из 13 родов семейства рабдовирусов. Геном лиссавирусов представлен одноцепочечной линейной отрицательной РНК длиной около 11,9–12,3 т.п.н. Вирионы состоят из двух структурных единиц. Длина вирионов составляет от 130 до 380 нм. Генетическая структура лиссавирусов консервативна и представлена 5 генами структурных белков. Это 3'–N (нуклеопротеин) – Р (фосфопротеин, кофактор репликации РНК) – М (матриксный белок) – G (поверхностный гликопротеин) – L (вирусные РНК-полимеразы) –5' [4].

Лиссавирусы – нейротропные патогены, вызывающие острый прогрессирующий энцефаломиелит. Чувствительность ко всем представителям рода всех млекопитающих обусловлена общностью патогенеза – взаимодействием с никотиновым ацетилхолиновым рецептором нервного окончания, являющегося универсальным медиатором передачи нервных импульсов в синаптических соединениях [5]. Передача инфекции происходит по эпизоотическим цепям век-

торного типа, возникающим при травмирующих контактах с больным животным-источником. В результате заражения возбудитель проникает в моторные или сенсорные нейроны и центростремительно распространяется по центральной нервной системе, используя ретроградный аксональный транспорт по нейронным связям [11, 12].

В естественной среде лиссавирусы связаны с конкретными животными-резервуарами, преимущественно с хищниками и летучими мышами, в рамках паразитарных систем двух архетипов – наземной и воздушно-наземной. Основными хозяевами лиссавирусов в филогенетическом отношении их естественно-исторического происхождения являются представители отряда рукокрылых. Хищники (отряд Carnivora) поддерживают циркуляцию только вируса бешенства (RABV). С рукокрылыми умеренного пояса Евразии связаны следующие лиссавирусы: European bat 1 lyssavirus – EBLV-1 (*Lyssavirus hamburg* согласно современной классификации ICTV), European bat 2 lyssavirus – EBLV-2 (*L. helsinki*), Aravan lyssavirus – ARALV (*L. aravan*), Khujand lyssavirus – KHULV (*L. khujand*), West Caucasian bat lyssavirus – WCBLV (*L. caucasicus*), Irkut lyssavirus – IRKLV (*L. irkut*), Bokeloh bat lyssavirus – BBLV (*L. bokeloh*), Lleida bat lyssavirus – LLEBLV (*L. lleida*) и Kotalahti bat lyssavirus – KBLV (*L. kotalahti*). Как правило, распространение конкретных лиссавирусов видоспецифично, но не исключает их передачи другим видам в общих колониях или случайным хозяевам – домашним животным или человеку [12].

Коронавирусы (Coronaviridae: Alphacoronavirus, Betacoronavirus). Семейство Coronaviridae представляет собой монофилетический кластер в порядке Nidovirales. Это оболочечные плюс-РНК-вирусы, которые поражают позвоночных 3 классов: млекопитающих (корона- и торовирусы), птиц (коронавирусы) и рыб (бафинивирусы). Вирионы могут быть сферическими, диаметром от 120 до 160 нм (Coronavirinae), палочковидными, размером от 170 до 200 × 75–88 нм (*Bafinivirus*), или представлять собой смесь этих двух форм. При этом палочковидные частицы характерно изогнуты в форме полумесяца (*Torovirus*) [13]. Частицы обычно имеют крупные выступы на поверхности в виде булавы или лепестков («пепломеры» или «шипы»). Нуклеокапсиды обладают спиралевидной формой и могут быть отделены от вирусной частицы при обработке детергентами. В то время как у коронавируса структура нуклеокапсида неплотная, у торовируса она имеет характерную трубчатую форму [14].

По размеру генома и генетической сложности коронавирусы являются самыми крупными РНК-вирусами, обнаруженными на данный момент. По этим характеристикам с ними могут сравниться только окавирусы – крупные нидовирусы беспозвоночных из семейства Roniviridae. Механизм репликации подробно изучен только для коронавирусов. Однако наличие очевидно ограниченных данных по торо- и бафинивирусам позволяет сделать предположение о наличии у них схожих биологических характеристик. Вирионы этих вирусов прикрепляются к специ-

альным рецепторам на поверхности клетки-хозяина с помощью шипов и высвобождают свой геном в клетку-мишень через слияние вирусной оболочки с плазматической мембраной и/или ограничительной мембраной эндоцитарного везикула [13].

Изучение рукокрылых как возможных переносчиков коронавирусов началось после возникновения случаев атипичной пневмонии в 2002–2004 гг. [15], и было интенсифицировано после обнаружения W. Li и соавт. у представителей рода *Rhinolophus* (*R. pearsoni*, *R. pussilus*, *R. macrotis*) в Китае РНК коронавируса, генетически близкого к возбудителю атипичной пневмонии SARS-CoV [16]. Позже несколькими группами исследователей было показано, что маркеры различных коронавирусов (РНК, специфические антитела) у рукокрылых встречаются в Северной и Южной Америке, Европе и Африке [17–20]. После вспышки ближневосточного респираторного синдрома в 2012–2015 гг., вызванной коронавирусом MERS-CoV и охватившей несколько стран мира, РНК генетически близких к нему коронавирусов была обнаружена у рукокрылых в Африке и Европе [21, 22]. Родственный возбудителю COVID-19, SARS-CoV-2-подобный вирус был идентифицирован у *R. affinis*

в Китае за несколько лет до пандемии новой коронавирусной инфекции [23]. Обнаружение у рукокрылых генетического материала коронавирусов, родственных возбудителям тяжелых заболеваний человека (SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2), дало основание рассматривать отдельные виды этих животных в качестве потенциальных хозяев предшественников высокопатогенных коронавирусов человека.

Физико-географическая характеристика анализируемых регионов

Юг европейской части России. Административным центром Южного федерального округа является Ростовская область (далее – РО), которая расположена между 50°14' – 45°51' с.ш. и 38°14' – 44°20' в.д. (рисунок), в бассейне Нижнего Дона, включает в себя юго-запад Русской равнины и северо-западную часть Предкавказья. На крайнем юго-западе омывается водами Таганрогского залива Азовского моря, на востоке – Цимлянским водохранилищем. На территории РО распространены три зональных типа природных ландшафтов: степной, сухостепной и полупустынный, которые сменяют друг друга с запада на восток. Степной тип ландшафтов занимает почти всю территорию

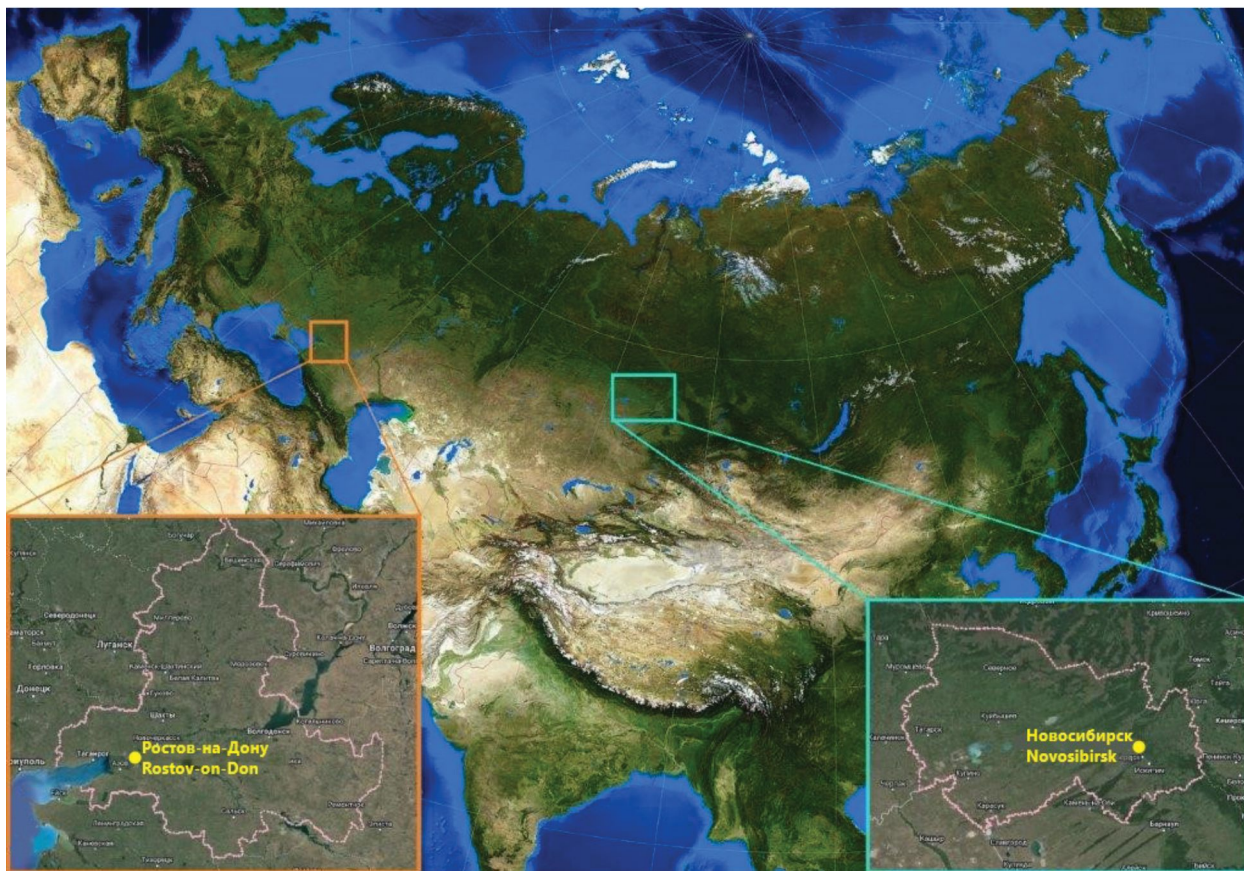


Рисунок. Географическое положение анализируемых регионов на карте Евразии, их административные центры.

Оранжевая рамка – Ростовская область, светло-голубая рамка – Новосибирская область.

Figure. Geographical location of the analyzed regions on the map of Eurasia, and their administrative centers.

Orange frame – Rostov region, light blue frame – Novosibirsk region.

области, кроме ее юго-восточной части. Сухостепной тип ландшафтов занимает восточную часть Доно-Чирского междуречья и среднюю часть Сало-Маньчской равнины, простираясь на запад по долине р. Маньч. Полупустынный тип ландшафтов приурочен к склонам и надпойменным террасам рек восточной окраины Сало-Маньчской равнины [12].

Рельеф в основном равнинный. На западе – восточные отроги Донецкого кряжа, на севере – Донская гряда, на юго-востоке – пологие отроги возвышенности Ергени, на юге – Кумо-Маньчская впадина. Поверхность области пересечена долинами рек, оврагами и балками. Основная река – Дон с притоками. Лесистость – 2,5% [13]. Также широкое распространение получили искусственные (антропогенные) формы рельефа, особенно на орошаемых землях. Это постоянные и временные оросительные каналы, терриконы, курганы. Согласно данным портала Köppen-Geiger Climate Classification Map (<https://www.koppen-map.com/>), климат большей части РО классифицируется как Dfa (холодный континентальный, без сухого сезона, жаркое лето), в северных районах области климат относится к типу Dfb (холодный континентальный, без сухого сезона, теплое лето).

Западная Сибирь. Новосибирская область (далее – НСО) как наиболее характерная в климато-географическом отношении территория Сибирского федерального округа расположена между 57°14' – 53°17' с.ш. и 75°05' – 85°07' в.д. (рисунок), на стыке Алтае-Саянской горной страны и Западно-Сибирской равнины, граница между которыми проходит приблизительно по р. Обь. Долина р. Оби разделяет ее территорию на две неравные части. Левобережная часть, составляющая около 80% территории, расположена на обширной равнине Обь-Иртышского междуречья (Васюганская равнина, Барабинская и Кулундинская низменности). Пологосклонные возвышенности здесь чередуются с обширными низменностями, слабо расчлененными негустой сетью широких плоскостных и неглубоких долин с медленно текущими реками. В рельефе присутствуют гривы и межгривные понижения, вытянутые с северо-востока на юго-запад, протяженностью в десятки километров. В понижениях – болота и озера. Главная река – Обь. НСО расположена в зонах южной тайги, смешанных лесов и лесостепи, лесистость – 26% [24]. На севере области находится южная часть Васюганской равнины – водораздел между притоками Иртыша и Оби, южная часть самой обширной в мире системы западносибирских верховых болот. Западная и центральная часть области занята Барабинской низменностью с характерным гривным рельефом, многочисленными бессточными озерами и низинными болотами. Для юго-западной и южной частей НСО (Кулундинская равнина) характерно сочетание долин и замкнутых котловин, широко распространены озера с сильно минерализованной водой. Правобережная (восточная) часть НСО характеризуется более расчлененным и возвышенным рельефом. Здесь начинаются отроги Салаирского кряжа – системы пологих холмов-увалов, покрытых

лесом, изрезанных глубокими руслами многочисленных мелких рек и ручьев [25]. Климат большей части НСО относится к типу Dfb (холодный континентальный, без сухого сезона, теплое лето). В северных районах области (зона подтаежных лесов) тип климата Dfc (холодный континентальный, без сухого сезона, холодное лето), на юго-западе, в степях Кулундинской равнины климат ряда районов классифицирован как BSk (сухой степной холодный) (<https://www.koppen-map.com/>).

Таким образом, Западная Сибирь и юг европейской части России располагаются в пределах умеренного климатического пояса Северной Евразии, но существенно отличаются между собой по средним годовым температурам, ландшафтному разнообразию и степени антропогенной трансформации естественных биоценозов. Эти отличия, в свою очередь, будут оказывать влияние на фауну рукокрылых в этих регионах.

Фауна рукокрылых Западной Сибири и юга европейской части России

Юг европейской части России. По состоянию на 2013 г. на юге европейской части России было документировано 15 видов рукокрылых, относящихся к семейству гладконосых [4, 7], что составляет 33% от видов гладконосых летучих мышей из фауны России. К оседлым видам относятся все ночницы (*Myotis daubentonii*, *M. mystacinus*, *M. dasycneme*, *M. aurascens*), нетопырь Куля (*Pipistrellus kuhlii*), поздний кожан (*Eptesicus serotinus*) и бурый ушан (*Plecotus auritus*) [4]. В период с мая по сентябрь в разные годы на территории РО регистрировались выводковые колонии лесных нетопырей (*P. nathusii*), нетопырей-карликов (*P. pipistrellus*), двухцветных кожанов (*Vespertilio murinus*), рыжих вечерниц (*Nyctalus noctula*), а также взрослые особи малого нетопыря (*P. pygmaeus*), северного кожанка (*E. nilssonii*), малой (*N. leisleri*) и гигантской (*N. lasiopterus*) вечерниц при сезонных миграциях [4].

Ландшафтное распределение рукокрылых в Южном федеральном округе неоднородно вследствие наличия (отсутствия) подходящих мест для дневных убежищ, размножения и зимовки (дупла деревьев, естественные и искусственные пещеры, жилые и хозяйственные помещения) и кормовой базы (временные и постоянные пресные водоемы, где происходит выплод насекомых). Наибольшая частота встречаемости в период активности наблюдается в степной зоне, где были отмечены представители всех 15 видов рукокрылых [7], наиболее многочисленными из которых являются малая и прудовая ночницы, рыжая вечерница, нетопырь Куля, нетопырь-карлик и малый нетопырь. Высокая численность и видовое разнообразие летучих мышей в этой зоне связано с наличием естественных лесов (лесистость в зоне 12%) и заселенностью людьми (наличие жилых и хозяйственных построек). В сухостепной зоне встречаются нетопырь Куля, нетопырь-карлик, двухцветный и поздний кожаны, рыжая вечерница, численность животных

при этом ниже, чем в степной зоне. В полупустынной зоне, наименее благоприятной для рукокрылых, описаны немногочисленные встречи нетопыря Куля и позднего кожана [7]. Из 15 видов летучих мышей в РО в искусственных сооружениях, включая жилье человека, регистрировались представители 12 видов (исключение – малая и гигантская вечерницы, степная ночница) [7]. К синантропным видам относятся нетопырь Куля и двухцветный кожан [4].

Опубликованные данные о зимовках летучих мышей на территориях юга европейской части России отрывочны. Достоверно известно о зимовках рыжей вечерницы [26] и нетопыря Куля [27], последний предпочитает зимовать исключительно в постройках человека и может выходить из состояния спячки во время оттепелей. S.V. Gazaryan и соавт. со ссылкой на более ранние исследования сообщают о зимних находках на территории РО прудовой, водяной (*M. daubentonii*) и усатой (*M. mystacinus*) ночниц, позднего кожана и бурого ушана [6].

Западная Сибирь. Хироптерофауна Сибири насчитывает 10 видов гладконосых летучих мышей (около 22% от видов *Vespertilionidae* в России). Информация по видовому составу рукокрылых в Западной Сибири составлена главным образом на основании данных IUCN Red List of Threatened Species (www.iucnredlist.org) вследствие крайне отрывочных сведений в научной литературе. Основные данные о видовом составе касаются мест зимовок рукокрылых в пещерах Салаирского кряжа. A.D. Botvinkin и соавт. приводят данные о наличии в четырех пещерах Салаирского кряжа, находящихся в пределах НСО, 5 видов ночниц – прудовой (*M. dasycneme*), восточной (*M. petax*), сибирской (*M. sibirica*), Иконникова (*M. ikonnikovi*) и длиннохвостой (*M. longicaudatus*); сибирского трубконоса (*M. hilgendorfi*) и сибирского ушана (*P. ognevi*) за период наблюдения с 1978 по 2009 г. [7]. Присутствие прудовой, восточной, сибирской ночниц и сибирского ушана отмечалось в пещерах в разные сезоны года, а ночницы Иконникова, длиннохвостого и сибирского трубконоса – только в зимнее время. Количество зверьков в пещерах может варьировать в зависимости от разных факторов – года наблюдения, сезона, размеров пещер. Наиболее крупная зимовочная колония летучих мышей находится в Барсуковской пещере (54°22'14" с.ш. 83°57'42" в.д.) и может насчитывать до нескольких сотен зимующих животных [7]. Данные по видовому распределению рукокрылых и периоду активности в степной, лесостепной и лесной зонах НСО в доступной литературе отсутствуют. Ареал рыжей вечерницы в НСО, согласно www.iucnredlist.org, находится в южных, юго-восточных и восточных районах, животные встречаются только в летний период. Вся территория НСО находится в пределах ареалов двухцветного кожана и северного кожана (www.iucnredlist.org). Относительно последнего A.D. Botvinkin и соавт. была описана находка взрослой самки у входа в Барсуковскую пещеру в апреле 1981 г. [7]. К оседлым видам можно отнести прудовую, восточную и сибирскую ночниц, сибир-

ского ушана. Официальной статистики по видовому составу летучих мышей, залетающих в летний период в жилые помещения или зимующих в них в населенных пунктах Сибирского федерального округа, нет. Можно предполагать, что в летний период двухцветный кожан, являющийся синантропным видом в разных частях ареала [7], также использует жилые и хозяйственные постройки для выводковых колоний или мест дневных убежищ.

Таким образом, можно заключить, что фауна рукокрылых юга европейской части страны характеризуется большим видовым разнообразием в сравнении с хироптерофауной Западной Сибири. Большая часть видов специфичны для РО или НСО, при этом прудовая ночница, рыжая вечерница, двухцветный кожан и северный кожанок отмечены в обоих регионах. Видовое разнообразие рукокрылых на юго-западе России обусловлено более благоприятным температурным режимом для питания, размножения и зимовки, несмотря на наличие на ее территории больших открытых пространств, лишенных потенциальных мест убежищ. При этом число зимующих видов летучих мышей одинаково для обоих регионов, несмотря на более суровый температурный режим периода зимовки в Сибири. В отличие от РО, где установлена зимовка в населенных пунктах некоторых видов летучих мышей (*P. kuhlii* и *N. noctula*), все зимующие в НСО виды формируют зимовочные колонии в пещерах Салаирского кряжа, что делает эти локации уникальными «инкубаторами», поддерживающими в течение нескольких месяцев состояние спячки для сотен зверьков. В целом, видовое разнообразие представителей Chiroptera в рассматриваемых регионах показывает зависимость от зональности и согласуется с моделью глобального распределения рукокрылых, описанной ранее [28].

Потенциал вирусносительства у гладконосых летучих мышей, обитающих в Западной Сибири и на юге европейской части России

В настоящее время у рукокрылых идентифицированы или изолированы представители 24 семейств РНК-содержащих и 11 семейств ДНК-содержащих вирусов позвоночных [1]. Разнообразие и число видов вирусов, связанных с отрядом Chiroptera, неоднородно и фактически совпадает с распределением животных-хозяев – наибольшее разнообразие вирусов рукокрылых характерно для территорий экваториального, субэкваториального, тропического и субтропического поясов [2, 28]. Для гладконосых летучих мышей умеренного пояса Евразии к актуальным для здравоохранения и часто встречающимся у них вирусам или их маркерам (РНК, вирусные антигены, специфические антитела) можно отнести: лиссавирусы (*Rhabdoviridae: Lyssavirus*), альфа- и бетакоронавирусы (*Coronaviridae: Alphacoronavirus, Betacoronavirus*), включая SARS-CoV- и MERS-CoV-подобные, а также астровирусы (*Astraviridae: Mamastrovirus*), парамиксовирусы (*Paramyxoviridae*), реовирусы (*Spinareoviridae: Orthoreovirus*), хепевиру-

сы (Hepeviridae: *Chirohepevirus*), флавивирусы (Flaviviridae: *Flavivirus*), наиовирусы (Nairoviridae), хантавирусы (Hantaviridae) и вирусы гриппа А (Orthomyxoviridae: *Alphainfluenzavirus*) [2, 10–13, 29]. Для видов фауны рукокрылых Западной Сибири и юга европейской части страны был проведен поиск информации в открытых источниках о случаях идентификации у них актуальных РНК-содержащих вирусов или их маркеров, таких как лисс- и корона-вирусы, за доступный период наблюдения, ввиду их наибольшей актуальности и необходимости в углубленном изучении (таблица). Причем все виды летучих мышей, упомянутые в подразделе, относятся к семейству гладконосых.

Европейский лиссавирус летучих мышей 1 (EBLV-1) широко распространен в популяции позднего кожана *E. serotinus* в континентальной Европе [13], а в 2018 г. его

вирусная РНК была впервые обнаружена у *E. serotinus* в Великобритании [30]. EBLV-1 является самым распространенным в Европе лиссавирусом после вируса бешенства – в базе GenBank представлены несколько десятков последовательностей полного генома вируса из разных стран, включая Россию (MF187867, LT839613) [24, 25, 31]. По данным Всемирной организации здравоохранения, первый случай лиссавирусной инфекции у летучих мышей в Европе был зарегистрирован в Германии в 1954 г. [32]. Помимо поздних кожанов, считающихся естественным хозяином EBLV-1, маркеры вирусной инфекции (РНК, антиген, специфические антитела) в разное время были обнаружены у нескольких видов рукокрылых [13, 31], при этом изоляты вируса, доступные в GenBank, известны только для *E. serotinus* [24]. М.А. Selimov и соавт. получили изоляты Yuli-like вируса (EBLV-1) от рыжей вечерницы

Таблица. Вирусы, идентифицированные у видов гладконосых летучих мышей, распространенных в Сибири и на юге европейской части России [2, 9–13, 29]

Table. Viruses identified in species of plain-nosed bats, distributed in Siberia and southern European Russia in Siberia and southern European Russia [2, 9–13, 29]

Виды летучих мышей Bat species	Lyssavirus (Rhabdoviridae)						Coronaviridae			Другие вирусы Other viruses										
	KHULV	EBLV-2	EBLV-1	RABV	<i>Lyssavirus</i> sp.	IRKLV	<i>Alphacoronavirus</i>	<i>Betacoronavirus</i>	MERS-CoV-related	<i>Mamastrovirus</i>	<i>Orthoreovirus</i> sp.	<i>Chirohepevirus</i>	Paramyxovirinae	Yokose virus	Sokuluk virus	Usutu virus	Issyk-Kul virus	Influenza A H3N2 virus	Bmo loavirus	Ledentevirus-like
Юг европейской части России South of the European part of Russia	<i>M. daubentonii</i>		+	+			+	+		+	+	+		+						
	<i>M. mystacinus</i>	+								+	+		+							
	<i>M. aurascens</i>										+									
	<i>P. kuhlii</i>			+			+		+	+	+									+
	<i>P. nathusii</i>			+			+		+	+	+	+								
	<i>P. pipistrellus</i>			+			+		+	+	+		+		+	+				
	<i>P. pygmaeus</i>						+		+	+										
	<i>N. leisleri</i>						+	+												
	<i>N. lasiopterus</i>			+			+													
	<i>P. auritus</i>			+			+	+			+									
<i>E. serotinus</i>			+	+		+	+		+	+	+									
Общие виды Common	<i>V. murinus</i>			+	+	+	+		+	+										
	<i>N. noctula</i>			+		+	+	+	+	+		+					+	+	+	
	<i>M. dasycneme</i>		+				+													
	<i>E. nilssonii</i>						+	+									+			
Сибирь Siberia	<i>M. petax</i>				+	+	+		+											
	<i>M. sibirica</i>					+														
	<i>M. ikonnikovi</i>						+													
	<i>M. longicaudatus</i>																			
	<i>M. hilgendorfi</i>					+	+													
	<i>P. ognevi</i>				+															

и двухцветного кожана на Украине [33], что указывает на возможность участия других видов рукокрылых в поддержании циркуляции EBLV-1. Вирус является патогенным для летучих мышей, человека и некоторых домашних животных. В отношении естественного хозяина *E. serotinus* описаны случаи массовой гибели животных в выводковых колониях [34], бессимптомное вирусносительство с сероконверсией [35] и спорадическая гибель отдельных особей [36]. Экспериментальное заражение поздних кожанов геновариантом EBLV-1a при внутримозговом и подкожном введении вируса приводило к развитию заболевания, проявляющегося в виде отказа от пищи, тремора, раздражительности, агрессивности, параличей, приводящего к гибели животного [37]. L. Rønsholt и соавт. описан случай изоляции EBLV-1 из нильских крыланов (*Rousettus aegyptiacus*), погибших с признаками рабической инфекции через 9 дней после переезда из зоопарка Роттердама (Голландия) в Данию [38]. W.H. Van der Poel и соавт. показана патогенность для нильских крыланов изолятов EBLV-1 как от *R. aegyptiacus*, так и от естественных хозяев *E. serotinus* при разных путях заражения [39]. I.V. Kuz'min и соавт. показали патогенность российского штамма Yuli (EBLV-1) для нетопырей-карликов при экспериментальном заражении как в активном состоянии, так и при выходе из зимней спячки, в которую они были погружены после заражения [40]. Североамериканские большие бурые кожаны *E. fuscus* продемонстрировали чувствительность к двум штаммам EBLV-1a при разных путях заражения [41]. Вирус является патогенным для человека – за все время наблюдения документировано 3 случая заражения людей – два в 1977 г. (Украина) [42] и 1985 г. (Россия) [33, 43] и один во Франции в 2019 г. [44]. Инфекция, вызванная EBLV-1 у человека, проявлялась по типу прогрессирующего энцефалита с признаками гидроцефалии [33], параличами, застоем слюны и дисфонией [44] и приводила к смерти заболевшего. В 2 случаях установлена связь с рукокрылыми – в случае из России заражение 11-летней девочки произошло после укуса летучей мыши в губу [33], а в случае из Франции во флигеле дома 59-летнего заболевшего мужчины находилась колония летучих мышей [44]. Описаны также случаи инфекции EBLV-1 у диких и домашних животных – у домашних овец в Дании [45], каменной куницы в Германии [46], домашних кошек во Франции [47].

Европейский лиссавирус летучих мышей 2 (EBLV-2) впервые был выделен в Финляндии в 1985 г. из головного мозга 30-летнего мужчины, умершего вследствие энцефалита с признаками рабической инфекции. Заболевший был биологом, работавшим с рукокрылыми и имевшим в анамнезе множественные укусы этих животных [48]. В последующее время вирус или его маркеры были обнаружены у прудовых и водяных ночниц в нескольких странах Западной и Северной Европы [49]. Имеется также сообщение об идентификации EBLV-2 у *M. daubentonii* на Украине в 1996 г. [50], что, вероятно, является самой восточной точкой обнаружения вируса. В отличие от EBLV-1, изоляция EBLV-2 или выявление его

маркеров за все время наблюдения было характерно только для этих двух видов ночниц [13, 49], что свидетельствует о видовой специфичности вируса. Все описанные случаи EBLV-2 у естественных хозяев *M. dasycneme* и *M. daubentonii* относятся к одиночным особям, найденным погибшими или больными [51]. Экспериментальная инфекция EBLV-2 у водяных ночниц приводила к развитию болезни и гибели животных только при внутримозговом заражении, при других путях заражения вирус демонстрировал низкую патогенность для естественных хозяев [52]. За весь период наблюдения с 1985 г. описано 2 случая фатального энцефалита у людей, вызванного EBLV-2. В обоих случаях заболеванию предшествовал контакт с рукокрылыми [48, 49]. Случаев заражения EBLV-2 диких и домашних животных на эндемичных территориях отмечено не было.

Интенсивное изучение лиссавирусов у рукокрылых центральной Евразии началось в 80-х гг. прошлого века [43]. Первое сообщение относится к изоляции вируса бешенства от двухцветного кожана в Западной Сибири [53], у которого была исследована патогенность для нетопырей-карликов и беспородных белых мышей [40]. Позже V.A. Ternovoi и соавт. подтвердили наличие РНК вируса бешенства в образцах головного мозга восточной ночницы *M. petax* (DQ860254, DQ860249, DQ860255) и ушана Огнева *P. ognevi* (DQ860256), собранных в местах зимовок в НСО в 2001–2002 гг. [54]. A.I. Karagulov и соавт. обнаружили РНК вируса бешенства в образцах головного мозга *V. murinus* и *E. serotinus* из 6 областей Казахстана, включая Северо-Казахстанскую область, географически и экологически близкую к южным районам Западной Сибири [55]. Для одного образца от *E. serotinus* удалось определить нуклеотидную последовательность участка N гена (OP585396) вируса бешенства, что является подтверждением его циркуляции среди рукокрылых этого вида. Таким образом, изоляция вируса и неоднократное обнаружение его РНК у представителей нескольких видов рукокрылых центральной Евразии позволяют расширить представление об участии этих животных в циркуляции вируса бешенства в этом регионе.

С рассматриваемыми в данной работе видами усатая ночница и сибирский трубконос связаны, соответственно, лиссавирусы Худжанд (Khujand) (KHULV) и Иркут (IRKLV) [43]. Лиссавирус Худжанд был изолирован в 2001 г. в окрестностях г. Худжанд (Таджикистан) от самки усатой ночницы с признаками заторможенности [56]. Это единственное сообщение об изоляции вируса. Случаев заболевания, вызванного KHULV у людей или животных, в последующие годы описано не было. Лиссавирус Иркут был изолирован от самца сибирского трубконоса в 2002 г. в г. Иркутске (Россия). Животное залетело в квартиру и несколько дней находилось на передержке, в течение которых развивались слабость, отказ от пищи и воды, приведшие к последующей гибели [57]. Y. Liu и соавт. IRKLV был изолирован из головного мозга клинически здорового самца большого трубконоса

M. leucogaster, отловленного в 2012 г. в провинции Цзилинь в Китае [42]. Вирус является патогенным для человека – G.N. Leanova и соавт. описан случай фатального лиссавирусного энцефалита у 20-летней девушки в 2007 г. в Приморском крае (Россия). В анамнезе заболевшей была травма губы, полученная от летучей мыши примерно за месяц до начала болезни. Из головного мозга умершей был изолирован вирус Ozernoe, последовательность полного генома которого (FJ905105) продемонстрировала 92% гомологии с геномом IRKLV, выделенного из *M. hilgendorfi* [58]. В 2017 г. РНК IRKLV была обнаружена в головном мозге умершей собаки в Китае, в г. Фусин, провинция Ляонин [58]. Экспериментальное внутримышечное заражение китайским штаммом IRKV-THChina12 домашних собак и кошек показало низкую (20% летальность) патогенность IRKLV для собак и среднюю (60% летальность) для кошек [59]. Серологическое обследование рукокрылых из Центральной Европы (Чехия, Польша) и России (Алтайский край), проведенное V. Seidlova и соавт., выявило наличие антител к лиссавирусам у представителей видов, у которых ранее были изолированы лиссавирусы или обнаруживалась вирусная РНК [60]. Серопозитивные особи встречались среди *N. noctula* в Чехии, среди российских *V. murinus*, *M. hilgendorfi*, и *M. petax*, а также впервые среди сибирских ночниц (*M. sibirica*). Ночницы *M. petax* и *M. sibirica* относятся к оседлым видам, в связи с чем обнаружение у них маркеров лиссавирусной инфекции свидетельствует о циркуляции лиссавирусов в их западносибирской популяции.

В настоящее время у рукокрылых в разных регионах мира идентифицированы многочисленные альфа- и бетакоронавирусы. С гладконосыми Vespertilionidae связана наибольшая частота встречаемости РНК альфакоронавирусов в Европе и Азии, в то время как для бетакоронавирусов они являются вторыми по частоте обнаружения вирусной РНК после подковоносых Rhinolophidae в Европе, и третьими после Rhinolophidae и крыланов Pteropodidae в Азии [61]. Внутри рода *Alphacoronavirus* вирусы 9 из 14 подродов были идентифицированы у рукокрылых, при этом с гладконосыми связаны подроды *Colacovirus*, *Pedacovirus*, *Nyctacovirus* и *Myotacovirus*. Внутри *Betacoronavirus* 4 подрода из 5 ассоциированы с рукокрылыми, из которых только *Merbecovirus* был обнаружен у гладконосых [62].

Носительство коронавирусов среди европейских видов рукокрылых достаточно хорошо изучено – С. Kohl и соавт. приводят данные по находкам РНК альфа- и бетакоронавирусов у рукокрылых в разных странах Европы за несколько лет наблюдений [10]. У рукокрылых из фауны России также был обнаружен генетический материал альфа- и бетакоронавирусов, включая SARS-CoV- и MERS-CoV-подобные [63–67]. РНК альфакоронавирусов была обнаружена в образцах фекалий *P. kuhlii*, отловленных в г. Ростов-на-Дону в 2021 г. [64]. РНК коронавирусов (без идентификации до рода) также была обнаружена в орофарингеальных мазках *P. kuhlii* и *E. serotinus*

в соседних с Ростовской областью регионах – Республике Адыгея и Краснодарском крае [65], что свидетельствует о циркуляции коронавирусов среди рукокрылых на юге России. По данным литературы, с нетопырями ассоциированы MERS-CoV-подобные вирусы в нескольких странах Европы, включая Россию [21, 22, 66]. Рукокрылые центральной Евразии в этом отношении изучены недостаточно. А.И. Karagulov и соавт. обнаружили РНК альфакоронавирусов в образцах фекалий *V. murinus* и *E. serotinus* в западных и южных областях Казахстана [55].

Относительно недавно РНК альфакоронавирусов была идентифицирована у восточных ночниц и ночниц Иконникова (*M. ikonnikovi*) на юге Западной Сибири [67], что указывает на необходимость дополнительных исследований коронавирусов в популяциях рукокрылых в этом регионе.

Все перечисленные выше случаи выявления коронавирусов у рукокрылых в Европе и центральной Евразии касаются только обнаружения вирусной РНК без выделения живых вирусов. Патогенность выявленных коронавирусов для их естественных хозяев не установлена. А. Mogeno и соавт. идентифицировали полный геном MERS-CoV-подобного вируса в свежих трупиках *P. kuhlii* и *H. savii*, полученных из Центра реабилитации рукокрылых [22], однако нельзя утверждать, что именно MERS-подобный коронавирус был в этих случаях причиной смерти животных. Из наземных животных в Евразии только у ежей (*Erinaceus europaeus*, *E. amurensis*) за все время наблюдения были идентифицированы генетически близкие к рукокрылым MERS-подобные коронавирусы [68–70] без каких-либо клинических проявлений. Случаев заражения людей коронавирусами рукокрылых в Европе или центральной Евразии описано не было. Однако, учитывая разнообразие выявленных коронавирусов, в том числе MERS-CoV-подобных у мигрирующих (*P. nathusii*) и синантропных (*P. kuhlii*) видов рукокрылых, актуальным является мониторинг этих вирусов в популяциях рукокрылых, как в Западной Сибири, так и на юге европейской части России.

Заключение

Таким образом, в настоящее время в европейской части России у гладконосых летучих мышей выявлена циркуляция представителей таких вирусных родов и семейств, как лиссавирусы, альфа- и бетакоронавирусы, астровирусы, парамиксовирусы, реовирусы, хепевирусы, флавивирусы, наировирусы, хантавирусы и вирусы гриппа А. Среди них летальные случаи в человеческой популяции были установлены для европейского лиссавируса летучих мышей EBLV-1. На территориях Западной Сибири у гладконосых летучих мышей установлено наличие лиссавирусов EBLV-1 и IRKLV. Причем лиссавирус Иркутск был изолирован от большого трубконоса *Murina leucogaster* (г. Иркутск). Альфакоронавирусы были выявлены среди рукокрылых как на территориях Западной Сибири, так и в европейской части России. Однако на европейских территориях помимо альфакоронавиру-

сов были идентифицированы и бетакоронавирусы, включая SARS-CoV- и MERS-CoV-подобные. В целом у гладконосых летучих мышей юга европейской части России количество выявленных вирусов выше, чем в Сибири, что позволяет сделать вывод о более высоком потенциале вирусоносительства. Доказанное присутствие таких опасных для человека вирусов, как европейский лиссавирус летучих мышей, в популяциях семейства гладконосых этих регионов свидетельствует о существовании опасности возникновения природных очагов инфицирования. В этой связи необходимы дальнейшие систематические исследования видовой состава и распределения генетических вариантов лисса- и коронавирусов у гладконосых летучих мышей на данных территориях.

По состоянию на 2024 г. млекопитающие семейства Vespertilionidae являются природными резервуарами или переносчиками ряда опасных для человека вирусов. В то же время в РФ эпидемический потенциал вирусов, выявляемых у этих животных, изучен недостаточно и фрагментарно, что не дает возможности для надежного прогнозирования ситуации. Однозначно должен быть пересмотрен подход к мониторингу и оценке существующих эпидемиологических угроз, особенно в связи с пандемией новой коронавирусной инфекции (COVID-19), причиной которой стал известный факт, но недостаточно изученный ранее.

ЛИТЕРАТУРА

- Van Brussel K., Holmes E.C. Zoonotic disease and virome diversity in bats. *Curr. Opin. Virol.* 2022; 52: 192–202. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.12.008>
- Liu Z., Liu Q., Wang H., Yao X. Severe zoonotic viruses carried by different species of bats and their regional distribution. *Clin. Microbiol. Infect.* 2024; 30(2): 206–10. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.09.025>
- Полещук Е.М., Тагакова Д.Н., Сидоров Г.Н., Орлова Т.С., Гордейко Н.С., Кайсаров А.Ж. Случаи летальной лиссавирусной инфекции у людей после контактов с рукокрыльями на Дальнем Востоке России в 2019–2021 гг. *Вопросы вирусологии.* 2023; 68(1): 45–58. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-156> <https://elibrary.ru/bjmlbx>
- Сидорчук А.А. Рец. на кн.: Макаров В.В., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И. Бешенство: естественная история на рубеже столетий. М.: ЗооВетКнига; 2015. *Вопросы вирусологии.* 2018; 63(1): 48. <https://elibrary.ru/yoomce>
- Алексеева С.В. Рец. на кн.: Макаров В.В., Лозовой Д.А. Новые особо опасные инфекции, ассоциированные с рукокрыльями. Владимир; 2016. *Ветеринария сегодня.* 2017; (2): 67–8. <https://elibrary.ru/yrtprb>
- Газарян С.В., Бахтадзе Г.Б., Малиновкин А.В. Современное состояние изученности рукокрыльях ростовской области. *Plecotus et al.* 2010; (13): 50–8. <https://elibrary.ru/wcnffh>
- Ботвинкин А.Д., Вахрушев А.В., Кузьмин И.В., Морозов П.Н., Шевырногов С.З. Из истории наблюдений за рукокрыльями в пещерах Салаира (Новосибирская область). *Plecotus et al.* 2015; (18): 45–53. <https://elibrary.ru/vucerz>
- Arai S., Yanagihara R. Genetic diversity and geographic distribution of bat-borne hantaviruses. *Curr. Issues. Mol. Biol.* 2020; 39: 1–28. <https://doi.org/10.21775/cimb.039.001>
- Wang B., Yang X.L. Chirohepevirus from bats: insights into hepatitis E virus diversity and evolution. *Viruses.* 2022; 14(5): 905. <https://doi.org/10.3390/v14050905>
- Kohl C., Nitsche A., Kurth A. Update on potentially zoonotic viruses of European bats. *Vaccines (Basel).* 2021; 9(7): 690. <https://doi.org/10.3390/vaccines9070690>
- Johnson N., Cunningham A.F., Fooks A.R. The immune response to rabies virus infection and vaccination. *Vaccine.* 2010; 28(23): 3896–901. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.039>
- Wambugu E.N., Kimita G., Kituyi S.N., Washington M.A., Masakhe C., Mutunga L.M., et al. Geographic distribution of rabies virus and genomic sequence alignment of wild and vaccine strains, Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* 2024; 30(8): 1642–50. <https://doi.org/10.3201/eid3008.230876>
- Maier H.J., Bickerton E., Britton P. Preface. Coronaviruses. *Methods Mol. Biol.* 2015; 1282: v. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7>
- de Vries A.A.F., Horzinek M.C., Rottier P.J.M., de Groot R.J. The genome organization of the nidovirales: similarities and differences between Arteri-, Toro-, and Coronaviruses. *Semin. Virol.* 1997; 8(1): 33–47. <https://doi.org/10.1006/smvy.1997.0104>
- Poon L.L., Chu D.K., Chan K.H., Wong O.K., Ellis T.M., Leung Y.H., et al. Identification of a novel coronavirus in bats. *J. Virol.* 2005; 79(4): 2001–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.4.2001-2009.2005>
- Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J.H., et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science.* 2005; 310(5748): 676–9. <https://doi.org/10.1126/science.1118391>
- Dominguez S.R., O'Shea T.J., Oko L.M., Holmes K.V. Detection of group 1 coronaviruses in bats in North America. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(9): 1295–300. <https://doi.org/10.3201/eid1309.070491>
- Müller M.A., Paweska J.T., Leman P.A., Drosten C., Grywna K., Kemp A., et al. Coronavirus antibodies in African bat species. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(9): 1367–70. <https://doi.org/10.3201/eid1309.070342>
- Gloza-Rausch F., Ipsen A., Seebens A., Götttsche M., Panning M., Drexler J.F., et al. Detection and prevalence patterns of group 1 coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(4): 626–31. <https://doi.org/10.3201/eid1404.071439>
- Carrington C.V., Foster J.E., Zhu H.C., Zhang J.X., Smith G.J., Thompson N., et al. Detection and phylogenetic analysis of group 1 coronaviruses in South American bats. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(12): 1890–3. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080642>
- Annan A., Baldwin H.J., Corman V.M., Klose S.M., Owusu M., Nkrumah E.E., et al. Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(3): 456–9. <https://doi.org/10.3201/eid1903.121503>
- Moreno A., Lelli D., de Sabato L., Zaccaria G., Boni A., Sozzi E., et al. Detection and full genome characterization of two beta CoV viruses related to Middle East respiratory syndrome from bats in Italy. *Virol. J.* 2017; 14(1): 239. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0907-1>
- Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020; 579(7798): 270–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
- Forró B., Marton S., Fehér E., Domán M., Kemenesi G., Cadar D., et al. Phylogeny of Hungarian EBLV-1 strains using whole-genome sequence data. *Transbound. Emerg. Dis.* 2021; 68(3): 1323–31. <https://doi.org/10.1111/tbed.13789>
- Selimov M.A., Tatarov A.G., Botvinkin A.D., Klueva E.V., Kulikova L.G., Khismatullina N.A. Rabies-related Yuli virus; identification with a panel of monoclonal antibodies. *Acta Virol.* 1989; 33(6): 542–6.
- Смирнов Д.Г., Забашта А.В. Распространение рыжей вечерницы (*Nyctalus noctula*) в ростовской области и проблема расширения северной границы области её зимовки. *Российский журнал биологических инвазий.* 2023; 14(4): 621–33. <https://doi.org/10.35885/1996-1499-16-3-168-183> <https://elibrary.ru/raavaq>
- Миноранский В.А., Малиновкин А.В. Нетопись куля (*Pipistrellus kuhlii kuhli*) в Ростовской области. *Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: естественные науки.* 2015; (2): 80–3. <https://elibrary.ru/txfjqr>
- Alves D.M.C.C., Diniz-Filho J.A.F., Souza K.D., Gouveia S.F., Villalobos F. Geographic variation in the relationship between large-scale environmental determinants and bat species richness. *Basic Appl. Ecol.* 2018; 27: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2017.12.002>
- Yang W., Schountz T., Ma W. Bat influenza viruses: current status and perspective. *Viruses.* 2021; 13(4): 547. <https://doi.org/10.3390/v13040547>
- Folly A.J., Marston D.A., Golding M., Shukla S., Wilkie R., Lean F.Z.X., et al. Incursion of European Bat Lyssavirus 1 (EBLV-1) in serotine bats in the United Kingdom. *Viruses.* 2021; 13(10): 1979. <https://doi.org/10.3390/v13101979>

31. Harris S.L., Brookes S.M., Jones G., Hutson A.M., Racey P.A., Aegerter J., et al. European bat lyssaviruses: Distribution, prevalence and implications for conservation. *Biol. Conserv.* 2006; 131(2): 193–210. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.04.006>
32. Pérez-Jordá J.L., Ibáñez C., Muñoz-Cervera M., Téllez A. Lyssavirus in *Eptesicus serotinus* (Chiroptera: Vespertilionidae). *J. Wildl. Dis.* 1995; 31(3): 372–7. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-31.3.372>
33. Selimov M.A., Smekhov A.M., Antonova L.A., Shablovskaya E.A., King A.A., Kulikova L.G. New strains of rabies-related viruses isolated from bats in the Ukraine. *Acta Virol.* 1991; 35(3): 226–31.
34. Picard-Meyer E., Servat A., Wasniewski M., Gaillard M., Borel C., Cliquet F. Bat rabies surveillance in France: first report of unusual mortality among serotine bats. *BMC Vet. Res.* 2017; 13(1): 387. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1303-1>
35. Robardet E., Borel C., Moinet M., Jouan D., Wasniewski M., Barrot J., et al. Longitudinal survey of two serotine bat (*Eptesicus serotinus*) maternity colonies exposed to EBLV-1 (European Bat Lyssavirus type 1): Assessment of survival and serological status variations using capture-recapture models. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(11): e0006048. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006048>
36. Mingo-Casas P., Sandonis V., Obón E., Berciano J.M., Vázquez-Morón S., Juste J., et al. First cases of European bat lyssavirus type 1 in Iberian serotine bats: Implications for the molecular epidemiology of bat rabies in Europe. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(4): e0006290. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006290>
37. Freuling C., Vos A., Johnson N., Kaipf I., Denzinger A., Neubert L., et al. Experimental infection of serotine bats (*Eptesicus serotinus*) with European bat lyssavirus type 1a. *J. Gen. Virol.* 2009; 90(Pt 10): 2493–502. <https://doi.org/10.1099/vir.0.011510-0>
38. Rønsholt L., Sørensen K.J., Bruschke C.J., Wellenberg G.J., van Oirschot J.T., Johnstone P., et al. Clinically silent rabies infection in (zoo) bats. *Vet. Rec.* 1998; 142(19): 519–20. <https://doi.org/10.1136/vr.142.19.519>
39. Van der Poel W.H., van der Heide R., van Amerongen G., van Keulen L.J., Wellenberg G.J., Bourhy H., et al. Characterisation of a recently isolated lyssavirus in frugivorous zoo bats. *Arch. Virol.* 2000; 145(9): 1919–31. <https://doi.org/10.1007/s007050070066>
40. Kuz'min I.V., Botvinkin A.D., Shaïmardanov R.T. Experimental lyssavirus infection in chiropters. *Voprosy virusologii.* 1994; 39(1): 17–21.
41. Franka R., Johnson N., Müller T., Vos A., Neubert L., Freuling C., et al. Susceptibility of North American big brown bats (*Eptesicus fuscus*) to infection with European bat lyssavirus type 1. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt 8): 1998–2010. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83688-0>
42. Liu Y., Zhang S., Zhao J., Zhang F., Hu R. Isolation of Irkut virus from a *Murina leucogaster* bat in China. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7(3): e2097. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002097>
43. Kuzmin I.V., Botvinkin A.D., Poleschuk E.M., Orciari L.A., Rupprecht C.E. Bat rabies surveillance in the former Soviet Union. *Dev. Biol. (Basel)*. 2006; 125: 273–82.
44. Regnault B., Evrard B., Plu I., Dacheux L., Troadec E., Cozette P., et al. First case of lethal encephalitis in Western Europe due to European bat lyssavirus type 1. *Clin. Infect. Dis.* 2022; 74(3): 461–6. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab443>
45. Tjørnehøj K., Fooks A.R., Agerholm J.S., Rønsholt L. Natural and experimental infection of sheep with European bat lyssavirus type-1 of Danish bat origin. *J. Comp. Pathol.* 2006; 134(2-3): 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.10.005>
46. Müller T., Cox J., Peter W., Schäfer R., Johnson N., McElhinney L.M., et al. Spill-over of European bat lyssavirus type 1 into a stone marten (*Martes foina*) in Germany. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 2004; 51(2): 49–54. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2003.00725.x>
47. Dacheux L., Larrous F., Mailles A., Boisseleau D., Delmas O., Biron C., et al. European bat Lyssavirus transmission among cats, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(2): 280–4. <https://doi.org/10.3201/eid1502.080637>
48. Lumio J., Hillbom M., Roine R., Ketonen L., Haltia M., Valle M., et al. Human rabies of bat origin in Europe. *Lancet.* 1986; 1(8477): 378. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(86\)92336-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(86)92336-6)
49. McElhinney L.M., Marston D.A., Wise E.L., Freuling C.M., Bourhy H., Zanoni R., et al. Molecular epidemiology and evolution of European bat lyssavirus 2. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(1): 156. <https://doi.org/10.3390/ijms19010156>
50. Harris S.L., Brookes S.M., Jones G., Hutson A.M., Racey P.A., Aegerter J., et al. European bat lyssaviruses: Distribution, prevalence and implications for conservation. *Biol. Conserv.* 2006; 131(2): 193–210. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.04.006>
51. Johnson N., Wakeley P.R., Brookes S.M., Fooks A.R. European bat lyssavirus type 2 RNA in *Myotis daubentonii*. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(7): 1142–4. <https://doi.org/10.3201/eid1207.060287>
52. Johnson N., Vos A., Neubert L., Freuling C., Mansfield K.L., Kaipf I., et al. Experimental study of European bat lyssavirus type-2 infection in Daubenton's bats (*Myotis daubentonii*). *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt 11): 2662–72. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/003889-0>
53. Ботвинкин А.Д. Вирус бешенства выделен от летучей мыши в Западной Сибири. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 1988; 65(7): 97–8. <https://elibrary.ru/tfsull>
54. Карновой В.А., Зайковская А.В., Омиленко А.А., Рассадкин Ю.Н., Аксенов В.И., Чаусов Е.В., et al. Лиссавирусы у летучих мышей, обитающих на юге Западной Сибири. *Вопросы вирусологии.* 2005; 50(1): 31–4. <https://elibrary.ru/hrxxvd>
55. Karagulov A.I., Argimbayeva T.U., Omarova Z.D., Tulendibayev A.B., Dushayeva L.Z., Svitina M.A., et al. The prevalence of viral pathogens among bats in Kazakhstan. *Viruses.* 2022; 14(12): 2743. <https://doi.org/10.3390/v14122743>
56. Kuzmin I.V., Orciari L.A., Arai Y.T., Smith J.S., Hanlon C.A., Kameoka Y., et al. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. *Virus Res.* 2003; 97(2): 65–79. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(03\)00217-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(03)00217-x)
57. Botvinkin A.D., Poleschuk E.M., Kuzmin I.V., Borisova T.I., Gazaryan S.V., Yager P., et al. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9(12): 1623–5. <https://doi.org/10.3201/eid0912.030374>
58. Leonova G.N., Somova L.M., Belikov S.I., Kondratov I.G., Plekhova N.G., Krylova N.V., et al. The fatal case of lyssavirus encephalitis in the Russian Far East. *Encephalitis.* 2013. <https://doi.org/10.5772/52869>
59. Chen T., Miao F.M., Liu Y., Zhang S.F., Zhang F., Li N., et al. Possible transmission of Irkut virus from dogs to humans. *Biomed. Environ. Sci.* 2018; 31(2): 146–8. <https://doi.org/10.3967/bes2018.017>
60. Seidlova V., Zukal J., Brichta J., Anisimov N., Apoznański G., Bandouchova H., et al. Active surveillance for antibodies confirms circulation of lyssaviruses in Palearctic bats. *BMC Vet. Res.* 2020; 16(1): 482. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02702-y>
61. Wang Z., Huang G., Huang M., Dai Q., Hu Y., Zhou J., et al. Global patterns of phylogenetic diversity and transmission of bat coronavirus. *Sci. China Life Sci.* 2023; 66(4): 861–74. <https://doi.org/10.1007/s11427-022-2221-5>
62. Ruiz-Aravena M., McKee C., Gamble A., Lunn T., Morris A., Snedden C.E., et al. Ecology, evolution and spillover of coronaviruses from bats. *Nat. Rev. Microbiol.* 2022; 20(5): 299–314. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00652-2>
63. Alkhovskiy S., Lenshin S., Romashin A., Vishnevskaya T., Vyshemirskiy O., Bulycheva Y., et al. SARS-like coronaviruses in Horseshoe bats (*Rhinolophus* spp.) in Russia, 2020. *Viruses.* 2022; 14(1): 113. <https://doi.org/10.3390/v14010113>
64. Korneenko E.V., Samoilov A.E., Chudinov I.K., Butenko I.O., Sonets I.V., Artyushin I.V., et al. Alphacoronaviruses from bats captured in European Russia in 2015 and 2021 are closely related to those of Northern Europe. *Front. Ecol. Evol.* 2024; 12: 1324605. <https://doi.org/10.3389/fevo.2024.1324605>
65. Popov I.V., Ohlopkova O.V., Donnik I.M., Zolotukhin P.V., Umanets A., Golovin S.N., et al. Detection of coronaviruses in insectivorous bats of Fore-Caucasus, 2021. *Sci. Rep.* 2023; 13(1): 2306. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29099-6>
66. Speranskaya A.S., Artiushin I.V., Samoilov A.E., Korneenko E.V., Khabudaev K.V., Ilina E.N., et al. Identification and Genetic Characterization of MERS-Related Coronavirus Isolated from *Nathusius' Pipistrelle* (*Pipistrellus nathusii*) near Zvenigorod (Moscow Region, Russia). *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2023; 20(4): 3702. <https://doi.org/10.3390/ijerph20043702>
67. Яшина Л.Н., Жигалин А.В., Абрамов С.А., Лучникова Е.М., Сметанникова Н.А., Дупал Т.А. и др. Выявление коронавирусов (Coronaviridae) у рукокрылых на территории Северного Кавказа и юга Западной Сибири. *Вопросы вирусологии.* 2024; 69(3): 255–65. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-233> <https://elibrary.ru/konejo>

68. Corman V.M., Kallies R., Philipps H., Göpner G., Müller M.A., Eckerle I., et al. Characterization of a novel betacoronavirus related to middle East respiratory syndrome coronavirus in European hedgehogs. *J. Virol.* 2014; 88(1): 717–24. <https://doi.org/10.1128/JVI.01600-13>
69. Pomorska-Mól M., Ruszkowski J.J., Gogulski M., Domanska-Blicharz K. First detection of Hedgehog coronavirus 1 in Poland. *Sci. Rep.* 2022; 12(1): 2386. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06432-z>
70. Lau S.K.P., Luk H.K.H., Wong A.C.P., Fan R.Y.Y., Lam C.S.F., Li K.S.M., et al. Identification of a novel Betacoronavirus (Merbecovirus) in Amur hedgehogs from China. *Viruses.* 2019; 11(11): 980. <https://doi.org/10.3390/v11110980>
18. Müller M.A., Paweska J.T., Leman P.A., Drosten C., Grywna K., Kemp A., et al. Coronavirus antibodies in African bat species. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(9): 1367–70. <https://doi.org/10.3201/eid1309.070342>
19. Gloza-Rausch F., Ipsen A., Seebens A., Götttsche M., Panning M., Drexler J.F., et al. Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(4): 626–31. <https://doi.org/10.3201/eid1404.071439>
20. Carrington C.V., Foster J.E., Zhu H.C., Zhang J.X., Smith G.J., Thompson N., et al. Detection and phylogenetic analysis of group I coronaviruses in South American bats. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(12): 1890–3. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080642>
21. Annan A., Baldwin H.J., Corman V.M., Klose S.M., Owusu M., Nkrumah E.E., et al. Human betacoronavirus 2c EMC/2012-related viruses in bats, Ghana and Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(3): 456–9. <https://doi.org/10.3201/eid1903.121503>
22. Moreno A., Lelli D., de Sabato L., Zaccaria G., Boni A., Sozzi E., et al. Detection and full genome characterization of two beta CoV viruses related to Middle East respiratory syndrome from bats in Italy. *Virol. J.* 2017; 14(1): 239. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0907-1>
23. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020; 579(7798): 270–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
24. Forró B., Marton S., Fehér E., Domán M., Kemenesi G., Cadar D., et al. Phylogeny of Hungarian EBLV-1 strains using whole-genome sequence data. *Transbound. Emerg. Dis.* 2021; 68(3): 1323–31. <https://doi.org/10.1111/tbed.13789>
25. Selimov M.A., Tatarov A.G., Botvinkin A.D., Klueva E.V., Kulikova L.G., Khismatullina N.A. Rabies-related Yuli virus; identification with a panel of monoclonal antibodies. *Acta Virol.* 1989; 33(6): 542–6.
26. Smirnov D.G., Zabashta A.V. Distribution of the noctule bat (nyctalus noctula) in the Rostov region and the problem of expanding the northern boundary of its wintering area. *Rossiiskii zhurnal biologicheskikh invazii.* 2023; 14(4): 621–33. <https://doi.org/10.35885/1996-1499-16-3-168-183> <https://elibrary.ru/raavq> (in Russian)
27. Minoranskii V.A.E., Malinovkin A.V. Kul bat (pipistrellus kuhlii kuhli) in the Rostov region. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Severo-Kavkazskii region. Seriya: estestvennyye nauki.* 2015; (2): 80–3. <https://elibrary.ru/txjfq> (in Russian)
28. Alves D.M.C.C., Diniz-Filho J.A.F., Souza K.D, Gouveia S.F., Villalobos F. Geographic variation in the relationship between large-scale environmental determinants and bat species richness. *Basic Appl. Ecol.* 2018; 27: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2017.12.002>
29. Yang W., Schountz T., Ma W. Bat influenza viruses: current status and perspective. *Viruses.* 2021; 13(4): 547. <https://doi.org/10.3390/v13040547>
30. Folly A.J., Marston D.A., Golding M., Shukla S., Wilkie R., Lean F.Z.X., et al. Incursion of European Bat Lyssavirus 1 (EBLV-1) in serotine bats in the United Kingdom. *Viruses.* 2021; 13(10): 1979. <https://doi.org/10.3390/v13101979>
31. Harris S.L., Brookes S.M., Jones G., Hutson A.M., Racey P.A., Aegeter J., et al. European bat lyssaviruses: Distribution, prevalence and implications for conservation. *Biol. Conserv.* 2006; 131(2): 193–210. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.04.006>
32. Pérez-Jordá J.L., Ibáñez C., Muñoz-Cervera M., Téllez A. Lyssavirus in Eptesicus serotinus (Chiroptera: Vespertilionidae). *J. Wildl. Dis.* 1995; 31(3): 372–7. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-31.3.372>
33. Selimov M.A., Smekhov A.M., Antonova L.A., Shablovskaya E.A., King A.A., Kulikova L.G. New strains of rabies-related viruses isolated from bats in the Ukraine. *Acta Virol.* 1991; 35(3): 226–31.
34. Picard-Meyer E., Servat A., Wasniewski M., Gaillard M., Borel C., Cliquet F. Bat rabies surveillance in France: first report of unusual mortality among serotine bats. *BMC Vet. Res.* 2017; 13(1): 387. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1303-1>
35. Robardet E., Borel C., Moinet M., Jouan D., Wasniewski M., Barlat J., et al. Longitudinal survey of two serotine bat (Eptesicus serotinus) maternity colonies exposed to EBLV-1 (European Bat Lyssavirus type 1): Assessment of survival and serological status variations using capture-recapture models. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(11): e0006048. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006048>

REFERENCES

1. Van Brussel K., Holmes E.C. Zoonotic disease and virome diversity in bats. *Curr. Opin. Virol.* 2022; 52: 192–202. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.12.008>
2. Liu Z., Liu Q., Wang H., Yao X. Severe zoonotic viruses carried by different species of bats and their regional distribution. *Clin. Microbiol. Infect.* 2024; 30(2): 206–10. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.09.025>
3. Poleshchuk E.M., Tagakova D.N., Sidorov G.N., Orlova T.S., Gordeiko N.S., Kaisarov A.Z. Lethal cases of lyssavirus encephalitis in humans after contact with bats in the Russian Far East in 2019–2021. *Voprosy virusologii.* 2023; 68(1): 45–58. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-156> <https://elibrary.ru/bjmlbx>
4. Sidorchuk A.A. Book Review: Makarov V.V., Gulyukin A.M., Gulyukin M.I. Rabies: natural history at the turn of the century. Moscow: ZooVetKniga; 2015. *Voprosy virusologii.* 2018; 63(1): 48. <https://elibrary.ru/yoomce> (in Russian)
5. Alekseeva S.V. Book Review: Makarova V.V., Lozovogo D.A. New especially dangerous infections associated with bats. Vladimir; 2016. *Veterinariya segodnya.* 2017; (2): 67–8. <https://elibrary.ru/yrtnpb> (in Russian)
6. Gazaryan S.V., Bakhtadze G.B., Malinovkin A.V. Current state of knowledge of bats in Rostov region. *Plecotus et al.* 2010; (13): 50–8. <https://elibrary.ru/wcnffh> (in Russian)
7. Botvinkin A.D., Vakhrushev A.V., Kuz'min I.V., Morozov P.N., Shevynogov S.Z. From the history of bat observations in caves of Salair mountain ridge (Novosibirsk region). *Plecotus et al.* 2015; (18): 45–53. <https://elibrary.ru/vucezr> (in Russian)
8. Arai S., Yanagihara R. Genetic diversity and geographic distribution of bat-borne hantaviruses. *Curr. Issues. Mol. Biol.* 2020; 39: 1–28. <https://doi.org/10.21775/cimb.039.001>
9. Wang B., Yang X.L. Chirohepevirus from bats: insights into hepatitis E virus diversity and evolution. *Viruses.* 2022; 14(5): 905. <https://doi.org/10.3390/v14050905>
10. Kohl C., Nitsche A., Kurth A. Update on potentially zoonotic viruses of European bats. *Vaccines (Basel).* 2021; 9(7): 690. <https://doi.org/10.3390/vaccines9070690>
11. Johnson N., Cunningham A.F., Fooks A.R. The immune response to rabies virus infection and vaccination. *Vaccine.* 2010; 28(23): 3896–901. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.03.039>
12. Wambugu E.N., Kimita G., Kituyi S.N., Washington M.A., Masakhwe C., Mutunga L.M., et al. Geographic distribution of rabies virus and genomic sequence alignment of wild and vaccine strains, Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* 2024; 30(8): 1642–50. <https://doi.org/10.3201/eid3008.230876>
13. Maier H.J., Bickerton E., Britton P. Preface. Coronaviruses. *Methods Mol. Biol.* 2015; 1282: v. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2438-7>
14. de Vries A.A.F., Horzinek M.C., Rottier P.J.M., de Groot R.J. The genome organization of the nidovirales: similarities and differences between Arteri-, Toro-, and Coronaviruses. *Semin. Virol.* 1997; 8(1): 33–47. <https://doi.org/10.1006/smvy.1997.0104>
15. Poon L.L., Chu D.K., Chan K.H., Wong O.K., Ellis T.M., Leung Y.H., et al. Identification of a novel coronavirus in bats. *J. Virol.* 2005; 79(4): 2001–9. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.4.2001-2009.2005>
16. Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J.H., et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. *Science.* 2005; 310(5748): 676–9. <https://doi.org/10.1126/science.1118391>
17. Dominguez S.R., O'Shea T.J., Oko L.M., Holmes K.V. Detection of group I coronaviruses in bats in North America. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(9): 1295–300. <https://doi.org/10.3201/eid1309.070491>

36. Mingo-Casas P., Sandonis V., Obón E., Berciano J.M., Vázquez-Morón S., Juste J., et al. First cases of European bat lyssavirus type 1 in Iberian serotine bats: Implications for the molecular epidemiology of bat rabies in Europe. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(4): e0006290. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006290>
37. Freuling C., Vos A., Johnson N., Kaipf I., Denzinger A., Neubert L., et al. Experimental infection of serotine bats (*Eptesicus serotinus*) with European bat lyssavirus type 1a. *J. Gen. Virol.* 2009; 90(Pt 10): 2493–502. <https://doi.org/10.1099/vir.0.011510-0>
38. Rønsholt L., Sørensen K.J., Brusckhe C.J., Wellenberg G.J., van Oirschot J.T., Johnstone P., et al. Clinically silent rabies infection in (zoo) bats. *Vet. Rec.* 1998; 142(19): 519–20. <https://doi.org/10.1136/vr.142.19.519>
39. Van der Poel W.H., van der Heide R., van Amerongen G., van Keulen L.J., Wellenberg G.J., Bourhy H., et al. Characterisation of a recently isolated lyssavirus in frugivorous zoo bats. *Arch. Virol.* 2000; 145(9): 1919–31. <https://doi.org/10.1007/s007050070066>
40. Kuz'min I.V., Botvinkin A.D., Shaïmardanov R.T. Experimental lyssavirus infection in chiropters. *Voprosy virusologii.* 1994; 39(1): 17–21.
41. Franka R., Johnson N., Müller T., Vos A., Neubert L., Freuling C., et al. Susceptibility of North American big brown bats (*Eptesicus fuscus*) to infection with European bat lyssavirus type 1. *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt 8): 1998–2010. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83688-0>
42. Liu Y., Zhang S., Zhao J., Zhang F., Hu R. Isolation of Irkut virus from a *Murina leucogaster* bat in China. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7(3): e2097. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002097>
43. Kuzmin I.V., Botvinkin A.D., Poleschuk E.M., Orciari L.A., Rupprecht C.E. Bat rabies surveillance in the former Soviet Union. *Dev. Biol. (Basel)*. 2006; 125: 273–82.
44. Regnault B., Evrard B., Plu I., Dacheux L., Troadec E., Cozette P., et al. First case of lethal encephalitis in Western Europe due to European bat lyssavirus type 1. *Clin. Infect. Dis.* 2022; 74(3): 461–6. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab443>
45. Tjørnehøj K., Fooks A.R., Agerholm J.S., Rønsholt L. Natural and experimental infection of sheep with European bat lyssavirus type-1 of Danish bat origin. *J. Comp. Pathol.* 2006; 134(2-3): 190–201. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.10.005>
46. Müller T., Cox J., Peter W., Schäfer R., Johnson N., McElhinney L.M., et al. Spill-over of European bat lyssavirus type 1 into a stone marten (*Martes foina*) in Germany. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health.* 2004; 51(2): 49–54. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2003.00725.x>
47. Dacheux L., Larrous F., Mailles A., Boisseleau D., Delmas O., Biron C., et al. European bat Lyssavirus transmission among cats, Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(2): 280–4. <https://doi.org/10.3201/eid1502.080637>
48. Lumio J., Hillbom M., Roine R., Ketonen L., Haltia M., Valle M., et al. Human rabies of bat origin in Europe. *Lancet.* 1986; 1(8477): 378. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(86\)92336-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(86)92336-6)
49. McElhinney L.M., Marston D.A., Wise E.L., Freuling C.M., Bourhy H., Zannoni R., et al. Molecular epidemiology and evolution of European bat lyssavirus 2. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(1): 156. <https://doi.org/10.3390/ijms19010156>
50. Harris S.L., Brookes S.M., Jones G., Hutson A.M., Racey P.A., Aegerter J., et al. European bat lyssaviruses: Distribution, prevalence and implications for conservation. *Biol. Conserv.* 2006; 131(2): 193–210. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.04.006>
51. Johnson N., Wakeley P.R., Brookes S.M., Fooks A.R. European bat lyssavirus type 2 RNA in *Myotis daubentonii*. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(7): 1142–4. <https://doi.org/10.3201/eid1207.060287>
52. Johnson N., Vos A., Neubert L., Freuling C., Mansfield K.L., Kaipf I., et al. Experimental study of European bat lyssavirus type-2 infection in Daubenton's bats (*Myotis daubentonii*). *J. Gen. Virol.* 2008; 89(Pt. 11): 2662–72. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/003889-0>
53. Botvinkin A.D. Rabies virus was isolates from a bat in Western Siberia. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 1988; 65(7): 97–8. <https://elibrary.ru/tfsull> (in Russian)
54. Ternovoi V.A., Zaikovskaia A.V., Tomilenko A.A., Rassadkin Yu.N., Aksenov V.I., Chausov E.V., et al. Lyssavirus in bats residing in the South of West Siberia. *Voprosy virusologii.* 2005; 50(1): 31–4. <https://elibrary.ru/hrxxvd> (in Russian)
55. Karagulov A.I., Argimbayeva T.U., Omarova Z.D., Tulendibayev A.B., Dushayeva L.Z., Svotina M.A., et al. The prevalence of viral pathogens among bats in Kazakhstan. *Viruses.* 2022; 14(12): 2743. <https://doi.org/10.3390/v14122743>
56. Kuzmin I.V., Orciari L.A., Arai Y.T., Smith J.S., Hanlon C.A., Kameoka Y., et al. Bat lyssaviruses (Aravan and Khujand) from Central Asia: phylogenetic relationships according to N, P and G gene sequences. *Virus Res.* 2003; 97(2): 65–79. [https://doi.org/10.1016/s0168-1702\(03\)00217-x](https://doi.org/10.1016/s0168-1702(03)00217-x)
57. Botvinkin A.D., Poleschuk E.M., Kuzmin I.V., Borisova T.I., Gazaryan S.V., Yager P., et al. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9(12): 1623–5. <https://doi.org/10.3201/eid0912.030374>
58. Leonova G.N., Somova L.M., Belikov S.I., Kondratov I.G., Plekhova N.G., Krylova N.V., et al. The fatal case of lyssavirus encephalitis in the Russian Far East. *Encephalitis.* 2013. <https://doi.org/10.5772/52869>
59. Chen T., Miao F.M., Liu Y., Zhang S.F., Zhang F., Li N., et al. Possible transmission of Irkut virus from dogs to humans. *Biomed. Environ. Sci.* 2018; 31(2): 146–8. <https://doi.org/10.3967/bes2018.017>
60. Seidlova V., Zukal J., Brichta J., Anisimov N., Apoznański G., Bandouchova H., et al. Active surveillance for antibodies confirms circulation of lyssaviruses in Palearctic bats. *BMC Vet. Res.* 2020; 16(1): 482. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02702-y>
61. Wang Z., Huang G., Huang M., Dai Q., Hu Y., Zhou J., et al. Global patterns of phylogenetic diversity and transmission of bat coronavirus. *Sci. China Life Sci.* 2023; 66(4): 861–74. <https://doi.org/10.1007/s11427-022-2221-5>
62. Ruiz-Aravena M., McKee C., Gamble A., Lunn T., Morris A., Snedden C.E., et al. Ecology, evolution and spillover of coronaviruses from bats. *Nat. Rev. Microbiol.* 2022; 20(5): 299–314. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00652-2>
63. Alkhovskiy S., Lenshin S., Romashin A., Vishnevskaya T., Vyshemirskiy O., Bulycheva Y., et al. SARS-like coronaviruses in Horseshoe bats (*Rhinolophus* spp.) in Russia, 2020. *Viruses.* 2022; 14(1): 113. <https://doi.org/10.3390/v14010113>
64. Korneenko E.V., Samoïlov A.E., Chudinov I.K., Butenko I.O., Sonets I.V., Artyushin I.V., et al. Alphacoronaviruses from bats captured in European Russia in 2015 and 2021 are closely related to those of Northern Europe. *Front. Ecol. Evol.* 2024; 12: 1324605. <https://doi.org/10.3389/fevo.2024.1324605>
65. Popov I.V., Ohlopokova O.V., Donnik I.M., Zolotukhin P.V., Umanets A., Golovin S.N., et al. Detection of coronaviruses in insectivorous bats of Fore-Caucasus, 2021. *Sci. Rep.* 2023; 13(1): 2306. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-29099-6>
66. Speranskaya A.S., Artiushin I.V., Samoïlov A.E., Korneenko E.V., Khabudaev K.V., Ilina E.N., et al. Identification and Genetic Characterization of MERS-Related Coronavirus Isolated from *Nathusius' Pipistrelle* (*Pipistrellus nathusii*) near Zvenigorod (Moscow Region, Russia). *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2023; 20(4): 3702. <https://doi.org/10.3390/ijerph20043702>
67. Yashina L.N., Zhigalin A.V., Abramov S.A., Luchnikova E.M., Smetannikova N.A., Dupal T.A., et al. Coronaviruses (Coronaviridae) of bats in the northern Caucasus and south of western Siberia. *Voprosy virusologii.* 2024; 69(3): 255–65. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-233> <https://elibrary.ru/konejo>
68. Corman V.M., Kallies R., Philipps H., Göpner G., Müller M.A., Eckerle I., et al. Characterization of a novel betacoronavirus related to middle East respiratory syndrome coronavirus in European hedgehogs. *J. Virol.* 2014; 88(1): 717–24. <https://doi.org/10.1128/JVI.01600-13>
69. Pomorska-Mól M., Ruszkowski J.J., Gogulski M., Domanska-Blicharz K. First detection of Hedgehog coronavirus 1 in Poland. *Sci. Rep.* 2022; 12(1): 2386. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06432-z>
70. Lau S.K.P., Luk H.K.H., Wong A.C.P., Fan R.Y.Y., Lam C.S.F., Li K.S.M., et al. Identification of a novel Betacoronavirus (Merbecovirus) in Amur hedgehogs from China. *Viruses.* 2019; 11(11): 980. <https://doi.org/10.3390/v11110980>

Информация об авторах:

Охлопкова Олеся Викторовна✉ – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной фармакологии отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия; старший научный сотрудник лаборатории геномики и эволюции вирусов НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ, Новосибирск, Россия. E-mail: ohlopkova.lesia@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8214-7828>

Кононова Юлия Владимировна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник НИИ вирусологии ФИЦ ФТМ, Новосибирск, Россия. E-mail: yuliakononova07@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3677-3668>

Тюменцева Марина Алексеевна – канд. биол. наук, заведующий лабораторией геномного редактирования отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: tyumantseva@cmd.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3145-3702>

Тюменцев Александр Игоревич – канд. биол. наук, заведующий лабораторией экспериментальной фармакологии отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: tyumantsev@cmd.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0537-2586>

Шестопалов Александр Михайлович – д-р биол. наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, директор НИИ Вирусологии ФИЦ ФТМ, Новосибирск, Россия. E-mail: amshestopalov@frcftm.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9734-0620>

Акимкин Василий Геннадьевич – д-р мед. наук, академик РАН, профессор, заслуженный врач Российской Федерации, лауреат Премии Правительства Российской Федерации в области науки и техники, директор ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: akimkin@pcr.ms; <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Участие авторов: Охлопкова О.В. – написание текста, сбор и анализ литературных данных; Кононова Ю.В. – написание разделов зоологического профиля, обобщение данных по рукокрылым в анализируемых регионах; Шестопалов А.М. – обобщение данных, анализ вирусологических разделов; Тюменцева М.А., Тюменцев А.И. – обобщение данных, оформление рукописи; Акимкин В.Г. – критический анализ материала, рецензирование, администрирование.

Поступила 28.08.2024
Принята в печать 16.10.2024
Опубликована 31.10.2024

Information about the authors:

Olesia V. Ohlopkova✉ – PhD in Biology, Senior Researcher of the Laboratory of Experimental Pharmacology, Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia; Research Institute of Virology, FRC FTM, Novosibirsk, Russia. E-mail: ohlopkova.lesia@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8214-7828>

Yulia V. Kononova – PhD in Biology, Senior Researcher at the Research Institute of Virology, Federal Research Center for Physics and Technology, Novosibirsk, Russia. E-mail: yuliakononova07@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3677-3668>

Marina A. Tyumentseva – PhD in Biology, Head of the Laboratory of Genomic Editing of the Department of Molecular Diagnostics and Epidemiology of the Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia. E-mail: tyumantseva@cmd.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3145-3702>

Alexander I. Tyumentsev – PhD in Biology, Head of the Laboratory of Experimental Pharmacology, Department of Molecular Diagnostics and Epidemiology, FBUN Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia. E-mail: tyumantsev@cmd.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0537-2586>

Alexander M. Shestopalov – Doctor of Biological Sciences, Professor, Honored Worker of Science of the Russian Federation, Director of the Research Institute of Virology FRC FTM, Novosibirsk, Russia. E-mail: amshestopalov@frcftm.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9734-0620>

Vasily G. Akimkin – Doctor of Medical Sciences, Academician of the Russian Academy of Sciences, Professor, Honored Doctor of the Russian Federation, Laureate of the Prize of the Government of the Russian Federation in the field of science and technology, Director of the Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia. E-mail: akimkin@pcr.ms; <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Contribution: Ohlopkova O.V. – writing the text, collecting and analyzing literary data; Kononova Yu.V. – writing sections of the zoological profile, generalizing data on bats in the analyzed regions; Shestopalov A.M. – data generalization, analysis of virological sections; Tyumentseva M.A., Tyumentsev A.I. – data generalization, manuscript design; Akimkin V.G. – critical analysis of the material, reviewing, administration.

Received 28 August 2024
Accepted 16 October 2024
Published 31 October 2024

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**ORIGINAL STUDY ARTICLE**DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-234>

© ADEIZA S.S., ISLAM MD.A., MUNGADI H.U., SHUAIBU A.B., SAH R., 2024

A preregistered meta-meta-analysis on the global distribution of Hepatotropic Viruses

Shuaibu S. Adeiza^{1,2}✉, Md. Aminul Islam^{3,4}, Hauwa'u U. Mungadi⁵, Abdulmalik B. Shuaibu⁶, Ranjit Sah^{7,8}¹Dept of Pharmaceutical Microbiology & Biotechnology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria;²Dept of Clinical Pharmacy and Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Usmanu Danfodiyo University Sokoto, Nigeria;³Advanced Molecular Lab, Department of Microbiology, President Abdul Hamid Medical College, Karimganj, Kishoreganj, 2310, Bangladesh;⁴COVID-19 Diagnostic lab, Department of Microbiology, Noakhali Science and Technology University, Noakhali, 3814, Bangladesh;⁵Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Usmanu Danfodiyo University, Sokoto, Nigeria;⁶Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Usmanu Danfodiyo University, Sokoto, Nigeria;⁷Department of Microbiology, Tribhuvan University Teaching Hospital, Institute of Medicine, Kathmandu 44600, Nepal;⁸Department of Microbiology, Dr. D. Y. Patil Medical College, Hospital and Research Centre, Dr. D.Y. Patil Vidyapeeth, Pune, 411018, Maharashtra, India

Abstract

Introduction. Hepatotropic viruses (HAV, HBV, HCV, HDV, and HEV) significantly impact global health, with varying prevalence across regions.**Objective.** This study aims to systematically consolidate data from diverse meta-analyses to provide a contemporary reference on virus distribution and prevalence.**Materials and methods.** Adhering to PRISMA guidelines, the study utilized a mixed effects model for data integration. Quality evaluation was carried out with QUOROM and AMSTAR tools, with heterogeneity assessed via the Higgins I² statistic, Q-statistic and Tau squared (τ^2) values.**Results.** The study analyzed 86 meta-analyses from 56 studies (2017–2022) with minimal overlap. Prevalence rates by region were as follows: MENA – 29.2%, Afghanistan – 9.14%, Africa – 8.10%. Prevalence rates by virus type: HAV – 82.5%, HBV – 8.6%, HCV – 15.1%, HDV – 8.9%, HEV – 13.9%, dual HBV-HCV coinfection – 2.2%. Prevalence rates by risk groups: general population – 8.3%, healthcare workers – 4.0%. Continent-specific HBV-HCV prevalence rates: Africa – 9.2%, China – 6.9%, others. HCV prevalence rates among at-risk groups: healthcare workers – 5.58%, hemodialysis patients – 34.8%. Regional HCV rates: Africa – 7.42%, Middle East – 25.30%.**Conclusion.** Diverse global hepatotropic virus prevalence patterns are influenced by multifaceted factors. MENA faces higher rates due to healthcare challenges, while Africa struggles with limited resources. Tailored public health strategies, including vaccination and awareness campaigns, are essential to alleviate burdens and enhance global health. This consolidated data serves as a valuable resource for informed decision-making.**Keywords:** *Hepatitis; Hepatotropic viruses; meta-analyses; HAV; HBV; HCV; HDV; HEV***For citation:** Adeiza S.S., Islam M.A., Mungadi H.U., Shuaibu A.B., Sah R. A preregistered meta-meta-analysis on the global distribution of Hepatotropic Viruses. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(5): 429–440. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-234> EDN: <https://elibrary.ru/txidjt>**Funding.** This study was not supported by any external sources of funding.**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-234>

Пререгистрированный мета-метаанализ глобального распространения гепатотропных вирусов

Shuaibu S. Adeiza^{1,2}✉, Md. Aminul Islam^{3,4}, Hauwa'u U. Mungadi⁵,
Abdulmalik B. Shuaibu⁶, Ranjit Sah^{7,8}

¹Кафедра фармацевтической микробиологии и биотехнологии, Факультет фармацевтических наук, Университет Ахмаду Белло, Зария, Нигерия;

²Кафедра клинической фармации и фармацевтической практики, Факультет фармацевтических наук, Усману Дафодию Университет, Сокото, Нигерия;

³Продвинутая молекулярная лаборатория, Кафедра микробиологии, Медицинский колледж президента Абдула Хамида, Каримгандж, Кишорегандж, 2310, Бангладеш;

⁴Лаборатория диагностики COVID-19, Кафедра микробиологии, Университет науки и технологий Ноакхали, Ноакхали, 3814, Бангладеш;

⁵Кафедра ветеринарной медицины, Факультет ветеринарной медицины, Усману Данфодию Университет, Сокото, Нигерия;

⁶Кафедра ветеринарной микробиологии, Факультет ветеринарной медицины, Университет Усману Данфодию, Сокото, Нигерия;

⁷Кафедра микробиологии, Университетская больница Трибхуван, Институт медицины, Катманду, 44600, Непал;

⁸Кафедра микробиологии, Медицинский колледж, больница и научно-исследовательский центр Д.Д. Патиля, Университет Д.Д. Патиля, Пуна, 411018, Махараштра, Индия

Резюме

Введение. Гепатотропные вирусы (ВГА, ВГВ, ВГС, ВГД и ВГЕ) значительно влияют на мировое здравоохранение при их различной распространенности в разных регионах мира.

Цель исследования. Настоящее исследование направлено на систематическую консолидацию данных из разных метаанализов для оценки распределения и распространенности гепатотропных вирусов.

Материалы и методы. Следуя рекомендациям PRISMA, в исследовании использовали модель смешанных эффектов для интеграции данных. Оценку качества проводили с использованием инструментов QUOROM и AMSTAR, с оценкой гетерогенности по статистикам I^2 Хиггинса, Q-статистике и значениям тау квадрат (τ^2).

Результаты. В исследование проанализированы 86 метаанализов из 56 исследований (2017–2022 гг.) с минимальным перекрытием. Распространенность по регионам была следующей: MENA – 29,2%, Афганистан – 9,14%, Африка – 8,10%. Распространенность подгрупп вирусов: ВГА – 82,5%, ВГВ – 8,6%, ВГС – 15,1%, ВГД – 8,9%, ВГЕ – 13,9%, двойная коинфекция ВГВ/ВГС – 2,2%. Распространенность по группам риска: общее население – 8,3%, медицинские работники – 4,0%. Распространенность ВГВ/ВГС по континентам: Африка – 9,2%, Китай – 6,9% и др. Распространенность ВГС среди групп риска: медицинские работники – 5,58%, пациенты на гемодиализе – 34,8%. Региональные показатели распространенности ВГС: Африка – 7,42%, Ближний Восток – 25,30%.

Заключение. Различия паттернов распространенности гепатотропных вирусов в разных регионах мира обусловлены влиянием многих факторов. Для стран MENA более высокие показатели распространенности связаны с проблемами в здравоохранении, в то время как для Африки наибольшей проблемой являются ограниченные ресурсы. Необходимы индивидуализированные стратегии общественного здравоохранения, включая вакцинацию и информационно-просветительские кампании, для смягчения бремени и улучшения мирового здравоохранения. Полученные консолидированные данные о распространенности гепатотропных вирусов послужат ценным источником информации для принятия обоснованных решений.

Ключевые слова: гепатит; гепатотропные вирусы; метаанализы; ВГА; ВГВ; ВГС; ВГД; ВГЕ

Для цитирования: Adeiza S.S., Islam M.A., Mungadi H.U., Shuaibu A.B., Sah R. Пререгистрированный мета-метаанализ по глобальному распространению гепатотропных вирусов. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(5): 429–440. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-234> EDN: <https://elibrary.ru/txidjt>

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

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

Introduction

Hepatotropic viruses, including Hepatitis A virus (HAV), Hepatitis B virus (HBV), Hepatitis C virus (HCV), Hepatitis D virus (HDV), and Hepatitis E virus (HEV), present a formidable global health challenge [1].

These viruses have different effects on the liver, ranging from mild acute hepatitis to potentially fatal conditions such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1, 2]. A comprehensive understanding of these viral agents, specifically their prevalence, transmission dynamics, preventive strategies, treatment outcomes, economic impli-

cations and associated challenges, is imperative to effectively address their intricate impact on global health as they cause infection in both humans and animals. Aside from HEV, the rest of the hepatitis viruses are only able to infect humans and apes. HAV can also infect a wide range of non-human primates. Although other hepadnaviruses and hepaciviruses are present in different animal species, evidence supporting the presence of HBV or HCV in animals have not been reported.

Chronic HBV and HCV infections stand out among hepatotropic viruses due to their prolonged global health impact [2]. These infections not only contribute substantially to the worldwide disease burden but also incur significant economic costs through healthcare expenses and reduced productivity [3]. HBV related viruses have been found in primates, rodents, bats and birds. Infection with HCV has been reported in humans and chimpanzees only, while HEV genotypes 1 and 2 cause infections only in humans, genotypes 3 and 4 infect animals and can be transmitted between humans and other animal species. HEV causing liver diseases can have zoonotic origin. Transmission is associated with animal contact and ingestion of raw or uncooked meat, especially the liver. Success in navigating the complexities of chronic HBV and HCV infections requires effective preventive measures, early diagnosis and accessible treatment options to mitigate the individual, societal and economic burdens [3].

Global efforts have been undertaken to combat hepatotropic viral infections, with successful vaccines against HAV and HBV leading to reduced infection rates, particularly among high-risk groups and infants. Moreover, the advent of direct-acting antivirals (DAAs) has revolutionized HCV treatment by achieving unprecedented cure rates [4]. Despite these advancements, challenges such as unequal vaccine coverage, limited diagnostic and treatment access, as well as the emergence of drug resistance persist as obstacles in the pursuit of controlling these infections [2].

Multiple meta-analyses are conducted annually to explore diverse aspects of hepatotropic viral infections, each focusing on specific characteristics of the infections [5–9]. However, these analyses often lack a comprehensive perspective and may inadvertently overlook critical nuances.

While remarkable therapeutic progress has been made, the economic viability of interventions remains a pressing concern. Chronic HCV infections are particularly prevalent, affecting more than 56.8 million individuals globally in 2020 [10]. However, the availability of oral DAAs, which have transformed HCV treatment outcomes, comes at a substantial cost [11]. A study highlighted the exorbitant expenses, with a single pill of a hepatitis C drug priced at \$1,000 and a 12-week treatment regimen totaling \$84,000 [11]. Furthermore, another DAA was identified with a monthly cost of \$23,600, potentially extending treatment duration to six months or a year. Cirrhosis also incurs significant expenses, with approximately 66% of liver-related expenditures in the United States (totaling \$32.5 billion with a 95% confidence interval ranging from \$27.0 billion to \$40.4 billion) linked to hospital stays or urgent care visits [2].

Amid the complexities of diagnosis and treatment affordability, a universal screening strategy emerges as a viable solution to enhance screening and diagnosis rates for hepatotropic viral infections. This strategy could lead to early detection, allowing for timely intervention and mitigating the long-term health and economic impacts associated with chronic infections. Furthermore, universal screening could play a pivotal role in global public health initiatives aimed at achieving the ambitious World Health Organization (WHO) goal of eliminating viral hepatitis as a public health threat by 2030.

The meta-meta-analysis approach, which synthesizes data from diverse meta-analyses, offers a more comprehensive and interconnected perspective [12]. By amalgamating insights from various meta-analyses on HAV, HBV, HCV, HDV and HEV, this approach has the potential to uncover overarching trends, identify disparities and address knowledge gaps more effectively. In light of these considerations, our meta-meta-analysis seeks to provide a comprehensive and multifaceted perspective of hepatotropic viral infections, informing evidence-based interventions and underscoring the importance of universal screening strategies.

Materials and methods

This meta-meta-analysis was designed to estimate the accumulated burden of hepatotropic viruses from various meta-analyses, providing a more comprehensive and interconnected perspective. The study adhered to the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses or PRISMA [13] guidelines for its literature review, employing a comprehensive search across Scopus, PubMed and Google Scholar databases, with specific search strings provided in supplementary files. The study was pre-registered at the Open Science Framework (osf.io/hzy3n). The focus of this review encompassed systematic reviews and meta-analyses investigating the collective prevalence of hepatitis viruses (HAV, HBV, HCV, HDV and HEV). Eligible meta-analytic research was required to follow PRISMA guidelines, employ the REM (random effects model) method for data aggregation, and disclose viral detection techniques (ELISA, ICT or PCR). Setting type and publication year were not limiting factors, while excluded studies lacked proper data pooling through REM analysis, well-defined search algorithms, or clear selection criteria. Studies without information about the population at risk were also excluded.

Data extracted from included meta-analyses covered study names, publication years, sample sizes, effect size data, populations at risk, number of searched databases and review year ranges. Aggregation was performed based on event counts and corresponding sample sizes. In cases where sample sizes were absent, evidence was derived from effect size data, and missing event numbers were synthesized using point estimates and sample size details. The mixed effects model was applied to integrate these aggregation techniques, with the analysis conducted using Comprehensive Meta-Analysis (CMA Version 4).

The quality and robustness of included meta-analyses were assessed using the Quality of Reporting of

Meta-analyses (QUOROM) [14] checklist and the Assessment of Multiple Systematic Reviews (AMSTAR) [15, 16]. The heterogeneity assessment utilized the Higgins I^2 statistic, where values below 25% indicated low heterogeneity, and values above 75% indicated high heterogeneity [17, 18]. The Q-statistic measures variability in meta-analysis. Low values imply chance, high values show substantial heterogeneity [19]. Tau squared (τ^2) measures between-study variance and true heterogeneity. High values signify greater variation beyond chance [20].

Results

This study incorporated 86 meta-analyses from 55 studies [5–9, 21–66], covering an average sample size of 1,070,005 samples from 553 distinct studies conducted between 1964 and 2019 (Fig. 1 and Table S1). The included meta-analyses, published between 2017 and 2022, exhibited a low degree of overlap (0.0009875847) in their primary studies. The prevalence of hepatotropic viruses ranged from 0.70% to 92.0%. The assessed meta-analyses varied in AMSTAR and QUOROM scores, spanning from 7 to 10 and 9 to 14, respectively.

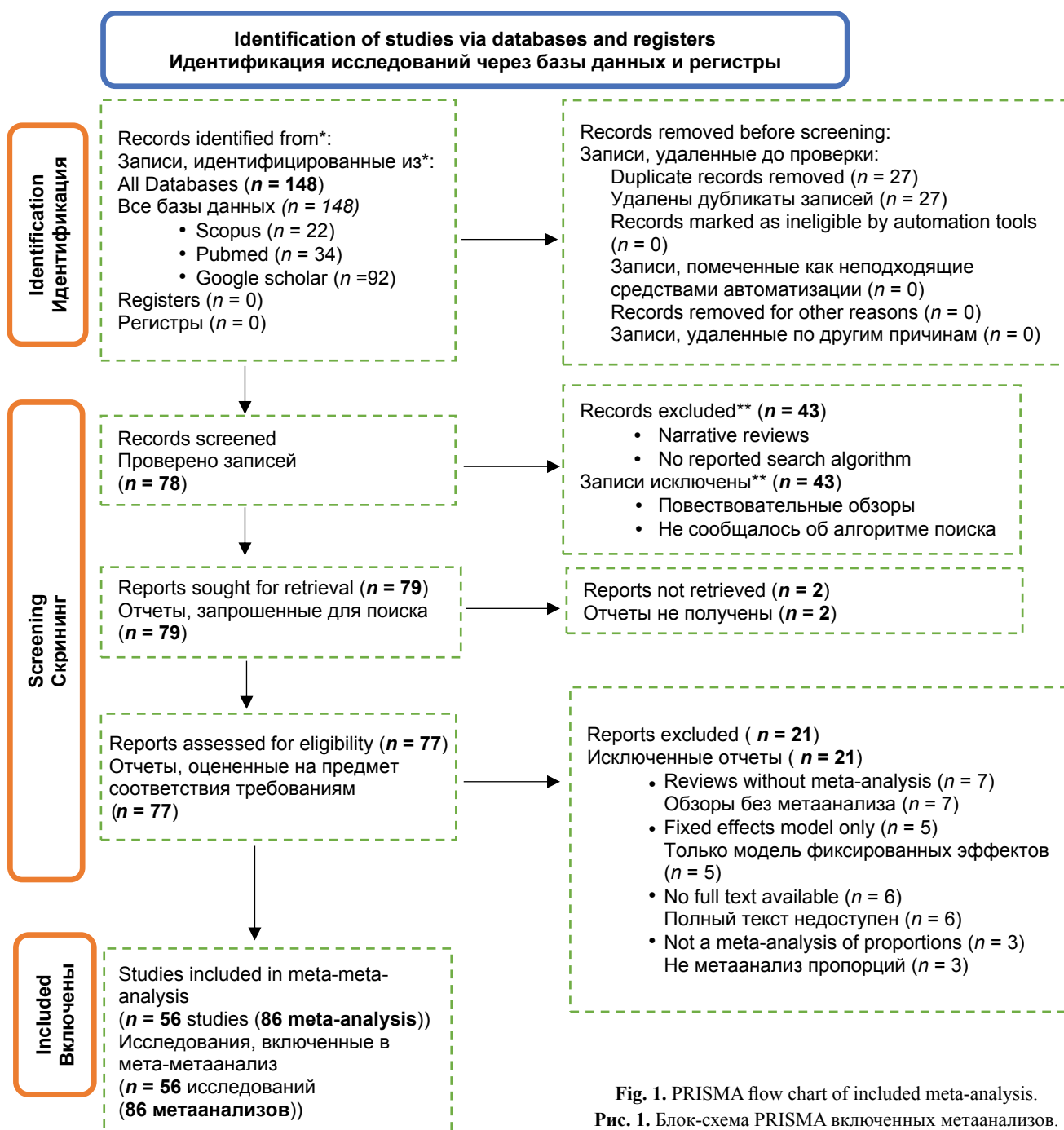


Fig. 1. PRISMA flow chart of included meta-analysis.
Рис. 1. Блок-схема PRISMA включенных метаанализов.

ORIGINAL RESEARCHES

to 29.3), Ghana (15.68%, 95% CI: 6.57 to 32.3), Nigeria (11.39%, 95% CI: 7.96 to 16.3), North Africa (5.01%, 95% CI: 4.43 to 66.3), Americas (9.30%, 95% CI: 6.40 to 13.3), USA and Latin Americas (7.10%, 95% CI: 6.93 to 28.3), Arabian Gulf (9.36%, 95% CI: 1.80 to 36.3), Asia (31.00%, 95% CI: 29.76 to 32.3), China (6.89%, 95% CI: 6.87 to 91.3), East Africa (6.03%, 95% CI: 5.96 to 9.3), EMRO (34.20%, 95% CI: 31.73 to 36.3), Europe-Africa-Asia

(16.50%, 95% CI: 15.66 to 17.3), Europe-Africa-Asia-America-Australia (17.70%, 95% CI: 17.50 to 17.3), Europe-Africa-Asia-Americas (26.00%, 95% CI: 25.97 to 26.3), Europe-Asia-America-Australia (12.47%, 95% CI: 12.42 to 12.3), Europe-Asia-Americas (20.30%, 95% CI: 19.25 to 21.3), Europe-Asia-Americas-Oceania (88.60%, 95% CI: 78.28 to 94.3), and global (2.30%, 95% CI: 2.24 to 36.3).

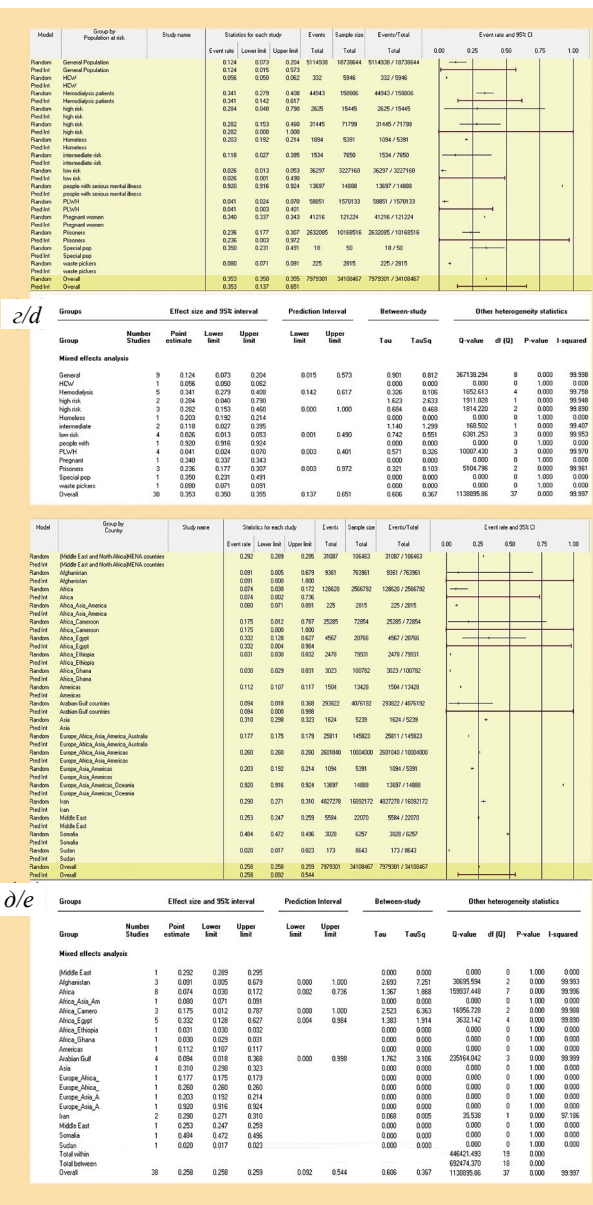
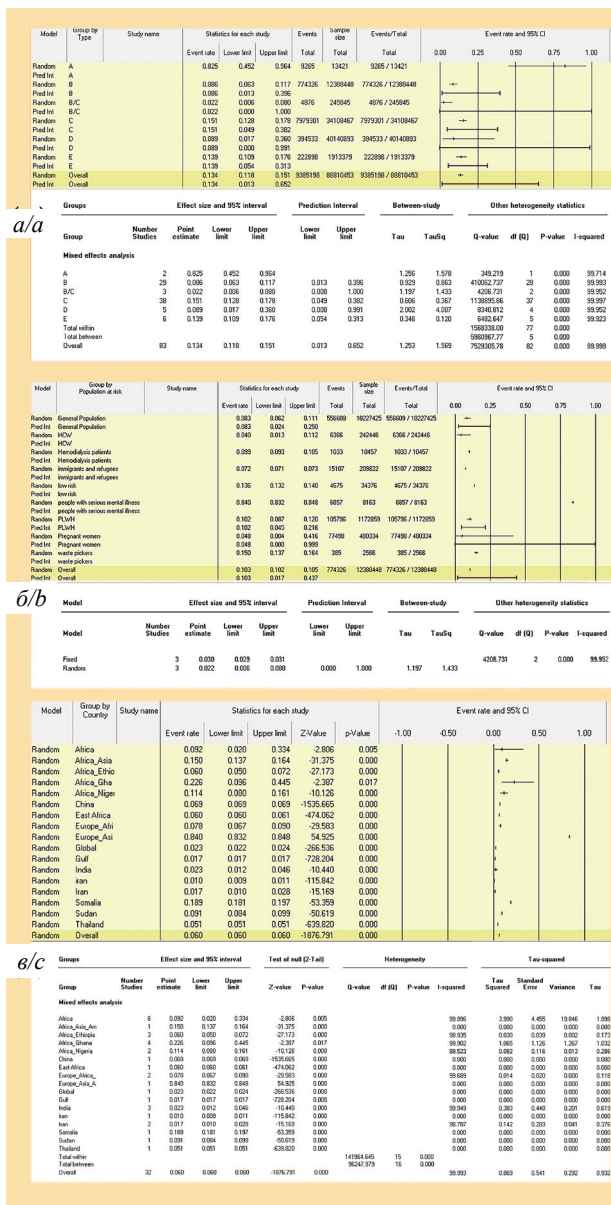


Fig. 3. Forest plot of: Subgroup analysis by Virus types (a); Composite prevalence rates of HBV infection among different risk groups (b); Prevalence of HBV varied across different continents (c); Prevalence of HCV among populations at risk (d); Regional prevalence of HCV (e). Note that no data pooling was performed for subgroups with only one study in its category, resulting in between-study and other heterogeneity statistics being reported as 0 and I-value of 1. However, each subgroup still contributed to the overall effect of the study.

Рис. 3. Форест-график: анализ подгрупп по типам вируса (a); совокупные показатели распространенности инфекции HBV среди разных групп риска (b); различия распространенности HBV на разных континентах (c); распространенность HCV среди групп риска (d); региональная распространенность HCV (e).

Примечание: объединение данных не проводилось для подгрупп с единственным исследованием в своей категории, в результате чего статистические данные между исследованиями и другие показатели гетерогенности были представлены как 0, а $p = 1$. Однако каждая подгруппа по-прежнему внесла вклад в общий эффект исследования.

Assessment of Heterogeneity in Prevalence Rates (Fig. 2 b): The Q-value, a metric assessing overall heterogeneity, showed a notable outcome ($Q = 6486740.461$, $df = 32$, $p < 0.001$). The I^2 statistic, reflecting the extent of authentic heterogeneity, was observed to be around 99.95%. Furthermore, the calculated tau squared (τ^2) value, capturing the variance among studies, was determined as 1.5679.

Subgroup analysis by types (Fig. 3 a): HAV (82.5%, 95% CI: 45.2 to 96.4), HBV (8.6%, 95% CI: 6.3 to 11.7), HCV (15.1%, 95% CI: 12.8 to 17.8), HDV (8.9%, 95% CI: 1.7 to 36.0), HEV (13.9%, 95% CI: 10.9 to 17.6), dual HBV and HCV coinfection (2.2%, 95% CI: 0.6 to 8.0).

Composite prevalence rates of HBV infection among different risk groups (Fig. 3 b): General population (8.3%, 95% CI: 6.2 to 11.1), healthcare workers (4.0%, 95% CI: 1.3 to 11.2), hemodialysis patients (9.0%, 95% CI: 9.3 to 10.5), immigrants and refugees (7.2%, 95% CI: 7.1 to 7.3), low-risk patients (13.6%, 95% CI: 13.2 to 14.0), people with mental illness (84.0%, 95% CI: 83.2 to 84.8), pregnant women (4.8%, 95% CI: 0.4 to 41.6), PLWH (10.2%, 95% CI: 8.7 to 12.0), populations at risk (10.3%, 95% CI: 10.2 to 10.5).

Prevalence of HBV varied across different continents (Fig. 3 c): Africa (9.2%, 95% CI: 2.0 to 33.4%), Ethiopia (6.0%, 95% CI: 5.0 to 7.2), Nigeria (11.4%, 95% CI: 8.0 to 16.1), Somalia (9.1%, 95% CI: 3.1 to 24.4), Sudan (9.1%, 95% CI: 8.4 to 9.9), Africa-Asia (15.0%, 95% CI: 13.7 to 16.4), China (6.9%, 95% CI: 6.9 to 6.9), India (2.3%, 95% CI: 1.2 to 4.6), Thailand (5.1%, 95% CI: 5.06 to 14.3), Europe-Africa (7.8%, 95% CI: 6.7 to 9.0), Europe-Asia (84.0%, 95% CI: 83.2 to 84.8), global (2.3%, 95% CI: 2.2 to 2.4), Gulf regions (1.7%, 95% CI: 1.65 to 69.3), Iran (1.0%, 95% CI: 0.9 to 1.1).

Prevalence of HCV among populations at risk (Fig. 3 d): Healthcare Workers (HCWs) (5.58%, 95% CI: 5.02 to 6.19), low-risk individuals (2.6%, 95% CI: 1.30 to 5.30), PLWH (4.8%, 95% CI: 5.02 to 6.19), hemodialysis patients (34.8%, 95% CI: 27.90 to 7.80), homeless individuals (20.8%, 95% CI: 19.20 to 21.4), intermediate-risk individuals (11.8%, 95% CI: 2.70 to 39.50), people with mental illness (92.8%, 95% CI: 91.6 to 96.4), pregnant women (34.8%, 95% CI: 33.70 to 34.30), prisoners (23.8%, 95% CI: 17.7 to 30.7), special populations (35.8%, 95% CI: 23.1 to 49.1), waste pickers (8.8%, 95% CI: 7.1 to 9.1), populations at risk (35.8%, 95% CI: 5.02 to 6.19), high-risk individuals (28.3%, 95% CI: 15.3 to 46.0).

Regional prevalence of HCV (Fig. 3 e): Africa (7.42%, 95% CI: 3.00 to 17.18), Cameroon (17.55%, 95% CI: 1.21 to 78.71), Ethiopia (3.10%, 95% CI: 2.98 to 3.22), Ghana (3.00%, 95% CI: 2.90 to 3.11), Somalia (48.40%, 95% CI: 47.16 to 49.64), Sudan (2.00%, 95% CI: 1.73 to 2.32), Asia (11.20%, 95% CI: 10.68 to 11.74), Arabian Gulf countries (9.36%, 95% CI: 1.80 to 36.78), Europe-America-Asia-Americas (26.00%, 95% CI: 25.97 to

26.03), Europe-Africa-Asia-America-Australia (17.70%, 95% CI: 17.50 to 17.90), Europe-Asia (20.30%, 95% CI: 19.25 to 21.39), Europe-Asia-Americas-Oceania (92.00%, 95% CI: 91.55 to 92.43), Middle East (25.30%, 95% CI: 24.73 to 25.88).

In nearly all data pooling, the applied heterogeneity index I^2 presented a value of either 0% (in the case of one meta-analysis) or about 99% in the case of more than one meta-analysis for the studied indicator. The same scenario was observed for other used heterogeneity and variability indices (Tau squared (τ^2) and Q-statistic).

Discussion

Understanding the spread and prevalence of hepatotropic viruses across diverse geographic regions is paramount for formulating effective public health strategies. Our study was designed with the overarching goal of systematically synthesizing information from various meta-analyses to yield comprehensive insights into the intricate patterns of hepatotropic virus spread and prevalence.

The analysis unveiled substantial heterogeneity among included studies, as evidenced by the significant Q-statistic ($Q = 6486740.461$, $df = 32$, $p < 0.001$). The I^2 statistic indicated that around 99.95% of the total variation was attributed to genuine heterogeneity among studies, reflecting notable differences in prevalence rates. This heterogeneity was further confirmed by the estimated tau squared (τ^2) value of 1.5679, highlighting substantial between-study variance. These findings warrant adopting a mixed-effects statistical approach to enhance the precision and reliability of prevalence estimates.

These estimates present an extensive exploration into the intricate distribution and prevalence patterns of hepatotropic viruses across diverse geographical regions, shedding light on the multifaceted factors that contribute to the varying rates of prevalence. The observed disparities in prevalence are a result of a complex interplay of variables including healthcare infrastructure, demographic dynamics and healthcare practices. The study unearths a notably higher prevalence of hepatotropic viruses in the MENA region, where rates surge to 29.2%. This pronounced prevalence can be attributed to formidable obstacles in healthcare access and the complex challenges faced in executing effective public health efforts within the region. In contrast, North America and Europe exhibit comparatively lower prevalence rates ranging from 2.30% to 26.00%, underscoring the success of robust public health measures and advanced medical systems in curbing viral prevalence. The prevalence rates in African nations such as Somalia (49.46%) and Sudan (4.33%) reflect a distinct set of challenges including limited disease monitoring capacities, scarce healthcare resources and inadequate vaccination coverage, all further compounded by socioeconomic adversities and ongoing conflicts.

A comparative analysis of this study with existing research serves to highlight its distinctive contributions. The notably higher prevalence of HAV at 82.5% in this study surpasses previously reported rates of 31.4% and 52% in [67] and [68], possibly attributable to factors like water

and food contamination, thereby emphasizing the critical role of elevated sanitation standards. HBV prevalence, notably lower at 8.6%, aligns with global figures (5.8%), underscoring the success of vaccination initiatives [69]. In the African context HBV prevalence varies between 9.2% and 11.4%, encompassing Ethiopia at 6.0% and Nigeria at 11.4. A trend correlates with the findings of [70] in Kenya, who reported a prevalence of 7.8%, Yendewa [71] in Sierra Leone with a prevalence of 13.0%, and Olaru[69] in the WHO African Region with a prevalence of 7.8%. The persistent concern of HCV prevalence (15.1%), transmitted primarily through blood contact, also finds reinforcement in Olaru's [69] recent meta-analysis (10.3%), underscoring the critical importance of robust blood screening, strategic harm reduction strategies and the facilitation of accessible treatment options. The prevalence of HDV (8.9%) and HEV (13.9%), although relatively lower than certain reported figures, remains intertwined with inadequate sanitation and contaminated water sources, with consideration given to identification of increasing number of domestic and wild animal cases as reported by [69], thereby highlighting the multifaceted challenges in healthcare accessibility. Isolates of HEV from animals and sporadic human cases belong to genotype 4 in China and Vietnam which were part of endemic regions. In India, another endemic region, animal isolates all were members of genotype 4 and human isolates belonged to genotype 1 [69]. Furthermore, the prevalence of HDV (8.9%), often accompanying HBV co-infection, and HEV prevalence (13.9%), although lower than figures (35.8% and 21%) from [72] and [73] respectively, are linked to inadequate sanitation and contaminated water sources, thereby highlighting challenges in healthcare accessibility. Notably, the HDV prevalence aligns with the global occurrence range of 8.7% to 18.7% [2]. The relatively modest prevalence (2.2%) of dual HBV and HCV carriage can be attributed to specific risk factors including blood transfusions, substance abuse and high-risk sexual behaviors. The waning prevalence of HDV infection globally can be primarily attributed to the widespread implementation of HBV vaccination programs. These initiatives not only shrink the pool of susceptible HBsAg carriers but also showcase potential cross-protection against other hepatitis viruses, underscoring the interconnected nature of hepatitis virus vaccines [74].

The study delves even deeper into the prevalence across diverse population groups, intricately unraveling the interplay of risk factors, healthcare accessibility, and social determinants that collectively shape disease burden within each subgroup. The observed lower prevalence among low-risk groups like Healthcare Workers (HCWs) and individuals living with HIV (PLWH) serves to underscore the efficacy of well-implemented infection control measures and impactful awareness campaigns. HCWs, operating within stringent protective protocols, and PLWH, benefiting from ongoing healthcare engagements, exemplify the tangible dividends of proactive interventions. In contrast, high-risk groups manifest higher prevalence rates, a reflection of the complexities entrenched within their circumstances. Haemodialysis patients, subjected to frequent

medical procedures, exhibit heightened risk due to their extensive exposure to bloodborne pathogens. This aligns seamlessly with findings by other researchers, such as the documented prevalence of 57.0% among People Who Inject Drugs (PWID) [75]. This study's findings align with those of recent meta-analytic research on HBV prevalence, such as Vincent's [76] 7.4% rate in the high-risk adult population and Wu's 4.8% [72] prevalent rate in pregnant women, suggesting consistent distribution patterns

The heightened vulnerabilities of homeless individuals come to the forefront, as they are at especially high risk due to inadequate hygiene standards and limited healthcare access. The prevalence among individuals with serious mental illness gains significance, attributed to barriers rooted in stigma and adherence challenges to preventive measures. The elevated prevalence among pregnant women is linked to immunological changes inherent to pregnancy. Prison inmates, confined within close quarters with limited healthcare access, encounter heightened risk due to their constant close proximity. Distinct populations such as migrants, refugees and marginalized communities confront unique challenges that amplify their burden. Waste pickers, engaged in occupations with potential exposure to contaminated materials, face an augmented risk. Overall, the cumulative prevalence rate of 35.8% and 21% reported by [72] and [73] reflects the cumulative impact of diverse risk factors and determinants intricately woven into the population's fabric.

The insights from this study extend even further when viewed through the lens of global variability in HCV prevalence. Categorizing prevalence rates by continent, the study unearths the intricate distribution dynamics and disparities that underpin disease prevalence. In Africa, the prevalence of HCV spans a spectrum between 3.00% and 17.18%, mirroring the disparities in healthcare infrastructure, access to preventive measures, socioeconomic conditions and cultural practices. The high prevalence of 17.55% in Cameroon highlights a substantial regional burden, whereas Ethiopia and Ghana exhibit more moderate burdens. In contrast, Somalia's staggering prevalence of 48.40% sheds light on the unique challenges entrenched within specific regions. Across Asia, a sweeping variance in prevalence rates is evident. Afghanistan's prevalence of 9.14% signifies diverse national dynamics intertwined with healthcare access and varying risk behaviors. The broader Asian landscape, boasting a prevalence of 31.00%, signifies a substantial burden, exemplified by Iran's prevalence of 29.02%, emblematic of a pressing health challenge. These observations resonate harmoniously with Aghaei's reported prevalence of 44.82% for the EMRO region [77]. The Americas, on the other hand, showcase a range of prevalence rates, with an overall prevalence of 11.20% and the Arabian Gulf displaying a prevalence of 9.36%. This mirrors the inherent diversity in healthcare systems and risk profiles. Interestingly, these prevalence rates align closely with Aghaei's [77] reported prevalence among people who inject drugs in the Eastern Mediterranean region. The Europe-America-Asia-Americas region paints a prevalence of 26.00%, closely aligned with Olaru's [69] reported 17.5% prev-

alence in the WHO European region. These shared figures underline interconnected burdens. Meanwhile, Europe-Africa-Asia-America-Australia showcases a prevalence of 17.70%, and Europe-Africa-Asia-Americas stands at 26.00%, echoing Aghaei's [77] reported 18.86% in Asia, illustrating the constant change of healthcare infrastructure and practices. The strikingly high prevalence of 92.00% in Europe-Asia-Americas-Oceania necessitates targeted interventions due to the specific regional dynamics. The prevalence of 25.30% in the Middle East accentuates the necessity for bespoke interventions considering the unique challenges embedded in the region. The observation of a higher burden of HCV compared to HBV in pregnant women opens a fascinating avenue for exploration. This disparity could be attributed to differential transmission modes, regional prevalence variations, vertical transmission dynamics, effectiveness of prenatal screening, awareness campaigns and distinct immune responses. Such nuanced understanding guides interventions tailored to mitigate the impact of both viruses on pregnant women and their infants.

These findings not only underscore the urgency of tailored public health strategies, but also advocate for a comprehensive approach that encompasses improved healthcare access, proactive vaccination campaigns, strengthened sanitation infrastructure and heightened awareness initiatives. The profound global burden of hepatotropic viruses necessitates a continuous research agenda and sustained vigilance to effectively mitigate their prevalence. The study emphasizes that concerted actions are indispensable to not only address the immediate impacts of these viruses, but also to forge ahead in terms of prevention and control, all while acknowledging the nuanced contexts in which they thrive.

While this study undoubtedly contributes significantly, there is still a lot to be discovered about hepatotropic viruses. To improve the reliability and quality of evidence, future research endeavors should prioritize the establishment of well-defined protocols, designed to address potential methodological uncertainties. A more thorough study of the specific risk factors within different regions and a meticulous assessment of the impact of varying interventions would provide a more nuanced understanding of hepatotropic virus prevalence. A more profound exploration of the factors underpinning the divergent prevalence rates of Hepatitis B virus across continents could unravel crucial insights for tailoring region-specific interventions. Similarly, delving into the reasons behind the lower prevalence rates of hepatotropic viruses in certain regions, such as the Gulf regions and Iran, could offer valuable insight into the effectiveness of healthcare systems, comprehensive vaccination programs and awareness campaigns. This expansive research landscape offers a promising platform for generating not only a more dependable and comprehensive understanding of hepatotropic virus prevalence but also actionable insights for policymakers and healthcare professionals striving to effectively address the global burden of these viruses with precision.

While the study boasts a panoramic view of hepatotropic virus prevalence across diverse regions, certain

limitations require acknowledgment. The heavy reliance on previously published articles and observational data could potentially compromise the transparency and reproducibility of the study. Furthermore, the methodology employed, which curtails the in-depth analysis of individual sample data, infection markers used, etc. could bring about discrepancies and inherent biases into the outcomes.

As observed in our results, the high heterogeneity in our meta-analyses with I^2 values around 99% when data was pooled from multiple meta studies, likely stems from the combination of data on incidence by virus types from different regions. This naturally introduces significant variability, driven by geographical differences, healthcare practices, diagnostic methods and population demographics. Additional factors such as study design, time periods and sampling methods further contribute to the variation. The Q-statistic and τ^2 confirm substantial between-study variance. While the random-effects model accounts for this, the high heterogeneity may limit the generalizability of our findings across regions with distinct epidemiological profiles.

While these pathogens share a tropism for the liver, the modes of transmission, risk factors for acquisition, natural history and the availability of vaccine are markedly different. The study does not differentiate active versus resolved. Even with these limitations, this study offers preliminary information that are valuable in the field and may herald for further inquiries into relative analysis. The approach of gathering the pathogen data into a monolith of information in a meta-meta-analysis may be of interest to the scientific community. Furthermore, the inclusion of studies from varied geographical regions enriches the study's scope but also brings in variations in patient care practices, warranting careful interpretation.

To improve the reliability and quality of evidence, future research should prioritize the integration of well-structured studies, encompassing both the current meta-analysis and previously underappreciated published studies.

Conclusion

In conclusion, our study resonates with the broader aim of propelling global public health strategies and contributing to the WHO goal of eliminating viral hepatitis by the year 2030. This study offers intricate insights into the spread and prevalence of hepatotropic viruses across diverse regions, revealing complex factors shaping them. Varied prevalence rates mirror multifaceted transmission dynamics, including healthcare infrastructure, demographics, and practices. Notably, MENA faces higher rates, possibly due to healthcare challenges, while North America and Europe show lower rates due to robust measures. African nations like Somalia and Sudan struggle with several burdens from limited surveillance, healthcare and socioeconomics. Continent-based analysis uncovers nuanced global patterns, underlining the necessity for tailored public health strategies. This holistic understanding emphasizes healthcare access, vaccination, sanitation and awareness campaigns to mitigate hepatotropic virus burdens collectively and foster global health.


REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Lopez-Scarim J., Nambiar S.M., Billerbeck E. Studying T cell responses to hepatotropic viruses in the liver microenvironment. *Vaccines (Basel)*. 2023; 11(3): 681. <https://doi.org/10.3390/vaccines11030681>
- Devarbhavi H., Asrani S.K., Arab J.P., Nartey Y.A., Pose E., Kamath P.S. Global burden of liver disease: 2023 update. *J. Hepatology*. 2023; 79(2): 516–37. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.03.017>
- Hassnine A.A., Saber M.A., Fouad Y.M., Sarhan H., Elsayed M.M., Zaki Z.M., et al. Clinical study on the efficacy of hepatitis B vaccination in hepatitis C virus related chronic liver diseases in Egypt. *Virus Res*. 2023; 323: 198953. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2022.198953>
- Antonioni T., Pritlove C., Shearer D., Tadrous M., Shah H., Gomes T. Accessing hepatitis C direct acting antivirals among people living with hepatitis C: a qualitative study. *Int. J. Equity Health*. 2023; 22(1): 112. <https://doi.org/10.1186/s12939-023-01924-4>
- Abesig J., Chen Y., Wang H., Sompso F.M., Wu I.X.Y. Prevalence of viral hepatitis B in Ghana between 2015 and 2019: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2020; 15(6): e0234348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234348>
- Adane T., Getawa S. The prevalence and associated factors of hepatitis B and C virus in hemodialysis patients in Africa: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2021; 16(6): e0251570. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251570>
- Alali A.A., Abo-Shehda M.N. Prevalence of Hepatitis B Virus infection in the Gulf Cooperation Council: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* 2022; 22(1): 819. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07806-4>
- Kenfack-Momo R., Kenmoe S., Takuissu G.R., Ebogo-Belobo J.T., Kengne-Ndé C., Mbaga D.S., et al. Epidemiology of hepatitis B virus and/or hepatitis C virus infections among people living with human immunodeficiency virus in Africa: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2022; 17(5): e0269250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269250>
- Qashqari F.S. Seroprevalence of hepatitis E virus infection in Middle Eastern Countries: A systematic review and meta-analysis. *Medicina (Kaunas)*. 2022; 58(7): 905. <https://doi.org/10.3390/medicina58070905>
- Polaris Observatory HCV Collaborators. Global change in hepatitis C virus prevalence and cascade of care between 2015 and 2020: a modelling study. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2022; 7(5): 396–415. [https://doi.org/10.1016/s2468-1253\(21\)00472-6](https://doi.org/10.1016/s2468-1253(21)00472-6)
- Irekeola A.A., Ear E.N.S., Mohd Amin N.A.Z., Mustaffa N., Shueb R.H. Antivirals against HCV infection: the story thus far. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2022; 16(2): 231–43. <https://doi.org/10.3855/jidc.14485>
- Adeiza S.S., Aminul I. Meta-meta-analysis of the mortality risk associated with MRSA compared to MSSA bacteraemia. *Infez. Med.* 2024;32(2):131. <http://dx.doi.org/10.53854/liim-3202-2>
- Page M.J., McKenzie J.E., Bossuyt P.M., Boutron I., Hoffmann T.C., Mulrow C.D., et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *Syst. Rev.* 2021; 10(1): 89. <https://doi.org/10.1186/s13643-021-01626-4>
- Christensen E. Quality of reporting of meta-analyses: the QUOROM statement. Will it help? *J. Hepatol.* 2001; 34(2): 342–5. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(00\)00002-7](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(00)00002-7)
- Suleiman A.S., Islam M.A., Akter M.S., Amin M.R., Werkneh A.A., Bhattacharya P. A meta-meta-analysis of co-infection, secondary infections, and antimicrobial resistance in COVID-19 patients. *J. Infect. Public Health*. 2023; 16(10): 1562–90. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.07.005>
- Shea B.J., Hamel C., Wells G.A., Bouter L.M., Kristjansson E., Grimshaw J., et al. AMSTAR is a reliable and valid measurement tool to assess the methodological quality of systematic reviews. *J. Clin. Epidemiol.* 2009; 62(10): 1013–20. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2008.10.009>
- Adeiza S.S., Shuaibu A.B., Shuaibu G.M. Random effects meta-analysis of COVID-19/S. aureus partnership in co-infection. *GMS Hyg. Infect. Control.* 2020; 15: Doc29. <https://doi.org/10.3205/dgkh000364>
- Adeiza S.S., Islam M.A., Shittu A. Global, regional, and national burdens: An overlapping meta-analysis on *Staphylococcus aureus* and its drug-resistant strains. *One Health Bull.* 2024;10-4103. https://doi.org/10.4103/ohbl.ohbl_10_24
- Borenstein M. In a meta-analysis, the I-squared statistic does not tell us how much the effect size varies. *J. Clin. Epidemiol.* 2022; 152: 281–4. <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2022.10.003>
- Borenstein M. Comprehensive meta-analysis software. In: *Systematic Reviews in Health Research: Meta-Analysis in Context*. Wiley; 2022: 535–48.
- Agyeman A.A., Ofori-Asenso R. Prevalence of HIV and hepatitis B coinfection in Ghana: a systematic review and meta-analysis. *AIDS Res Ther.* 2016; 13: 23. <https://doi.org/10.1186/s12981-016-0107-x>
- Agyeman A.A., Ofori-Asenso R., Mprah A., Ashiagbor G. Epidemiology of hepatitis C virus in Ghana: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* 2016; 16: 391. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1708-7>
- Ahmad T., Hui J., Musa T.H., Behzadifar M., Baig M. Seroprevalence of hepatitis E virus infection in pregnant women: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Saudi Med.* 2020; 40(2): 136–46. <https://doi.org/10.5144/0256-4947.2020.136>
- Ajuwon B.I., Yujuico I., Roper K., Richardson A., Sheel M., Lidbury B.A. Hepatitis B virus infection in Nigeria: a systematic review and meta-analysis of data published between 2010 and 2019. *BMC Infect. Dis.* 2021; 21(1): 1120. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06800-6>
- Alemu A.A., Zeleke L.B., Aynalem B.Y., Kassa G.M. Hepatitis B virus infection and its determinants among pregnant women in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *Infect. Dis. Obstet. Gynecol.* 2020; 2020: 9418475. <https://doi.org/10.1155/2020/9418475>
- Alonso M., Gutzman A., Mazin R., Pinzon C.E., Reveiz L., Ghidinelli M. Hepatitis C in key populations in Latin America and the Caribbean: systematic review and meta-analysis. *Int. J. Public Health*. 2015; 60(7): 789–98. <https://doi.org/10.1007/s00038-015-0708-5>
- Amini N., Alavian S.M., Kabir A., Aalaei-Andabili S.H., Saiedi Hosseini S.Y., Rizzetto M. Prevalence of hepatitis D in the Eastern Mediterranean region: systematic review and meta-analysis. *Hepat. Mon.* 2013; 13(1): e8210. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.8210>
- Ashkani-Esfahani S., Alavian S.M., Salehi-Marzjarani M. Prevalence of hepatitis C virus infection among hemodialysis patients in the Middle-East: A systematic review and meta-analysis. *World J. Gastroenterol.* 2017; 23(1): 151. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i1.151>
- Atlaw D., Sahiledengle B., Tariku Z. Hepatitis B and C virus infection among healthcare workers in Africa: a systematic review and meta-analysis. *Environ. Health Prev. Med.* 2021; 26(1): 61. <https://doi.org/10.1186/s12199-021-00983-9>
- Azami M., Hafezi Ahmadi M.R., Sayehmiri K. Hepatitis B vaccination efficacy in Iranian healthcare workers: a meta-analysis study. *Hepat. Mon.* 2017; 17(1): e37781. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.37781>
- Badawi M.M., Atif M.S., Mustafa Y.Y. Systematic review and meta-analysis of HIV, HBV and HCV infection prevalence in Sudan. *Virol. J.* 2018; 15(1): 148. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1060-1>
- Batham A., Narula D., Toteja T., Sreenivas V., Puliye J.M. Systematic review and meta-analysis of prevalence of hepatitis B in India. *Indian Pediatrics.* 2007; 44(9): 663.
- Chemaitelly H., Mahmud S., Rahmani A.M., Abu-Raddad L.J. The epidemiology of hepatitis C virus in Afghanistan: systematic review and meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* 2015; 40: 54–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2015.09.011>
- Chen H.Y., Shen D.T., Ji D.Z., Han P.C., Zhang W.M., Ma J.F., et al. Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis. *Gut.* 2019; 68(3): 512–21. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316601>
- Daw M.A., Daw A.M., Sifennasr N.E.M., Draha A.M., Daw A.M., Daw A.M., et al. The epidemiology of hepatitis D virus in North Africa: a systematic review and meta-analysis. *ScientificWorldJournal.* 2018; 2018: 9312650. <https://doi.org/10.1155/2018/9312650>
- Desikan P., Khan Z. Prevalence of hepatitis B and hepatitis C virus co-infection in India: a systematic review and meta-analysis. *Indian J. Med. Microbiol.* 2017; 35(3): 332–9. https://doi.org/10.4103/ijmm.ijmm_17_257
- Fernández Villalobos N.V., Kessel B., Rodiah I., Ott J.J., Lange B., Krause G. Seroprevalence of hepatitis E virus infection in the Americas: Estimates from a systematic review and meta-analysis.

- PLoS One*. 2022; 17(6): e0269253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269253>
38. Farajzadegan Z., Hoseini S.G., Kelishadi R., Jamshidi F., Nokhodian Z., Noori R., et al. Systematic review and meta-analysis on the age-specific seroprevalence of hepatitis A in Iran. *J. Res. Med. Sci.* 2014; 19(Suppl. 1): S56–63.
 39. Giri S., Sahoo S., Angadi S., Afzalpurkar S., Sundaram S., Bhurugumalla S. Seroprevalence of hepatitis B virus among pregnant women in India: A systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Exp. Hepatol.* 2022; 12(6): 1408–19. <https://doi.org/10.1016/j.jceh.2022.08.005>
 40. Harfouche M., Chemaitelly H., Mahmud S., Chaabna K., Kouyoumjian S.P., Al Kanaani Z., et al. Epidemiology of hepatitis C virus among hemodialysis patients in the Middle East and North Africa: systematic syntheses, meta-analyses, and meta-regressions. *Epidemiol. Infect.* 2017; 145(15): 3243–63. <https://doi.org/10.1017/s0950268817002242>
 41. Hassan-Kadle M.A., Osman M.S., Ogurtsov P.P. Epidemiology of viral hepatitis in Somalia: Systematic review and meta-analysis study. *World J. Gastroenterol.* 2018; 24(34): 3927–57. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i34.3927>
 42. Horvatits T., Ozga A.K., Westhölter D., Hartl J., Manthey C.F., Lütgehetmann M., et al. Hepatitis E seroprevalence in the Americas: A systematic review and meta-analysis. *Liver Int.* 2018; 38(11): 1951–64. <https://doi.org/10.1111/liv.13859>
 43. Hughes E., Bassi S., Gilbody S., Bland M., Martin F., et al. Prevalence of HIV, hepatitis B, and hepatitis C in people with severe mental illness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Psychiatry.* 2016; 3(1): 40–8. [https://doi.org/10.1016/s2215-0366\(15\)00357-0](https://doi.org/10.1016/s2215-0366(15)00357-0)
 44. Kafeero H.M., Ndagire D., Ocama P., et al. Prevalence and predictors of hepatitis B virus (HBV) infection in east Africa: evidence from a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies published from 2005 to 2020. *Arch. Public Health.* 2021; 79(1): 167. <https://doi.org/10.1186/s13690-021-00686-1>
 45. Kouyoumjian S.P., Chemaitelly H., Abu-Raddad L.J. Characterizing hepatitis C virus epidemiology in Egypt: systematic reviews, meta-analyses, and meta-regressions. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 1661. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17936-4>
 46. Larney S., Kopinski H., Beckwith C.G., Zaller N.D., Jarlais D.D., Hagan H., et al. Incidence and prevalence of hepatitis C in prisons and other closed settings: Results of a systematic review and meta-analysis. *Hepatology.* 2013; 58(4): 1215–24. <https://doi.org/10.1002/hep.26387>
 47. Leroi C., Adam P., Khamduang W., Kawilapat S., Ngo-Giang-Huong N., Ongwandee S., et al. Prevalence of chronic hepatitis B virus infection in Thailand: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Infect. Dis.* 2016; 51: 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.08.017>
 48. Leumi S., Bigna J.J., Amougou M.A., Ngouo A., Nyaga U.F., Noubiap J.J. Global burden of hepatitis B infection in people living with human immunodeficiency virus: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(11): 2799–806. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz1170>
 49. Li P., Liu J., Li Y., Su J., Ma Z., Bramer W.M., et al. The global epidemiology of hepatitis E virus infection: A systematic review and meta-analysis. *Liver Int.* 2020; 40(7): 1516–28. <https://doi.org/10.1111/liv.14468>
 50. Mahamat G., Kenmoe S., Akazong E.W., Ebogo-Belobo J.T., Mbagha D.S., Bowo-Ngandji A., et al. Global prevalence of hepatitis B virus serological markers among healthcare workers: A systematic review and meta-analysis. *World J. Hepatol.* 2021; 13(9): 1190–202. <https://doi.org/10.4254/wjh.v13.i9.1190>
 51. Mahmud S., Akbarzadeh V., Abu-Raddad L.J. The epidemiology of hepatitis C virus in Iran: Systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 150. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18296-9>
 52. Moghaddasifard I., B. Lankarani K., Moosazadeh M., et al. Prevalence of hepatitis B virus infection among pregnant women in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Iran. J. Cancer Prev.* 2016; 9(6). <https://doi.org/10.17795/ijcp-3703>
 53. Mohamoud Y.A., Riome S., Abu-Raddad L.J. Epidemiology of hepatitis C virus in the Arabian Gulf countries: Systematic review and meta-analysis of prevalence. *Int. J. Infect. Dis.* 2016; 46: 116–25. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.03.012>
 54. Mora N., Adams W.H., Kliethermes S., Dugas L., Balasubramanian N., Sandhu J., et al. A synthesis of hepatitis C prevalence estimates in Sub-Saharan Africa: 2000–2013. *BMC Infect. Dis.* 2016; 16: 283. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1584-1>
 55. Musa B., Bussell S., Borodo M., Samaila A.A., Femi O.L. Prevalence of hepatitis B virus infection in Nigeria, 2000–2013: A systematic review and meta-analysis. *Niger. J. Clin. Pract.* 2015; 18(2): 163–72. <https://doi.org/10.4103/1119-3077.151035>
 56. Ofori-Asenso R., Agyeman A.A. Hepatitis B in Ghana: a systematic review & meta-analysis of prevalence studies (1995–2015). *BMC Infect. Dis.* 2016; 16: 130. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1467-5>
 57. Rao V.B., Johari N., Du Cros P., Messina J., Ford N., Cooke G.S. Hepatitis C seroprevalence and HIV co-infection in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 2015; 15(7): 819–24. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(15\)00006-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(15)00006-7)
 58. Rossi C., Shrier I., Marshall L., Cnossen S., Schwartzman K., Klein M.B., et al. Seroprevalence of chronic hepatitis B virus infection and prior immunity in immigrants and refugees: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2012; 7(9): e44611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044611>
 59. Salari N., Darvishi N., Hemmati M., Shohaimi S., Ghyasi Y., Hossaini F., et al. Global prevalence of hepatitis C in prisoners: a comprehensive systematic review and meta-analysis. *Arch. Virol.* 2022; 167(4): 1025–39. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05382-1>
 60. Salehi-Vaziri M., Sadeghi F., Almasi Hashiani A., Gholami Fesharaki M., Alavian S.M. Hepatitis B virus infection in the general population of Iran: an updated systematic review and meta-analysis. *Hepat. Mon.* 2016; 16(4): e35577. <https://doi.org/10.5812/hepatmon.35577>
 61. Souza-Silva G., Zolnikov T.R., Ortolani P.L., Cruvinel V.R.N., Dias S.M., Mol M.P.G. Hepatitis B and C prevalence in waste pickers: a global meta-analysis. *J. Public Health (Oxf.)*. 2022; 44(4): 761–9. <https://doi.org/10.1093/pubmed/fdab285>
 62. Stockdale A.J., Kreuels B., Henrion M.Y.R., Giorgi E., Kyomuhangi I., de Martel C., et al. The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis. *J. Hepatol.* 2020; 73(3): 523–32. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.04.008>
 63. Wang H., Men P., Xiao Y., Gao P., Lv M., Yuan Q., et al. Hepatitis B infection in the general population of China: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* 2019; 19(1): 811. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4428-y>
 64. Yazie T.D., Tebeje M.G. An updated systematic review and meta-analysis of the prevalence of hepatitis B virus in Ethiopia. *BMC Infect. Dis.* 2019; 19(1): 917. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4486-1>
 65. Azevedo T.C.L., Zwahlen M., Rauch A., Egger M., Wandeler G. Hepatitis C in HIV-infected individuals: a systematic review and meta-analysis of estimated prevalence in Africa. *J. Int. AIDS Soc.* 2016; 19(1): 20711. <https://doi.org/10.7448/ias.19.1.20711>
 66. Li P., Ji Y., Li Y., Ma Z., Pan Q. Estimating the global prevalence of hepatitis E virus in swine and pork products. *One Health.* 2022; 14: 100362. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100362>
 67. Takuissu G.R., Kenmoe S., Amougou Atsama M., Atenguena Okobalemba E., Mbagha D.S., Ebogo-Belobo J.T., et al. Global epidemiology of occult hepatitis B virus infections in blood donors, a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2022; 17(8): e0272920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272920>
 68. Hofmeister M.G., Xing J., Foster M.A., Augustine R.J., Burkholder C., Collins J., et al. Hepatitis A person-to-person outbreaks: epidemiology, morbidity burden, and factors associated with hospitalization—multiple states, 2016–2019. *J. Infect. Dis.* 2021; 223(3): 426–34. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa636>
 69. Oлару I.D., Beliz Meier M., Mirzayev F., Prodanovic N., Kitichen P.J., Schumacher S.G., et al. Global prevalence of hepatitis B or hepatitis C infection among patients with tuberculosis disease: systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine.* 2023; 58: 101938. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2023.101938>
 70. Makokha G.N., Zhang P., Hayes C.N., Songok E., Chayama K. The burden of Hepatitis B virus infection in Kenya: A systematic review and meta-analysis. *Front. Public Health.* 2023; 11: 986020. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.986020>
 71. Yendewa G.A., Wang G.M., James P.B., Massaquoi S.P.E., Yendewa S.A., Ghazawi M., et al. Prevalence of chronic hepatitis B virus infection in Sierra Leone, 1997–2022: A systematic review and meta-analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2023; 109(1): 105–14. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.22-0711>

72. Qiu L.X., Huang Y., Quan J.L., Bi Z.F., Zhong G.H., Wang J.Y., et al. Prognosis of hepatitis E infection in patients with chronic liver disease: A meta-analysis. *J. Viral Hepat.* 2023; 30(2): 101–7. <https://doi.org/10.1111/jvh.13754>
73. Raji Y.E., Toung O.P., Taib N.M., Sekawi Z.B. Meta-analysis and moderator analysis of the seroprevalence of hepatitis E in South-Eastern Asia. *Sci. Rep.* 2023; 13(1): 11880. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37941-0>
74. Asselah T., Rizzetto M. Hepatitis D virus infection. *N. Engl. J. Med.* 2023; 389(1): 58–70. <https://doi.org/10.1056/nejmra2212151>
75. Magri M.C., Manchiero C., Dantas B.P., da Silva Nunes A.K., Vaz Gago Prata T., Domingos D.E.A., et al. Hepatitis C among people who inject drugs (PWID) in Latin America and the Caribbean: A meta-analysis of prevalence over three decades. *J. Stud. Alcohol Drugs.* 2023; 84(1): 118–27. <https://doi.org/10.15288/jsad.22-00014>
76. Vincent J.P., Nyamasege C., Wang S., Madec Y., Shimakawa Y. Prevalence of hepatitis B, C, and D virus infection in Haiti: A systematic review and meta-analysis. *Front. Public Health.* 2023; 10: 1099571. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.1099571>
77. Aghaei A.M., Gholami J., Sangchooli A., Rostam-Abadi Y., Olamazadeh S., Ardeshir M., et al. Prevalence of injecting drug use and HIV, hepatitis B, and hepatitis C in people who inject drugs in the Eastern Mediterranean region: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health.* 2023; 11(8): e1225–37. [https://doi.org/10.1016/s2214-109x\(23\)00267-x](https://doi.org/10.1016/s2214-109x(23)00267-x)

Information about the authors:

Shuaibu Suleiman Adeiza  – PhD, Head of Clinical Practice Laboratory, Department of Pharmaceutical Microbiology & Biotechnology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria; Department of Clinical Pharmacy and Pharmacy Practice, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Usmanu Danfodiyo University Sokoto, Nigeria. E-mail: Suleykestler2@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-9293-2600>

Md. Aminul Islam – MSc, PhD Scholar of Cell and Molecular Biology; Tulane University, USA; Advanced Molecular Lab, Department of Microbiology, President Abdul Hamid Medical College, Karimganj, Kishoreganj-2310, Bangladesh; COVID-19 Diagnostic Lab, Department of Microbiology, Noakhali Science and Technology University, Noakhali-3814, Bangladesh. E-mail: aminul@pahmc.edu.bd; <https://orcid.org/0000-0003-1091-9726>

Hauwa'u Umar Mungadi – PhD, Head of Department, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Usmanu Danfodiyo University, Sokoto, Nigeria. E-mail: hauwaumarmng@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-7200-1035>


Abdulmalik Bello Shuaibu – PhD (student), Head of Laboratory Virology Unit; Department of Veterinary Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Usmanu Danfodiyo University, Sokoto, Nigeria. E-mail: abdulmalik.shuaibu@udusok.edu.ng; <https://orcid.org/0000-0001-7684-2472>

Ranjit Sah – PhD, Head of Influenza and COVID-19 Testing (National Influenza Center); Department of Microbiology, Tribhuvan University Teaching Hospital, Institute of Medicine, Kathmandu 44600, Nepal; Department of Microbiology, Dr. D. Y. Patil Medical College, Hospital and Research Centre, Dr. D. Y. Patil Vidyapeeth, Pune 411018, Maharashtra, India. E-mail: ranjitsah@iom.edu.np; <https://orcid.org/0000-0002-2695-8714>

Contribution: Adeiza S.S. and Islam M.A. were responsible for conceptualization, data curation, formal analysis, investigation, methodology, and writing the original draft, as well as reviewing and scientific editing the manuscript; Shuaibu A.B., Adeiza S.S., and Islam M.A. contributed to methodology, provided resources, managed software, supervised the project, ensured validation, and participated in reviewing and scientific editing the manuscript; Mungadi H.U. and Sah R. ensured validation and participated in reviewing and scientific editing the manuscript.

Received 25 April 2024
Accepted 01 July 2024
Published 31 October 2024

Информация об авторах:

Shuaibu Suleiman Adeiza  – доктор философии (PhD), руководитель лаборатории клинической практики, кафедра фармацевтической микробиологии и биотехнологии, факультет фармацевтических наук, Университет Ахмаду Белло, Зария; кафедра клинической фармакологии и фармацевтической практики, факультет фармацевтических наук, Усману Дафодийо Университет, Сокото, Нигерия. E-mail: Suleykestler2@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-9293-2600>.

Md. Aminul Islam – магистр наук (MSc), докторант по клеточной и молекулярной биологии; Тулейнский университет, США; продвинутая молекулярная лаборатория, кафедра микробиологии, Медицинский колледж президента Абдула Хамида, Каримгандж, Кишорегандж-2310, Бангладеш; лаборатория диагностики COVID-19, кафедра микробиологии, Университет науки и технологий Ноакхали, Ноакхали-3814, Бангладеш. E-mail: aminul@pahmc.edu.bd; <https://orcid.org/0000-0003-1091-9726>

Hauwa'u Umar Mungadi – доктор философии (PhD), заведующий кафедрой, кафедра ветеринарной медицины, факультет ветеринарной медицины, Усману Данфодийо Университет, Сокото, Нигерия. E-mail: hauwaumarmng@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-7200-1035>

Abdulmalik Bello Shuaibu – докторант (студент), руководитель лабораторного отдела вирусологии, кафедра ветеринарной микробиологии, факультет ветеринарной медицины, Университет Усману Данфодийо, Сокото, Нигерия. E-mail: abdulmalik.shuaibu@udusok.edu.ng; <https://orcid.org/0000-0001-7684-2472>

Ranjit Sah – доктор философии (PhD) и руководитель отдела тестирования на грипп и COVID-19 (Национальный центр по гриппу), кафедра микробиологии, Университетская больница Трибхуван, Институт медицины, Катманду 44600, Непал; кафедра микробиологии, Медицинский колледж, больница и научно-исследовательский центр Д.Д. Патиля, Университет Д.Д. Патиля, Пуна 411018, Махараштра, Индия. E-mail: ranjitsah@iom.edu.np; <https://orcid.org/0000-0002-2695-8714>

Участие авторов: Adeiza S.S., Islam M.A. – концептуализация, сбор данных, формальный анализ, исследование, методология и написание первоначального варианта, а также обзор и научное редактирование рукописи; Shuaibu A.B., Adeiza S.S., Islam M.A. – вклад в методологию, предоставление ресурсов, управление программным обеспечением, куриация проекта, обеспечение валидации и участие в рецензировании и научном редактировании рукописи; Mungadi H.U., Sah R. – валидация и участие в рецензировании и научном редактировании рукописи.

Поступила 25.04.2024
Принята в печать 01.07.2024
Опубликована 31.10.2024

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-247>

© КАЛНИНА Л.Б., СЕЛИМОВА Л.М., НОСИК Д.Н., 2024



Оценка анти-ВИЧ-1 (Retroviridae: *Orthoretrovirinae*: *Lentivirus*: *Human immunodeficiency virus type 1*) активности 6НР и 3ТС *in vitro* с использованием вариантов клеточной линии МТ-4 с различной репликативной активностью

Калнина Л.Б., Селимова Л.М.✉, Носик Д.Н.

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

Резюме

Введение. Химиотерапия ВИЧ-инфекции остается единственным средством лечения болезни. Процесс создания новых и усовершенствование созданных ранее препаратов являются по-прежнему приоритетным направлением. Одним из доклинических этапов испытания эффективности лекарственных средств является исследование *in vitro* в модельной системе «вирус–клетка».

Цель исследования. Изучить противовирусную эффективность нуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (НИОТ) 6НР и 3ТС при репликации ВИЧ-1 в неопластической линии клеток МТ-4.

Материалы и методы. Использовали два варианта клеточной линии CD4⁺ Т-лимфоцитов МТ-4 (МТ-4/1 и МТ-4/2), трансформированных Т-лимфотропным вирусом человека 1-го типа (Retroviridae: *Orthoretrovirinae*: *Deltaretrovirus*: *HTLV-1*), с разным уровнем репликации ВИЧ-1. Для подавления вируса использовали препараты аммоний-3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-карбомоилфосфонат (6НР) и 2',3'-дидезокси-3'-тиацидин (3ТС).

Результаты и обсуждение. Репликативная активность ВИЧ-1 для разных штаммов вируса была выше в линии МТ-4/2, чем в линии МТ-4/1. Использование каждого из противовирусных веществ по отдельности показало более существенное ингибирование вирусной активности в клетках МТ-4/1, чем в клетках МТ-4/2. При комбинированном использовании антивирусный эффект был во всех случаях практически одинаков и колебался в пределах 87–96% для линии МТ-4/1 и 83–89% для линии МТ-4/2. Высокая эффективность наблюдалась при совместном использовании меньших концентраций препаратов по сравнению с индивидуальным применением.

Заключение. Сочетанное использование НИОТ 6НР и 3ТС является перспективным для лечения ВИЧ-инфицированных пациентов на разных сроках инфекции и с различным уровнем вирусной нагрузки.

Ключевые слова: ВИЧ-1; 6НР; 3ТС; клетки МТ-4

Для цитирования: Калнина Л.Б., Селимова Л.М., Носик Д.Н. Оценка анти-ВИЧ-1 (Retroviridae: *Orthoretrovirinae*: *Lentivirus*: *Human immunodeficiency virus type 1*) активности 6НР и 3ТС *in vitro* с использованием вариантов клеточной линии МТ-4 с различной репликативной активностью. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(5): 441–448. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-247> EDN: <https://elibrary.ru/ptyvcq>

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

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

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-247>

Evaluation of anti-HIV-1 (Retroviridae: *Orthoretrovirinae*: *Lentivirus*: *Human immunodeficiency virus type 1*) activity of 6HP and 3TC *in vitro* using MT-4 cell line variants with different replicative activity

Lyudmila B. Kalnina, Lyudmila M. Selimova✉, Dmitry N. Nosik

The D.I. Ivanovsky Research Institute of Virology the N.F. Gamaleya NRCM of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. Chemotherapy of HIV infection remains the only means of treating the disease. The process of development new and improving previously developed drugs is therefore considered a priority. One of the preclinical stage of drug efficacy testing is research in the virus-cell model system *in vitro*.

The aim. To evaluate the antiviral efficacy of nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs) 6HP and 3TC during HIV-1 replication in the neoplastic MT-4 cell line.

Materials and methods. Two variants of the CD4⁺ T-lymphocyte MT-4 cell line (MT-4/1 and MT-4/2) transformed by Human T-lymphotropic virus type 1 (Retroviridae: *Orthoretrovirinae*: *Deltaretrovirus*: *HTLV-1*), with different levels of HIV-1 replication were used. Drugs ammonium-3'-azido-3'-deoxythymidine-5'-carbomoylphosphonat (6HP) and 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine (3TC) were used to suppress the virus.

Results and discussion. The replication activity of HIV-1 was observed to be higher in the MT-4/2 line than in the MT-4/1 line for different strains of the virus. The use of each of the substances separately showed a more significant inhibition of viral activity in MT-4/1 than in MT-4/2 cells. When used together, the inhibition level was almost the same in all cases and ranged from 87–96% for the MT-4/1 line and 83–89% for the MT-4/2 line. High efficacy was observed when using lower concentrations of drugs compared to individual use.

Conclusion. The combined use of NRTIs 6HP and 3TC is promising for the treatment of HIV-infected patients at different stages of infection and with different levels of viral load.

Keywords: HIV-1; 6HP; 3TC; MT-4 cells

For citation: Kalnina L.B., Selimova L.M., Nosik D.N. Evaluation of anti-HIV-1 (Retroviridae: *Orthoretrovirinae*: *Lentivirus*: *Human immunodeficiency virus type 1*) activity of 6HP and 3TC *in vitro* using MT-4 cell line variants with different replicative activity. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(5): 441–448. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-247> EDN: <https://elibrary.ru/ptyvcq>

Funding. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Введение

Антиретровирусная терапия (АРТ) успешно применяется для лечения ВИЧ-инфекции и способна эффективно подавлять репликацию вируса. Благодаря внедрению во всем мире планомерного подхода к лечению инфекции были спасены миллионы жизней. С 2001 г. было предотвращено 16,5 млн смертей, связанных со СПИДом. По данным ЮНАЙДС/UNAIDS¹, инвестиции в организацию максимально возможного вовлечения ВИЧ-инфицированных людей в АРТ позволили к концу 2022 г. получить лечение 27,5 млн (73%) человек из 37,7 млн живущих с ВИЧ-1. Охват лечением в 2023 г. в России составил 86,5% от числа состоявших на диспансерном наблюдении и 58,8% от числа живущих с диагнозом ВИЧ-инфекция.

Вместе с тем по ряду причин не во всех случаях удается добиться положительных результатов [1]. Учитывая сложные патогенетические особенности развития инфекции и затраты, связанные с пожизненным лечением, разработка эффективных лечебных подходов в настоящее время, как и ранее, остается приоритетным направлением. Более результативными принято считать терапевтические схемы, включающие использование трех препаратов, подавляющих вирус на разных стадиях репликации. Обзор наиболее значимых исследований, в которые включались два препарата для начального лечения ВИЧ-1 или для поддержания высокого уровня подавления репликации вируса на бессимптомной стадии, продемонстрировал, что после более чем двух десятилетий использования трех препаратов в ближайшем будущем может произойти смена приоритетов. Для определенных групп населения, где необходимо свести к минимуму токсичность лекарств, где есть непереносимость лекарств или необходим

¹Объединённая программа Организации Объединённых Наций по ВИЧ/СПИДу (ЮНЭЙДС). Available at: <https://unaids.org/ru>

более простой режим их приема, применение двух-компонентной терапии может считаться безопасной и эффективной альтернативой [2].

Первой группой лекарственных средств, способных подавлять репликацию вируса на стадии обратной транскрипции [3], стали нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ). Среди них первое соединение, одобренное для лечения ВИЧ-1 [4], аналог тимидина 3'-азидо-3'-дезокситимидин (АЗТ, международное название зидовудин), по-прежнему часто служит компонентом многих схем лечения с применением НИОТ и составляет основу доступных антиретровирусных терапевтических препаратов. Однако выраженная токсичность АЗТ и способность генерировать штаммы, несущие множество мутаций, приводящих к появлению резистентных вариантов вируса со сниженной чувствительностью к нему [5], стимулировали поиск новых лекарственных форм.

Среди успешных исследований по поиску таких препаратов стали работы российских ученых по созданию фосфонатных производных ингибиторов обратной транскриптазы на основе АЗТ. Прежде всего, это 3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-монофосфат натрия (фосфазад) – оригинальный российский анти-ВИЧ-препарат, который прошел полный объем доклинических и клинических испытаний и был зарегистрирован в Российской Федерации в 1999 г. Препарат показал высокую эффективность, сниженную токсичность, пролонгированное действие и замедленное образование резистентных штаммов ВИЧ-1 [6]. Результатом дальнейших исследований стал новый препарат аммоний-3'-азидо-3'-дезокситимидин-5'-карбоимилфосфонат (6НР). Это соединение обладает выраженными антивирусными свойствами и благоприятными фармакокинетическими параметрами. В организме 6НР эффективно превращается в АЗТ. Медленное высвобождение после перорального приема и проникновения в клетки организма, а также сниженная токсичность делают это пролекарство многообещающим в качестве форм АЗТ с пролонгированным высвобождением и антивирусным действием [7].

Следующим НИОТ, относящимся к аналогу цитидина, был 2',3'-дидезокси-3'-тиацитидин (ЗТС, международное название ламивудин) [8]. Этот препарат успешно используется в практике лечения ВИЧ-инфекции около 28 лет. По мере сертификации новых препаратов схемы лечения, включающие ЗТС, продолжают широко использоваться в терапии на первоначальном этапе, благодаря его эффективности и относительной безопасности. Препарат широко применяется для лечения пациентов всех возрастов. Благодаря незначительному взаимодействию с различными лекарственными средствами и низкой стоимости, ЗТС продолжает использоваться в новых схемах в сочетании с антиретровирусными препаратами нового поколения. Его также назначают пациентам при коинфекции вирусом гепатита В. Среди всех лекарств, впервые одобренных более 20 лет назад для лечения ВИЧ-инфекции, только ЗТС по-прежнему рекомендуется в самых последних мировых руководствах. Вместе с тем в качестве компонента различных антиретровирус-

ных схем лечения ЗТС продолжает активно изучаться. Препарат обладает уникальным профилем проявления резистентности, способен замедлять ее развитие к АЗТ и, возможно, компенсировать сниженную чувствительность к АЗТ за счет своего вклада в противовирусное действие. К тому же известно явление усиления антивирусного действия у комбинированных препаратов с минимальными дозами составляющих их ингредиентов, которые сами по себе не способны вызвать заметного антивирусного эффекта [9]. На основе АЗТ и ЗТС был создан «Комбивир», лекарство, объединяющее оба вещества. Этот препарат используется с 1997 г. В 2018 г. был зарегистрирован российский препарат «Фосфаладин», объединяющий фосфазад и ламивудин. Комбинация препаратов в одной таблетке вызывает более сильный и устойчивый эффект, чем при использовании их по отдельности, содействует сокращению полипрагмазии, а также облегчает приверженность соблюдению режима приема лекарств [10].

В связи с созданием нового препарата 6НР было важно более углубленно изучить влияние комбинации 6НР и ЗТС на репликацию ВИЧ-1 в модельной системе *in vitro*. В работе были использованы две разновидности неопластической CD4⁺ Т-клеточной линии МТ-4 с разной репликативной активностью. Фенотипические особенности линий нами были описаны ранее [11].

Цель исследования – изучить противовирусную эффективность НИОТ 6НР и ЗТС при репликации ВИЧ-1 в неопластической линии клеток МТ-4.

Материалы и методы

Клетки человека МТ-4/1 и МТ-4/2 были получены из коллекции клеточных линий «Института вирусологии им. Д.И. Ивановского» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Для их культивирования использовали среду RPMI 1640, содержащую 10% сыворотки эмбриона коровы, 2 мМ L-глутамин и 50 мкг/мл гентамицина в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37 °С. Клетки пересеивали через 3–4 сут, плотность при посеве составляла 2,5–3,0 × 10⁵ кл/мл. Для заражения клеток использовали штаммы ВИЧ-1 899А, ШВ, НОВ и МС-1979. Первые три штамма относятся к субтипу В, последний – к субтипу G. Штаммы вируса были получены из коллекции вирусов «Института вирусологии им. Д.И. Ивановского» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Вирусы пассировали на клетках в культуральных флаконах объемом 50 мл в течение 5–7 сут до развития выраженного цитопатического эффекта, обнаруживаемого под световым микроскопом. Затем отбирали культуральную жидкость и определяли инфекционный титр, выражаемый в Ig ТЦИД₅₀/мл (50% тканевая цитопатическая инфекционная доза). Аликвоты проб хранили при –80 °С до заражения клеток. Клетки заражали вирусами при множественности инфекции – около 100 ТЦИД₅₀/клетка. Ежедневно отбирали аликвоты клеточной суспензии и определяли жизнеспособность клеток в присутствии трипанового синего. На 5–6-е сутки после заражения отбирали культуральную жидкость

и определяли ТЦИД₅₀/мл методом конечных разведений с использованием линии МТ-4/1, жизнеспособность клеток измеряли методом МТТ [12].

При исследовании противовирусной активности клетки культивировали в 96-луночных планках, препараты бНР и ЗТС (предоставлены компанией «АЗТ Фарма К.Б.», Россия) вносили одновременно с вирусом. Через 3 сут отбирали аликвоты для определения количества белка р24 методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческой тест-системы (Genscreen ULTRA HIV Ag-AB, компания «Био-Рад», Франция). Уровень ингибирования вирусной активности в процентах определяли по формуле:

$$(\text{ЭП} - \text{КВ} / \text{КК} - \text{КВ}) \times 100\%,$$

где ЭП – показания оптической плотности экспериментальных проб с препаратом; КВ – показания оптической плотности контроля вируса (без препарата); КК – показания контроля клеток. Показания лунки, не содержащей клеток, автоматически вычитали при определении оптической плотности исследуемых проб. Опытные пробы по определению вирусной активности и противовирусной активности препаратов имели по три параллели.

Статистический анализ данных проводили с использованием программы BioStat, v.5 (AnalystSoft, США).

Результаты

При заражении штаммами ВИЧ-1 ШВ, 899А, НОВ и МС1974 двух вариантов линий клеток МТ-4/1 и МТ-4/2, было замечено под световым микроскопом, что инфекционный процесс в линии МТ-4/2 развивался значительно активнее. Наблюдалось выраженное цитопатическое действие для всех перечисленных штаммов вируса, превышающее подобный эффект в линии МТ-4/1. Результаты определения инфекционного титра показали, что для

штамма 899А он увеличивался на ~ 4 порядка, ШВ – на ~ 3 порядка, НОВ и МС1974 – на ~ 1 порядок. В дальнейшем для заражения клеток был выбран штамм 899А как наиболее высокопродуктивный и чаще всего используемый нами в работе. Результаты определения жизнеспособности клеток в процессе репликации вируса 899А на разных сроках после заражения представлены на **рис. 1**. Видно, что количество живых клеток в линии МТ-4/2 уже на 2-е сутки после заражения было существенно меньше, чем в МТ-4/1. На 5-е сутки цитопатическая активность вируса в линии МТ-4/2 была на ~ 20% больше.

Наличие клеточных линий с разной продуктивной активностью позволило изучить эффективность двух противовирусных препаратов бНР и ЗТС, подавляющих репликацию вируса на стадии обратной транскрипции. Результаты ингибирования репликации ВИЧ-1 одним препаратом и в сочетанном использовании представлены на **рис. 2**. Во всех случаях наблюдался дозозависимый противовирусный эффект. Как видно, использованные концентрации каждого из веществ по отдельности приводили к более существенному ингибированию вирусной активности в клетках МТ-4/1 (рис. 2 а). При использовании наименьших концентраций каждого из препаратов процент ингибирования вирусной активности в клетках МТ-4/2 был существенно ниже. Повышение концентрации препаратов приводило к тому, что противовирусный эффект в клетках МТ-4/2 приближался к показаниям для клеток МТ-4/1, но оставался на 10–15% ниже. При совместном использовании веществ уровень ингибирования был во всех случаях высоким и практически одинаковым и колебался в пределах 87–96% для линии МТ-4/1 и 83–89% для линии МТ-4/2 (рис. 2 б). При статистическом анализе полученных результатов уровень значимости (*p*) был равен 0,05.

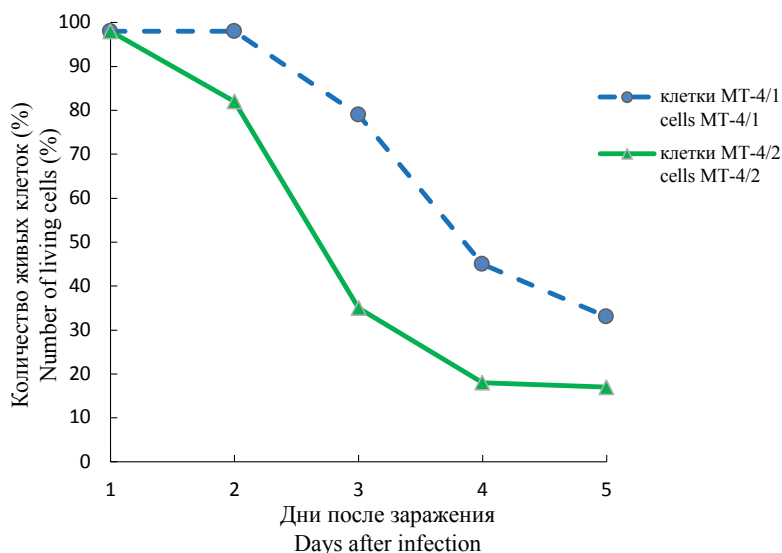


Рис. 1. Цитопатическая активность вируса ВИЧ-1/899А при репликации в линии клеток МТ-4/1 и МТ-4/2.

Fig. 1. Cytopathic activity of the HIV-1/899A virus during replication in MT-4/1 and MT-4/2 cell lines.

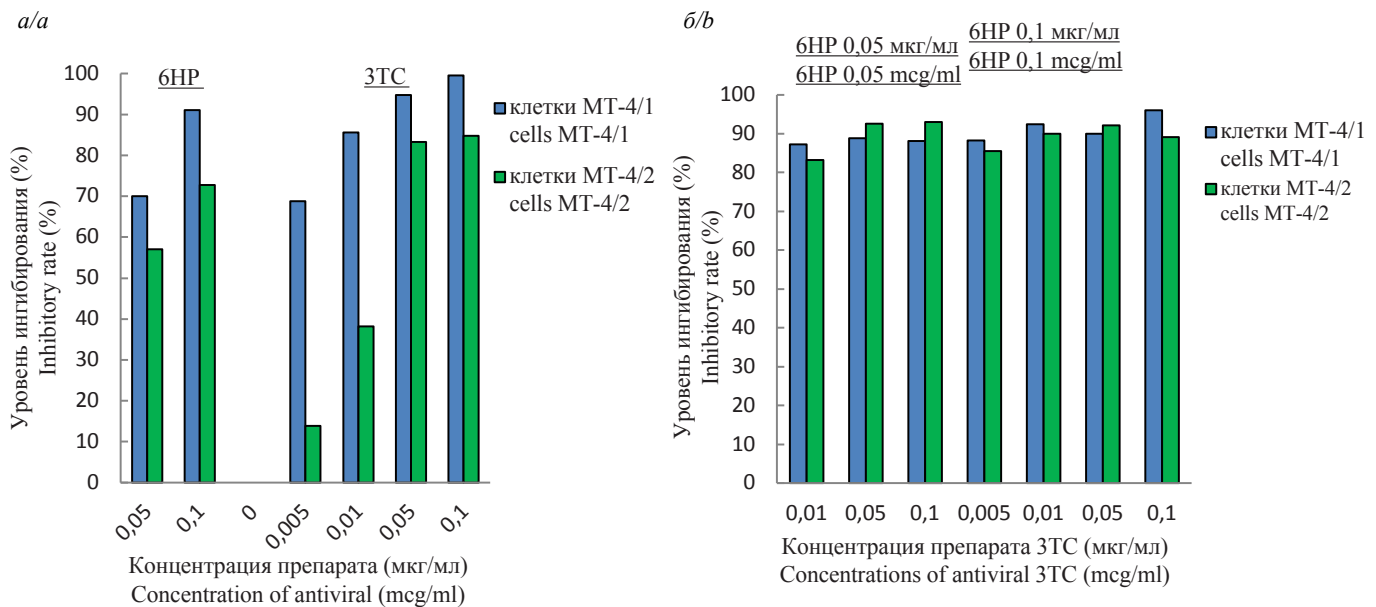


Рис. 2. Подавление репликации ВИЧ-1/899А в линии клеток МТ-4/1 и МТ-4/2 препаратами 6НР и 3ТС. Индивидуальное (а) и комбинированное (б) противовирусное действие.

Fig. 2. Suppression of HIV-1/899A replication in MT-4/1 and MT-4/2 cell lines with compounds 6HP and 3TC. Individual (a) and combined (b) action of antivirals.

Обсуждение

Наличие двух разновидностей линии МТ-4, в которых продуктивность вирусов одних и тех же штаммов ВИЧ-1 была различной, поставило перед нами задачу выявления возможных причин. Было использовано несколько подходов. Прежде всего, мы предположили, что клетками МТ-4/2 могут секретироваться растворимые факторы, которые способны влиять на репликацию вируса. В связи с этим было изучено влияние растворимых факторов жизнедеятельности этих клеток на репликацию вируса в линии МТ-4/1 [11]. Результаты проведенных опытов показали отсутствие таковых.

Клетки МТ-4 представлены неопластическими CD4⁺ Т-лимфоцитами, трансформированными Т-лимфотропным дельта-ретровирусом человека 1-го типа (Retroviridae: Orthoretrovirinae: Deltaretrovirus: Human T-lymphotropic virus type 1; ТЛВЧ-1). Инфекция относится к злокачественным новообразованиям лимфоидной и кроветворной систем [13]. Линия клеток была получена от пациентов с Т-клеточной лейкемией/лимфомой взрослых. Клетки в высокой степени активированы и служат удобной моделью для вирусологических и молекулярно-биологических исследований. Известно, что репликация ВИЧ-1 происходит в активированных клетках и поэтому трансформированные клетки служат удобной экспериментальной моделью для изучения особенностей репликации этого вируса. Ранее нами была изучена экспрессия маркеров активации линией МТ-4 [14]. Однако уровень активации двух вариантов линии, использованных в настоящем исследовании, мог быть разным. Основными маркерами для оценки активационного потен-

циала клеток служат уровни экспрессии наружных белков CD28, CD38 и HLA-DR. Проведенные ранее исследования показали, что в процессе культивирования экспрессия HLA-DR в линиях была сходной и составляла 84–99%. По уровню экспрессии CD28 и CD38 они отличались. Наиболее существенное различие наблюдалось для белка CD38. Через 72 ч культивирования количество клеток, экспрессирующих этот белок, было в ~ 15 раз больше в высокопродуктивной линии [11]. CD38 является трансмембранным гликопротеином, выполняющим функции рецептора и фермента [15]. Полагают, что полностью его биологическая роль не изучена. Впервые он был обнаружен как рецептор в активированных клетках и в наибольшем количестве – в опухолевых клетках. В настоящее время показано, что белок CD38 играет существенную роль в метаболизме клеток и принимает участие во многих биохимических процессах на клеточном уровне. CD38 служит рецептором в регуляции механизмов высвобождения цитокинов, участвует в передаче сигналов в составе рецепторных комплексов, регулирует клеточную адгезию при межмолекулярных взаимодействиях клеток и внеклеточного пространства и диссеминацию клеток в организме. В качестве бифункционального фермента он контролирует внеклеточный гомеостаз нуклеотидов и внутриклеточные потоки кальция. Эти его функции важны при регуляции особенностей развития патологических процессов при инфекции, онкогенезе и старении. Обладая активностью гликогидролазы, CD38 участвует в накоплении энергии в окислительно-восстановительных реакциях, используя коферменты никотинамидадениндинуклеотида (НАД⁺ – окисленная форма, НАДН – восстановленная форма). Сочетая в себе ак-

тивность рибозилциклазы аденозиндифосфата (АДФ) и гидролазы циклической АДФ-рибозы (цАДФР), белок катализирует синтез цАДФР, АДФР и аденидинуклеотидфосфата никотиновой кислоты (АДФ-НК). Эти сигнальные молекулы участвуют в мобилизации ионов кальция ($[Ca^{2+}]$) из внутриклеточных депо кальциевых каналов внутриклеточных мембранных структур (эндоплазматического ретикулума). Внутриклеточный кальций необходим для многих физиологических и патологических процессов, происходящих в клетках крови, включая дегрануляцию, регуляцию взаимодействия белков цитоскелета, активацию клеточных киназ и фосфатаз, транскрипционный контроль и модуляцию поверхностных рецепторов. Ранее было показано, что кальций необходим на ранних этапах проникновения ВИЧ-1 в клетки [16]. Нельзя исключить, что кальций может играть роль на всех этапах взаимодействия вируса с клеткой, поскольку при репликации вируса неизбежно участие всех внутриклеточных мембран. Таким образом, возможно, что обнаруженным в настоящем исследовании усилением экспрессии белка CD38 и его способностью регулировать уровень внутриклеточного кальция можно объяснить повышение репликативной активности вируса в клетках МТ-4/2.

Возможны и другие причины усиления активности ВИЧ-1. Показано, что при репликации ВИЧ-1 в клетках происходят существенные перестройки, сопровождающиеся изменением в структуре мембран [17], снижением водородного показателя цитоплазмы (рН) [18], увеличением концентрации внутриклеточного калия ($[K^+]_i$) и натрия ($[Na^+]_i$) [19]. Авторы [19] связывают это только с усилением синцитиеобразующей активности ВИЧ-1, которая при этом не приводит к увеличению урожая вируса. Но следует отметить, что, по их данным, в хронически инфицированной ВИЧ-1 неопластической CD4⁺ Т-линии клеток, в которой практически отсутствует цитопатический эффект, уровень калия существенно выше, чем в контрольных неинфицированных клетках. Это указывает на то, при репликации ВИЧ-1 уровень калия в клетках повышается и это может быть фактором, необходимым для репликации вируса.

Причиной усиления репликации ВИЧ-1 может быть также различие в механизмах взаимодействия других внутриклеточных компонентов, которые могут влиять на инфекционный процесс. Как показали цитометрические исследования клеточных линий, кроме белка CD38, в высокопродуктивной линии усилена экспрессия белка CD28. Через 72 ч после пересева мы наблюдали повышение количества CD28⁺-клеток в ней в 3,2 раза [11]. Эта костимуляторная поверхностная белковая молекула играет ключевую роль в активации и регуляции функционирования CD4⁺ Т-клеток [20]. За последнее десятилетие использование передовых технологий позволило получить огромное количество данных о факторах хозяина, которые используются вирусами для распространения инфекции, а также о противовирусных факторах, ответственных за подавление вирусной инфекции. В патогенезе Т-клеточной

лейкемии/лимфомы взрослых, по-видимому, функциональная активность этого белка может быть одним из компонентов, регулирующим особенности развития онкогенного процесса. Изучены множественные изменения в гене этого белка и изменения в цепи последовательных активирующих сигналов, в которых этот белок принимает участие [21]. Его активация влияет на сигнальные пути, участвующие в регуляции экспрессии клетками интерлейкина-2 (ИЛ-2). ИЛ-2 регулирует активность индуцируемой Т-клеточной киназы (ИТК, семейство цитоплазматических ТЕС-тирозинкиназ) [22]. Было показано, что ИТК облегчает репликацию ВИЧ-1 и фермент необходим для эффективного проникновения вируса, обратной транскрипции, сборки и высвобождения вирусных частиц [23]. Таким образом, усиление активности ВИЧ-1 в линии МТ-4/2 также можно объяснить повышенной экспрессией белка CD28 и связанным с этим увеличением активности ИТК.

Использование двух вариантов клеточной линии МТ-4 с разной репликативной активностью позволило провести сравнительный анализ эффективности противовирусного действия НИОТ 6НР и ЗТС на ВИЧ-1 в зависимости от вирусной нагрузки. Наши исследования (рис. 2) показали, что степень ингибирования вирусной активности препаратами по отдельности была ниже в линии МТ-4/2. При этом противовирусный эффект ЗТС сильнее зависел от активности вируса, чем 6НР. При совместном использовании препаратов наблюдался высокий противовирусный эффект, и он не зависел от уровня репликации вируса. Высокая противовирусная активность обнаруживалась при совместном использовании меньших концентраций веществ, чем при их отдельном применении. При сочетанном применении препаратов антивирусный эффект был во всех случаях практически одинаков и колебался в пределах 87–96% для линии МТ-4/1 и 83–89% для линии МТ-4/2. Нельзя исключить, что метаболизм препаратов 6НР и ЗТС в клетках этих линий может иметь свои особенности и их выявление в дальнейшем позволит точнее оценить эффективность испытываемых препаратов.

Заключение

Полученные результаты указывают на то, что в экспериментальной системе *in vitro* ВИЧ-1/клетки МТ-4 при индивидуальном использовании НИОТ 6НР и ЗТС наблюдался сниженный противовирусный эффект в системе с большей вирусной активностью. Сочетанное использование препаратов показало высокий уровень ингибирования при использовании меньших доз препаратов вне зависимости от репликативной активности вируса. Сочетанное использование этих препаратов является перспективным для лечения ВИЧ-инфицированных пациентов на различных стадиях инфекции и с различным уровнем вирусной нагрузки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Киреев Д.Е., Кириченко А.А., Лопатухин А.Э., Шлыкова А.В., Галкин Н.Ю., Савельев Е.В. и др. Российская база данных лекарственных устойчивости ВИЧ к антиретровирусным препаратам. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*

- логии. 2023,100(2):219-227. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-345>
2. Ndung'u T., McCune J.M., Deeks S.G. Why and where an HIV cure is needed and how it might be achieved. *Nature*. 2019; 576(7787): 397–405. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1841-8>
 3. Menéndez-Arias L., Sebastián-Martín A., Álvarez M. Viral reverse transcriptases. *Virus Res*. 2017; 234: 153–76. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.12.019>
 4. Mitsuya H., Weinhold K.J., Furman P.A., St Clair M.H., Lehrman S.N., Gallo R.C., et al. 3'-azido-3'-deoxythymidine (BW A₅₀₉U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1985; 82(20): 7096–100. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.7096>
 5. Menéndez-Arias L. Molecular basis of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance: overview and recent developments. *Antiviral Res*. 2013; 98(1): 93–120. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.01.007>
 6. Хандажинская А.Л., Широкова Е.А. 5'-фосфонаты AZT: достижения и перспективы в лечении и профилактике ВИЧ-инфекции. *Acta Naturae*. 2013; 5(3): 57–65. <https://elibrary.ru/rwasll>
 7. Галегов Г.А., Андронова В.Л. АнтиВИЧ/СПИД-препарат 6НР: антивирусная активность, доклиническое изучение. Эффективность у взрослых ВИЧ-инфицированных больных. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(1): 12–5. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-12-15> <https://elibrary.ru/yzkhjj>
 8. Quercia R., Perno C.F., Koteff J., Moore K., McCoig C., St Clair M., et al. Twenty-five years of lamivudine: current and future use for the treatment of HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*. 2018; 78(2): 125–35. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000001660>
 9. Perry C.M., Faulds D. Lamivudine. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV infection. *Drugs*. 1997; 53(4): 657–80. <https://doi.org/10.2165/00003495-199753040-00008>
 10. Ma A., Chen D.M., Chau F.M., Saberi P. Improving adherence and clinical outcomes through an HIV pharmacist's interventions. *AIDS Care*. 2010; 22(10): 1189–94. <https://doi.org/10.1080/09540121003668102>
 11. Носик Д.Н., Калнина Л.Б., Селимова Л.М., Пронин А.В. Увеличение инфекционности вируса иммунодефицита человека при модификации гена CCR5 чувствительных клеток. *Доклады Российской Академии наук. Науки о жизни*. 2023; 511(1): 344–8. <https://doi.org/10.31857/S2686738923700257> <https://elibrary.ru/jiltbd>
 12. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 1983; 65(1-2): 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
 13. Manns A., Hisada M., La Grenada L. Human T-lymphotropic virus type 1 infection. *Lancet*. 1999; 353(9): 1951–8. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(98\)09460-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(98)09460-4)
 14. Селимова Л.М., Калнина Л.Б., Носик Д.Н. Поверхностные маркеры неопластической клеточной линии МТ-4 и перспективы её использование в качестве модели при изучении активности иммуномодулирующих препаратов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016, 61(12): 822–5. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-12-822-825> <https://elibrary.ru/xscfqz>
 15. Morandi F., Airoidi I., Marimpietri D., Bracci C., Faini A.C., Gramignoli R. CD38, a receptor with multifunctional activities: from modulatory functions on regulatory cell subsets and extracellular vesicles, to a target for therapeutic strategies. *Cells*. 2019; 8(12): 1527–44. <https://doi.org/10.3390/cells8121527>
 16. Dimitrov D.S., Broder C.C., Berger E.A., Blumenthal R. Calcium ions are required for cell fusion mediated by the CD4-human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interaction. *J. Virol*. 1993; 67(3): 1647–52. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.3.1647-1652.1993>
 17. Cloyd M.W., Lynn W.S. Perturbation of host-cell membrane is a primary mechanism of HIV cytopathology. *Virology*. 1991; 181(2): 500–11. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90882-c](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90882-c)
 18. Makutonina A., Voss T.G., Plymale D.R., Fermin C.D., Norris C.H., Vigh S., et al. Human immunodeficiency virus infection of T-lymphoblastoid cells reduces intracellular pH. *J. Virol*. 1996; 70(10): 7049–55. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.10.7049-7055.1996>
 19. Voss T.G., Fermin C.D., Levy J.A., Vigh S., Choi B., Garry R.F. Alteration of intracellular potassium and sodium concentrations with induction of cytopathic effects by human immunodeficiency virus. *J. Virol*. 1996; 70(8): 5447–54. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.8.5447-5454.1996>
 20. Esensten J.H., Helou Y.A., Chopra G., Weiss A., Bluestone J.A. CD28 costimulation: from mechanism to therapy. *Immunity*. 2016; 44(5): 973–88. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.020>
 21. Sakamoto Y., Ishida T., Masaki A., Takeshita M., Iwasaki H., Yonekura K., et al. Clinical significance of CD28 gene-related activating alterations in adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Br. J. Haematol*. 2021; 192(2): 281–91. <https://doi.org/10.1111/bjh.17211>
 22. Lechner K.S., Neurath M.F., Weigmann B. Role of the IL-2 inducible tyrosine kinase ITK and its inhibitors in disease pathogenesis. *J. Mol. Med. (Berl)*. 2020; 98(10): 1385–95. <https://doi.org/10.1007/s00109-020-01958-z>
 23. Radinger J.A., Schiralli G.M., Jiang J.K., Thomas C.J., Avery A., Henderson A.J., et al. Selective targeting of ITK blocks multiple steps of HIV replication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2008; 105(18): 6684–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709659105>

REFERENCES

1. Kireev D.E., Kirichenko A.A., Lopatukhin A.E., Shlykova A.V., Galkin N.Yu, Saveler E.V et al. The Russian database of HIV antiretroviral drug resistance. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2023,100(2):219-227. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-345>
2. Ndung'u T., McCune J.M., Deeks S.G. Why and where an HIV cure is needed and how it might be achieved. *Nature*. 2019; 576(7787): 397–405. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1841-8>
3. Menéndez-Arias L., Sebastián-Martín A., Álvarez M. Viral reverse transcriptases. *Virus Res*. 2017; 234: 153–76. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.12.019>
4. Mitsuya H., Weinhold K.J., Furman P.A., St Clair M.H., Lehrman S.N., Gallo R.C., et al. 3'-azido-3'-deoxythymidine (BW A₅₀₉U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1985; 82(20): 7096–100. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.7096>
5. Menéndez-Arias L. Molecular basis of human immunodeficiency virus type 1 drug resistance: overview and recent developments. *Antiviral Res*. 2013; 98(1): 93–120. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.01.007>
6. Khandazhinskaya A.L., Shirokova E.A. AZT 5'-Phosphonates: achievements and trends in the treatment and prevention of HIV infection. *Acta Naturae*. 2013; 5(3): 54–61. <https://elibrary.ru/rvzyvv>
7. Galegov G.A.I., Andronova V.L. AntiHIV/AIDS drug 6HR: antiviral activity, pre-clinical study. Efficiency in adult HIV-infected patients. *Voprosy virusologii*. 2019; 64(1): 12–5. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-1-12-15> <https://elibrary.ru/yzkhjj> (in Russian)
8. Quercia R., Perno C.F., Koteff J., Moore K., McCoig C., St Clair M., et al. Twenty-five years of lamivudine: current and future use for the treatment of HIV-1 infection. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr*. 2018; 78(2): 125–35. <https://doi.org/10.1097/QAI.0000000000001660>
9. Perry C.M., Faulds D. Lamivudine. A review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of HIV infection. *Drugs*. 1997; 53(4): 657–80. <https://doi.org/10.2165/00003495-199753040-00008>
10. Ma A., Chen D.M., Chau F.M., Saberi P. Improving adherence and clinical outcomes through an HIV pharmacist's interventions. *AIDS Care*. 2010; 22(10): 1189–94. <https://doi.org/10.1080/09540121003668102>
11. Nosik D.N., Kalnina L.B., Selimova L.M., Pronin A.V. An increase in the infectivity of the human immunodeficiency virus with modification of the CCR5 gene receptor of sensitive cells. *Doklady Rossijskoi Akademii nauk. Nauki o zhizni*. 2023; 511(1): 344–8. <https://doi.org/10.31857/S2686738923700257> <https://elibrary.ru/jiltbd> (in Russian)
12. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*. 1983; 65(1-2): 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
13. Manns A., Hisada M., La Grenada L. Human T-lymphotropic virus type 1 infection. *Lancet*. 1999; 353(9): 1951–8. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(98\)09460-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(98)09460-4)

14. Selimova L.M., Kalnina L.B., Nosik D.N. The superficial markers of neoplastic cell line MT-4 and perspectives of its application as a model for studying activity of immune modulating preparations. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2016; 61(12): 822–5. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-12-822-825> <https://elibrary.ru/xsefzqz> (in Russian)
15. Morandi F., Airoidi I., Marimpietri D., Bracci C., Faini A.C., Gramignoli R. CD38, a receptor with multifunctional activities: from modulatory functions on regulatory cell subsets and extracellular vesicles, to a target for therapeutic strategies. *Cells*. 2019; 8(12): 1527–44. <https://doi.org/10.3390/cells8121527>
16. Dimitrov D.S., Broder C.C., Berger E.A., Blumenthal R. Calcium ions are required for cell fusion mediated by the CD4-human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interaction. *J. Virol.* 1993; 67(3): 1647–52. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.3.1647-1652.1993>
17. Cloyd M.W., Lynn W.S. Perturbation of host-cell membrane is a primary mechanism of HIV cytopathology. *Virology*. 1991; 181(2): 500–11. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90882-c](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90882-c)
18. Makutonina A., Voss T.G., Plymale D.R., Fermin C.D., Norris C.H., Vigh S., et al. Human immunodeficiency virus infection of T-lymphoblastoid cells reduces intracellular pH. *J. Virol.* 1996; 70(10): 7049–55. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.10.7049-7055.1996>
19. Voss T.G., Fermin C.D., Levy J.A., Vigh S., Choi B., Garry R.F. Alteration of intracellular potassium and sodium concentrations with induction of cytopathic effects by human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 1996; 70(8): 5447–54. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.8.5447-5454.1996>
20. Esensten J.H., Helou Y.A., Chopra G., Weiss A., Bluestone J.A. CD28 costimulation: from mechanism to therapy. *Immunity*. 2016; 44(5): 973–88. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.04.020>
21. Sakamoto Y., Ishida T., Masaki A., Takeshita M., Iwasaki H., Yonekura K., et al. Clinical significance of CD28 gene-related activating alterations in adult T-cell leukaemia/lymphoma. *Br. J. Haematol.* 2021; 192(2): 281–91. <https://doi.org/10.1111/bjh.17211>
22. Lechner K.S., Neurath M.F., Weigmann B. Role of the IL-2 inducible tyrosine kinase ITK and its inhibitors in disease pathogenesis. *J. Mol. Med. (Berl.)*. 2020; 98(10): 1385–95. <https://doi.org/10.1007/s00109-020-01958-z>
23. Readinger J.A., Schiralli G.M., Jiang J.K., Thomas C.J., Avery A., Henderson A.J., et al. Selective targeting of ITK blocks multiple steps of HIV replication. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2008; 105(18): 6684–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0709659105>

Информация об авторах:

Калнина Людмила Борисовна – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории противовирусных и дезинфекционных средств Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: klb3@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2702-8578>

Селимова Людмила Мидатовна – д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории противовирусных и дезинфекционных средств Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: lselim@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3709-770X>

Носик Дмитрий Николаевич – д-р мед. наук, профессор, руководитель лаборатории противовирусных и дезинфекционных средств Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: dnnosik@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5757-5671>

Участие авторов: Все перечисленные авторы внесли существенный, прямой и интеллектуальный вклад в работу и одобрили ее для публикации.

Поступила 08.07.2024
Принята в печать 04.09.2024
Опубликована 31.10.2024

Information about the authors:

Lyudmila B. Kalnina – Candidate of Biological Sciences, Leading researcher of the Laboratory of Antiviral and Disinfection Agents, The D.I. Ivanovsky Institute of Virology FSBI «National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: klb3@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2702-8578>

Lyudmila M. Selimova – Doctor of Biological Sciences, Leading researcher of the Laboratory of Antiviral and Disinfection Agents, The D.I. Ivanovsky Institute of Virology FSBI «National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: lselim@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3709-770X>

Dmitry N. Nosik – Professor, Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Antiviral and Disinfection Agents, The D.I. Ivanovsky Institute of Virology FSBI «National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia. E-mail: dnnosik@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5757-5671>

Contribution: All authors listed have made a substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

Received 08 July 2024
Accepted 04 September 2024
Published 31 October 2024

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-251>

© ТИХОМИРОВ Д.С., ДЕМИН М.В., СЕРИКОВА А.А., БИДЕРМАН Б.В., СУДАРИКОВ А.Б., ФИЛАТОВ Ф.П., ТУПОЛЕВА Т.А., 2024



Мутации в гене *UL97* цитомегаловируса (Orthoherpesviridae: *Herpesvirales: Cytomegalovirus: Cytomegalovirus humanbeta 5*) увеличивают продолжительность виремии и снижают противовирусный ответ у реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток

Тихомиров Д.С.¹, Демин М.В.^{1✉}, Серикова А.А.¹, Бидерман Б.В.¹, Судариков А.Б.¹, Филатов Ф.П.², Туполева Т.А.¹¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, 125167, г. Москва, Россия;²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва, Россия

Резюме

Введение. Цитомегаловирус (Orthoherpesviridae: *Herpesvirales: Cytomegalovirus: Cytomegalovirus humanbeta 5*) (ЦМВ) является одним из наиболее распространенных вирусов, детектируемых у реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ГСК). При этом возможность развития резистентности вируса к противовирусным препаратам, таким как ганцикловир (GCV), создает сложности при проведении противовирусной терапии (ПВТ). Настоящее исследование позволяет обосновать необходимость внедрения новых диагностических подходов для улучшения результатов лечения у реципиентов алло-ГСК.

Цель исследования – изучение распространенности и влияния мутаций в гене *UL97* ЦМВ, ассоциированных с устойчивостью к действию GCV, на характер течения инфекции у реципиентов алло-ГСК.

Материалы и методы. В исследование вошли 14 реципиентов алло-ГСК с подозрением на устойчивую ЦМВ-инфекцию. Проводили амплификацию участка гена *UL97* методом гнездовой полимеразной цепной реакции, осуществляли секвенирование по Сэнгеру, последовательности сравнивали со штаммом Merlin (дикий тип).

Результаты и обсуждение. Выявлено 6 мутаций (D490A, T502A, C592G, C592F, E596G и C603W), из которых 4 (C592G, C592F, E596G и C603W) ранее были описаны как ассоциированные с устойчивостью к действию противовирусных препаратов, а D490A и T502A обнаружены впервые. При сравнении параметров пациентов – носителей вируса дикого типа и носителей мутантного варианта, установлено, что основные показатели периферической крови у первых были достоверно ниже. Медиана срока наступления пика вирусной нагрузки после трансплантации алло-ГСК, продолжительность виремии и скорость вирусологического ответа на ПВТ также имели достоверные различия в исследуемых группах.

Заключение. Показано, что почти у 1/3 (4 из 14) реципиентов алло-ГСК выявлены мутации, ассоциированные с устойчивостью к действию GCV. У реципиентов – носителей мутантного варианта ЦМВ наблюдались более длительные виремии и срок получения отрицательного результата вирусологического исследования после начала ПВТ. Проведение генотипирования может способствовать принятию более обоснованного терапевтического решения.

Ключевые слова: цитомегаловирус (ЦМВ) человека; трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК); вирусная резистентность; ганцикловир (GCV); противовирусная терапия (ПВТ)

Для цитирования: Тихомиров Д.С., Демин М.В., Серикова А.А., Бидерман Б.В., Судариков А.Б., Туполева Т.А. Мутации в гене *UL97* цитомегаловируса (Orthoherpesviridae: *Herpesvirales: Cytomegalovirus: Cytomegalovirus humanbeta 5*) увеличивают продолжительность виремии и снижают противовирусный ответ у реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток. *Вопросы вирусологии.* 2024; 69(5): 449–458. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-251> EDN: <https://elibrary.ru/vrdyiz>

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

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

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России (Протокол № 160 от 23.12.2021).

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-251>

Mutations in human cytomegalovirus (Orthoherpesviridae: *Herpesvirales*: *Cytomegalovirus*: *Cytomegalovirus humanbeta 5*) UL97 gene lead to increase in viremia duration and poor antiviral response in recipients of allogeneic hematopoietic stem cells

Dmitriy S. Tikhomirov¹, Mikhail V. Demin¹✉, Anastasia A. Serikova¹, Bella V. Biderman¹, Andrey B. Sudarikov¹, Felix P. Filatov², Tatiana A. Tupoleva¹

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

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

Abstract

Introduction. Human cytomegalovirus (Orthoherpesviridae: *Herpesvirales*: *Cytomegalovirus*: *Cytomegalovirus humanbeta 5*) (HCMV) is one of the most commonly detected viruses in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell (allo-HSCT) transplants. However, the emergence of resistance to antiviral drugs such as ganciclovir (GCV) poses a challenge in managing these patients.

This study **aims** to investigate the prevalence and impact of mutations in the HCMV UL97 gene associated with resistance to GCV on the course of infection among allo-HSCT patients.

Materials and methods. The study examined the association between UL97 mutations and the clinical course of HCMV infection in allo-HSCT patients. Genetic sequencing was performed to identify mutations, and their impact on viral replication and resistance to GCV was assessed.

Results and discussion. Six mutations were identified (D490A, T502A, C592G, C592F, E596G, C603W). C592G, C592F, E596G, and C603W are associated with resistance to antiviral drugs, while D490A and T502A described for the first time. When comparing patients with wild-type and those carrying the mutant variant, several parameters of peripheral blood were significantly lower in the former group. The median time to peak viral load following allo-HSCT, duration of viremia, and rate of virological response to high-dose therapy also differed significantly between the two groups.

Conclusion. It was shown that approximately one third (4 out of 14) of allogeneic stem cell transplant recipients had mutations associated with resistance to GCV. Patients carrying the mutant variant of HCMV had longer viremia and took longer to achieve a negative virological test result after starting high-dose therapy. Performing genotyping may help make more evidence-based therapeutic decisions.

Keywords: human cytomegalovirus (HCMV); hematopoietic stem cells (HSCs) transplantation; viral chemoresistance; ganciclovir (GCV); antiviral therapy

For citation: Tikhomirov D.S., Demin M.V., Serikova A.A., Biderman B.V., Sudarikov A.B., Tupoleva T.A. Mutations in human cytomegalovirus (Orthoherpesviridae: *Herpesvirales*: *Cytomegalovirus*: *Cytomegalovirus humanbeta 5*) UL97 gene lead to increase in viremia duration and poor antiviral response in recipients of allogeneic hematopoietic stem cells. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(5): 449–458. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-251> EDN: <https://elibrary.ru/vrдыz>

Funding. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Ethics approval. The study was conducted with the voluntary informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the National Medical Research Center for Hematology of the Ministry of Health of Russia (Protocol No. 160 dated December 23, 2021).

Введение

Инфекция, вызываемая цитомегаловирусом (Orthoherpesviridae: *Herpesvirales*: *Cytomegalovirus*: *Cytomegalovirus humanbeta 5*) (ЦМВ), представляет серьезную угрозу для лиц в состоянии иммуносупрессии, к которым можно отнести ВИЧ-инфицированных (особенно в стадии СПИДа), пациентов с опухолевыми заболеваниями и реципиентов органов или тканей [1–3]. Для специфической противовирусной терапии (ПВТ) используют препараты, ингибирующие различные вирусные ферменты: вирусную ДНК-поли-

меразу – pUL54 (ганцикловир (GCV), цидофовир и фоскарнет), вирусную фосфотрансферазу – pUL97 (маривавир), вирусный терминальный комплекс ферментов (летермовир) [4, 5]. Однако в Российской Федерации, как и за рубежом, из-за ограниченного числа разрешенных к применению противовирусных лекарственных средств препаратом выбора является GCV или его пролекарство – валганцикловир [6–8]. Фосфорилированный вирусный фермент GCV является аналогом нуклеотида дезоксигуанозина, который накапливается в инфицированных ЦМВ клетках и пре-

пятствует репликации вируса путем терминального встраивания в растущую цепь вирусной ДНК [9, 10].

Однако применение GCV в течение длительного времени и в субоптимальных дозах может способствовать отбору лекарственно-устойчивых мутантных штаммов ЦМВ, репликация которых не блокируется в присутствии действующего вещества препарата [11]. Согласно данным литературы, мутации, ассоциированные с устойчивостью к действию GCV, локализируются в генах *UL97* и *UL54*. В гене *UL97* мутации чаще возникают в кодонах 460, 520 и 590–607 [4, 12], не нарушая жизненный цикл вируса, но снижая сродство фермента к GCV [13].

Несмотря на достижения в области профилактики и лечения ЦМВ-инфекции, ее устойчивость к действию противовирусных препаратов до сих пор вызывает опасения со стороны специалистов. Ранее были представлены данные о распространенности лекарственно-устойчивых мутантов ЦМВ у пациентов после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) и предложены возможные алгоритмы противовирусного лечения в подобных ситуациях [14, 15]. Тем не менее крайне скудны сведения о влиянии подобных мутаций на характер течения инфекции и на выживаемость пациентов. Также неясным остается вопрос о целесообразности рутинного скрининга на мутации при проведении ПВТ. Таким образом, дальнейшие исследования представляются крайне актуальными и важными для современной медицинской науки, в том числе в вопросах развития персонализированной медицины.

Цель исследования – изучение распространенности и влияния мутаций в гене *UL97* ЦМВ, ассоциированных с устойчивостью к действию ганцикловира, на характер течения инфекции у реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ГСК).

Материалы и методы

Пациенты и образцы

Исследование было проведено при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России (Протокол № 160 от 23.12.2021).

В исследование были включены реципиенты алло-ГСК с признаками устойчивой ЦМВ-инфекции в посттрансплантационном периоде. Признаком такой формы инфекции считали наличие высокой вирусной нагрузки в крови – 1000 или более копий геном-эквивалент на 10 тыс. ядродержащих клеток крови (коп.) – в течение 2 нед и более на фоне проведения ПВТ. Всего в исследование включили 14 реципиентов алло-ГСК, удовлетворяющих этим критериям. У всех реципиентов в качестве источника трансплантата был использован концентрат гемопоэтических стволовых клеток крови (ГСК) [16], и у большинства (12 из 14) проведена частично-совместимая алло-ТГСК.

Поиск мутаций осуществляли в участке гена *UL97* ЦМВ с 420 по 630 кодоны методом секвенирования по Сэнгеру. Исследовали образец крови пациента, в котором вирусная нагрузка была максимальной. Далее проводили сбор и анализ клинико-лабораторных данных реципиентов за период 2 мес до фиксации высокой вирусной нагрузки и 2 мес после фиксации. Характеристики пациентов представлены в **табл. 1**.

Все пациенты, кроме одного, получали в качестве ПВТ GCV или валганциклоvir в среднем с 1-х или 3-х суток после выявления пика вирусной нагрузки. Ни один из пациентов, включенных в исследование, не умер за время наблюдения.

Аmplификация методом nested-PCR для получения продукта для последующего секвенирования

Аmplификацию методом гнездовой полимеразной цепной реакции (nested-PCR) проводили с помощью реагентов «Genta PCR мастер-микс» фирмы Genterra (США). Для первого раунда nested-PCR из расчета

Таблица 1. Характеристики реципиентов алло-ГСК, включенных в исследование

Table 1. Characteristics of allo-HSC recipients included in the study

Параметр Parameter	Величина Value
Всего пациентов, абс. Total patients, abs.	14
Пол, мужчины/женщины Gender, male/female	5/9
Медиана возраста, лет (диапазон) Median age, years (range)	40 (28–65)
Основной диагноз The main diagnosis	Число пациентов, <i>n</i> Number of patients, <i>n</i>
острый миелоидный лейкоз acute myeloid leukemia	7
острый лимфобластный лейкоз acute lymphoblastic leukemia	3
апластическая анемия aplastic anemia	1
первичный миелофиброз primary myelofibrosis	1
диффузная В-крупноклеточная лимфома diffuse B-large cell lymphoma	1
фолликулярная лимфома follicular lymphoma	1
Вид трансплантации Type of transplantation	Число пациентов, <i>n</i> Number of patients, <i>n</i>
родственная частично-совместимая related partially compatible	7
неродственная частично-совместимая unrelated partially compatible	4
неродственная полностью совместимая unrelated fully compatible	2
родственная полностью совместимая related fully compatible	1

на одну пробирку использовали следующую амплификационную смесь: деионизованная вода (8 мкл), «Genta PCR мастер-микс» (5 мкл), раствор прямого (Forward) и обратного (Reverse 1) праймеров (табл. 2) по 1 мкл (концентрация праймеров 100 пмоль/мл), образец ДНК – 10 мкл. Общий объем смеси для первого раунда nested-PCR составлял 25 мкл.

Программа амплификации первого раунда nested-PCR:

- начальная температура плавления 95 °C (5 мин);
- 32 цикла: 95 °C (10 с), 55 °C (40 с), 72 °C (1 мин);
- финальная элонгация – 72 °C (5 мин).

Амплификационная смесь для второго раунда амплификации: продукт первого раунда амплификации (1 мкл), раствор прямого (Forward) и обратного (Reverse 2) праймеров (табл. 2) по 1 мкл (концентрация праймеров 100 пмоль/мл), «Genta PCR мастер-микс» (5 мкл), деионизованная вода 17 мкл. Общий объем смеси для второго раунда nested-PCR составлял 25 мкл.

Программа амплификации второго раунда nested-PCR:

- начальная температура плавления 95 °C (5 мин);
- 5 циклов: 95 °C (10 с), 64 °C (10 с), 72 °C (30 с);
- 25 циклов: 95 °C (10 с), 60 °C (15 с);
- финальная элонгация – 72 °C (5 мин).

Секвенирование ДНК по Сэнгеру

Методом электрофореза в 2% агарозном геле подтверждали наличие продуктов nested-PCR для дальнейшего секвенирования с помощью набора реагентов «BrilliantDye версии 1.1, набор для циклического секвенирования» производства NimaGen (Нидерланды). Секвенирование проводили на приборе «Нанофор 05». Для исключения ложноположительных результатов независимо секвенировали как смысловые, так и матричные цепи ДНК и проверяли совпадение результатов. Данные, полученные в ходе секвенирования, анализировали с помощью компьютерной программы Sequencing Analysis 5.31.

На следующем этапе анализа данных с помощью платформы Benchling (<https://www.benchling.com>) сравнивали полученные нуклеотидные последовательности с референсной последовательностью гена *UL97* штамма Merlin (GenBank accession No: AY446894.2), который считается штаммом дикого типа.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием статистического программного обеспечения (Minitab для Windows, версия 22.1; Minitab LLC). Точный критерий Фишера использовали для сравнения категориальных переменных между группами пациентов – носителей мутантного штамма и штамма дикого типа. *U*-критерий Манна–Уитни был использован для сравнения непрерывных переменных в изучаемых группах. Факторный анализ (Factorial ANOVA) применяли для оценки силы влияния изучаемых факторов на исследуемые при-

знаки. За уровень статистической значимости принимали $p < 0,05$.

Результаты

Распространенность мутаций в гене UL97 ЦМВ у реципиентов алло-ТГСК с эпизодом устойчивой инфекции

В образцах ДНК ЦМВ, выделенной из крови 5 из 14 пациентов, были обнаружены 6 мутаций (D490A, T502A, C592G, C592F E596G и C603W). Четыре из них были ранее описаны в литературе (C592G [17], C592F [18], E596G [19] и C603W [20]) как мутации, ассоциированные с устойчивостью вируса к действию противовирусных препаратов. Остальные мутации (D490A и T502A) ранее в литературе не встречались. У одного пациента обнаружены две мутации одновременно, причем обе мутации обладали устойчивостью к действию GCV (C592G и C603W). Результаты приведены табл. 3.

Не было обнаружено связи факта выявления мутации с основным диагнозом и видом алло-ТГСК. У одного пациента (Wt_9) пик вирусной нагрузки наблюдался за 28 сут до выполнения алло-ТГСК. Практически у всех носителей вируса дикого типа максимальная вирусная нагрузка наблюдалась на ранних сроках после алло-ТГСК (до +100 сут). У подавляющего большинства пациентов – носителей мутантного варианта вируса, напротив, этот пик фиксировался на сроках более 100 сут после алло-ТГСК.

Сравнение клинико-лабораторных данных пациентов – носителей вируса дикого типа и мутантного варианта вируса

Для оценки влияния мутаций на характер течения инфекции пациенты были разделены на две группы. В «группу Wt» были включены носители вируса дикого типа, а носители мутантного варианта вируса – в «группу Mt» (табл. 4). Были собраны и проанализированы клинико-лабораторные данные пациентов за 2 мес до наступления максимальной вирусной нагрузки и 2 мес спустя.

Далее были проанализированы показатели периферической крови, продолжительность виремии и срок наступления вирусологического ответа на ПВТ. Данные представлены в табл. 5, 6.

Основные показатели периферической крови реципиентов-носителей вируса дикого типа были достоверно ниже, чем у носителей мутантного варианта вируса.

Таблица 2. Праймеры, использованные для nested-PCR и секвенирования

Table 2. Primers used for nested-PCR and sequencing

Название праймера Primer name	Последовательность олигонуклеотидов (5'-3') Sequence (5'-3')
Forward	ACAACGTACCGGTACATCGA
Reverse 1	GTCGTAGTCCAAACTCGAGA
Reverse 2	CGACACGAGGACATCTTGG

Таблица 3. Выявленные мутации в геноме ЦМВ и сроки наступления пиков вирусной нагрузки у всех пациентов

Table 3. Identified mutations in the HCMV genome and the timing of the onset of viral load peaks in all patients

Код пациента Patient code	Основной диагноз The main diagnosis	Вид алло-ТГСК Allo-HSCT type	Наличие мутации Mutation	Срок наступления пика вирусной нагрузки после алло-ТГСК, сут Onset of the peak viral load after allo-HSCT, days
Mt_1	ОМЛ Acute myeloid leukemia	Р, ЧС R, PC	C592G C603W	+118
Mt_2	ФЛ Follicular lymphoma	НР, ПС UR, FC	E596G	+152
Mt_3	ОМЛ Acute myeloid leukemia	НР, ПС UR, FC	C592F	+405
Mt_4	ОЛЛ Acute lymphoblastic leukemia	НР, ЧС UR, PC	D490A	+314
Mt_5	ОМЛ Acute myeloid leukemia	НР, ЧС UR, PC	T502A	+18
Wt_1	ОЛЛ Acute lymphoblastic leukemia	НР, ЧС UR, PC	Не обнаружена Not detected	+167
Wt_2	ОМЛ Acute myeloid leukemia	НР, ЧС UR, PC	Не обнаружена Not detected	+70
Wt_3	АА Aplastic anemia	Р, ПС R, FC	Не обнаружена Not detected	+23
Wt_4	ОМЛ Acute myeloid leukemia	Р, ЧС R, PC	Не обнаружена Not detected	+39
Wt_5	ПМФ Primary myelofibrosis	Р, ЧС R, PC	Не обнаружена Not detected	+50
Wt_6	ДВККЛ Diffuse B-large cell lymphoma	Р, ЧС R, PC	Не обнаружена Not detected	+63
Wt_7	ОЛЛ Acute lymphoblastic leukemia	Р, ЧС R, PC	Не обнаружена Not detected	+16
Wt_8	ОМЛ Acute myeloid leukemia	Р, ЧС R, PC	Не обнаружена Not detected	+60
Wt_9	ОМЛ Acute myeloid leukemia	Р, ЧС R, PC	Не обнаружена Not detected	-28

Примечание. АА – апластическая анемия; ДВККЛ – диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома; ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; ПМФ – первичный миелофиброз; ФЛ – фолликулярная лимфома; НР – неродственная алло-ТГСК; ЧС – частично-совместимая алло-ТГСК; Р – родственная алло-ТГСК; ПС – полностью совместимая алло-ТГСК.

Note. UR – unrelated allo-HSCT; PC – partially compatible allo-HSCT; R – related allo-HSCT; FC – fully compatible allo-HSCT.

Таблица 4. Демографические характеристики пациентов

Table 4. Demographic characteristics of patients

Параметр Parameter	Все пациенты All patients	Группа Wt Group Wt	Группа Mt Group Mt	<i>p</i>
Число пациентов, абс. Number of patients, abs.	14	9	5	
Пол, муж/жен Gender, male/female	5/9	4/5	1/4	NS
Медиана возраста (диапазон) Median age (range)	40 (28–65)	42 (28–65)	43 (39–52)	NS

Примечание. NS – разница незначима.

Note. NS – the difference is not significant.

Медиана срока наступления пика вирусной нагрузки после алло-ТГСК, продолжительность виремии и скорость вирусологического ответа на ПВТ не имели достоверных различий в исследуемых группах.

Полученные результаты вызвали некоторые сомнения, т.к. противоречили данным литературы [14]. Были сформированы новые группы для анализа: пациент с ранее неописанной мутацией T502A был исклю-

Таблица 5. Основные показатели периферической крови пациентов

Table 5. The main indicators of peripheral blood of patients

Параметр Parameter	Все пациенты All patients	Группа Wt Group Wt	Группа Mt Group Mt	<i>p</i>
Гемоглобин, г/л, среднее ± SD Hemoglobin, g/l, average ± SD	83,2 ± 15,6	82,4 ± 16,3	85,0 ± 14,3	0,036
Тромбоциты, тыс/мкл, среднее ± SD Platelets, thousand/μl, average ± SD	92,0 ± 68,7	73,5 ± 55,5	127,7 ± 77,3	< 0,001
Лейкоциты, тыс/мкл, среднее ± SD Leukocytes, thousand/μl, average ± SD	2,9 ± 2,4	2,7 ± 2,5	3,5 ± 2,0	< 0,001

Примечание. Здесь и в табл. 6, 7: SD – стандартное отклонение.

Note. Here and in tables 6, 7: SD – standard deviation.

Таблица 6. Длительность вiremии и срок наступления вирусологического ответа на ПВТ у пациентов

Table 6. Duration of viremia and time of onset of virological response to antiviral therapy in patients

Параметр Parameter	Все пациенты All patients	Группа Wt Group Wt	Группа Mt Group Mt	<i>p</i>
Медиана срока наступления пика вирусной нагрузки после алло-ТГСК, сут (диапазон) Median time of onset of peak viral load after allo-HSCT, days (range)	69 (1–405)	50 (1–167)	152 (18–405)	0,083
Продолжительность вiremии, сут, среднее ± SD Duration of viremia, days, average ± SD	37,7 ± 29,1	25,8 ± 16,6	61,6 ± 35,6	0,075
Вирусологический ответ* на ПВТ, сут, среднее ± SD Virological response* to antiviral therapy, days, average ± SD	19,3 ± 19,4	13,0 ± 11,1	35,0 ± 28,2	0,102

Примечание. * – данные пациента Mt_2 не учитывали (не получал ПВТ).

Note. * – Mt_2 patient data was not taken into account (did not receive antiviral therapy).

Таблица 7. Сравнение показателей пациентов во вновь образованных группах

Table 7. Comparison of patient indicators in newly formed groups

Параметр Parameter	Группа Wt_new Group Wt_new	Группа Mt_new Group Mt_new	<i>p</i>
Число пациентов, абс. Number of patients, abs.	10	4	
Гемоглобин, г/л, среднее ± SD Hemoglobin, g/l, average ± SD	82,7 ± 16,3	84,7 ± 13,5	0,036
Тромбоциты, тыс/мкл, среднее ± SD Platelets, thousand/μl, average ± SD	77,7 ± 57,2	127,9 ± 81,1	< 0,001
Лейкоциты, тыс/мкл, среднее ± SD Leukocytes, thousand/μl, average ± SD	2,7 ± 2,5	3,5 ± 2,0	< 0,001
Медиана срока наступления пика вирусной нагрузки после алло-ТГСК, сут (диапазон) Median time of onset of peak viral load after allo-HSCT, days (range)	46 (1–167)	233 (118–405)	0,013
Продолжительность вiremии, сут, среднее ± SD Duration of viremia, days, average ± SD	24,2 ± 16,7	75,0 ± 22,2	0,007
Вирусологический ответ на ПВТ, сут, среднее ± SD Virological response to antiviral therapy, days, average ± SD	12,5 ± 10,7	44,3 ± 25,9	0,029

чен из группы пациентов с мутациями устойчивости (показатели этого пациента кардинально отличались от пациентов – носителей мутации устойчивости). После перераспределения пациентов по вышеописанным группам был проведен повторный анализ, результаты которого представлены в **табл. 7**.

Обсуждение

Следует различать рефрактерную и резистентную ЦМВ-инфекцию. Так, рефрактерность – это клиническое определение, основанное на критериях ответа на ПВТ, в то время как резистентная ЦМВ-инфекция

является понятием, основанным на лабораторном определении лекарственно-устойчивого генотипа или мутаций, которые отвечают за устойчивость к противовирусным препаратам [21].

Частота выявления рефрактерных форм ЦМВ-инфекции среди реципиентов органов и тканей достаточно высока. Согласно последним данным, среди реципиентов солидных органов она составляет от 5 до 12% [22, 23]. У реципиентов ГСК этот показатель варьирует в зависимости от многих факторов, среди которых важное место занимает совместимость реципиента и донора по системе лейкоцитарных антигенов (HLA). Так, при HLA-совместимой алло-ТГСК как от родственных, так и неродственных доноров частота резистентности составляет около 8% [23], а у пациентов из группы высокого риска при частично-совместимой алло-ТГСК – 14,5% [24].

В настоящем исследовании мутации в гене *UL97* ЦМВ были зафиксированы у 5 из 14 реципиентов алло-ГСК с признаками резистентной ЦМВ-инфекции. Среди мутаций обнаружены следующие: D490A, T502A, C592G, C592F, E596G и C603W. Четыре из них (C592G, C592F, E596G и C603W) известны как мутации, ассоциированные с устойчивостью вируса к действию противовирусных препаратов. Остальные две мутации ранее в литературе не описаны. У одного пациента обнаружены две мутации одновременно, причем обе – мутации устойчивости (C592G и C603W).

Анализ и сравнение клинико-лабораторных данных пациентов – носителей мутантного и немутантного по гену *UL97* варианта вируса позволили выявить достоверную разницу в основных показателях периферической крови (содержание гемоглобина, тромбоцитов и лейкоцитов). У реципиентов с мутантным вариантом эти показатели были достоверно выше. Однако при комплексном сопоставлении данных стало очевидно, что этот феномен связан не с наличием мутации как таковой, а со временем ее детекции. Так, в случае штамма дикого типа высокая вирусная нагрузка в среднем наблюдалась на более ранних сроках после алло-ТГСК, чем у носителей мутантного штамма (50 сут против 152 сут). В первом случае у большинства пациентов на этом сроке еще не произошло окончательного приживления трансплантата и полного восстановления кроветворения за счет донорского.

Средняя длительность виремии, скорость наступления вирусологического ответа на ПВТ и медиана срока наступления пика вирусной нагрузки, напротив, не имели достоверной разницы. Этот феномен оказался неожиданным. Логично было бы предположить, что наличие мутации устойчивости к действию GCV должно увеличивать длительность виремии и замедлять наступление противовирусного ответа на фоне ПВТ. Для объяснения этого явления были более пристально проанализированы данные реципиентов, у которых выявлены мутации, ранее не описанные в литературе.

Пациент с мутацией T502A по клинико-лабораторным данным разительно отличался от других носителей мутантного штамма, а именно: высокая

вирусная нагрузка у него была зафиксирована всего через 18 сут после алло-ТГСК, длительность виремии составила 8 сут, а противовирусный ответ наблюдался на 8-е сутки применения ПВТ. Таким образом, можно выдвинуть предположение, что мутация T502A в гене *UL97* ЦМВ, вероятно, не ассоциирована с устойчивостью к действию GCV. Следовательно, этого пациента стоило рассматривать как носителя варианта вируса без мутации устойчивости и отнести его к группе пациентов с вирусом дикого типа («группа Wt_new»).

Клинико-лабораторные данные пациента с мутацией D490A, напротив, указывали на вероятную устойчивость к GCV: высокая вирусная нагрузка зафиксирована на 314-е сутки после алло-ТГСК, длительность виремии составила 45 сут, а противовирусный ответ наступил на 16-е сутки после начала ПВТ. Такую разницу между продолжительностью виремии и длительностью ПВТ можно объяснить тем, что вирусная нагрузка у этого пациента до наступления пика находилась в области низких значений, а его состояние не требовало противовирусного лечения. Полученные данные позволяют предположить, что мутация D490A ассоциирована с устойчивостью к действию GCV. Однако подтверждение этого факта требует проведения дополнительных исследований. Таким образом, вышеуказанного пациента следовало оставить в группе носителей мутантного варианта вируса, а группу переименовать в «группу Mt_new».

После перераспределения пациентов по вновь образованным группам была получена достоверная разница по всем изучаемым параметрам (табл. 7). Полученные данные дают дополнительные основания предполагать, что мутация T502A, вероятно, не ассоциирована с устойчивостью к действию GCV, а мутация D490A, напротив – ассоциирована. Таким образом, частота выявления мутаций устойчивости к GCV среди реципиентов алло-ГСК составила 4 из 14 (28,6%).

В рамках настоящего исследования и с учетом ранее опубликованных данных [14, 15], можно утверждать, что возникновение резистентного к GCV вируса может приводить к изменению характера течения ЦМВ-инфекции. Полученные в ходе исследования результаты подтверждают актуальность и практическую значимость идентификации мутаций, ассоциированных с устойчивостью к противовирусным препаратам.

Ограничение исследования

При оценке полученных результатов необходимо учитывать, что метод секвенирования по Сэнгеру, использованный в настоящей работе для поиска мутаций, имеет ограничения. Так, он не позволяет детектировать последовательности ДНК, доля которых составляет менее 10%. Другие лабораторные методы, например, секвенирование следующего поколения (NGS), обладают большей чувствительностью, что делает актуальным проведение подобного исследования с их применением [25]. Мутации устойчивости к действию GCV могут локализоваться также в гене *UL54*, кодирующем ДНК-полимеразу. Вирусы, не-

сущие такие мутации, могут обладать перекрестной резистентностью к другим противовирусным препаратам [26].

Заключение

Данные, полученные в ходе настоящей работы, согласуются с результатами предыдущих исследований и расширяют представления о влиянии мутаций, ассоциированных с устойчивостью к действию противовирусных препаратов, на течение ЦМВ-инфекции у реципиентов ГСК [7, 15]. Показано, что почти у 1/3 (4 из 14) реципиентов алло-ГСК с признаками устойчивой ЦМВ-инфекции выявлены мутации, ассоциированные с устойчивостью к действию GCV. Обнаружена и впервые описана мутация, обладающая таким потенциалом – D490A. У реципиентов – носителей мутантного варианта ЦМВ наблюдались более длительные виремия и срок получения отрицательного результата вирусологического исследования после начала ПВТ.

Тем не менее на данный момент стандартизованные алгоритмы диагностики мутаций не утверждены ни в Российской Федерации, ни за рубежом, несмотря на то что подобные предложения выдвигались неоднократно [7, 15, 27]. Проведение генотипирования и поиска мутаций в случае отсутствия ответа на ПВТ крайне актуально. Информация о конкретной мутации, ее характеристиках может способствовать принятию более обоснованного терапевтического решения.

ЛИТЕРАТУРА

- Gerna G., Zavattoni M., Baldanti F., Furione M., Chezzi L., Revello M.G., et al. Circulating cytomegalic endothelial cells are associated with high human cytomegalovirus (HCMV) load in AIDS patients with late-stage disseminated HCMV disease. *J. Med. Virol.* 1998; 55(1): 64–74.
- Piret J., Boivin G. Antiviral drug resistance in herpesviruses other than cytomegalovirus. *Rev. Med. Virol.* 2014; 24(3):186–218. <https://doi.org/10.1002/rmv.1787>
- Ramanan P., Razonable R.R. Cytomegalovirus infections in solid organ transplantation: A review. *Infect. Chemother.* 2013; 45(3): 260–71. <https://doi.org/10.3947/ic.2013.45.3.260>
- Демин М.В., Тихомиров Д.С., Туполева Т.А., Филатов Ф.П. Устойчивость к противовирусным препаратам у вирусов человека из подсемейства Betaherpesvirinae. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(5): 385–94. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-136> <https://elibrary.ru/fncleq>
- Piret J., Boivin G. Clinical development of letermovir and maribavir: Overview of human cytomegalovirus drug resistance. *Antiviral Res.* 2019; 163: 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.011>
- Орлова С.В., Стома И.О., Шмелева Н.П., Сивец Н.В. Современное состояние проблемы герпесвирусных инфекций 6-го и 7-го типов с разными клиническими формами, возможности лечения. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение.* 2021; 10(2): 78–86. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2021-10-1-78-86> <https://elibrary.ru/jjladx>
- Кожушная О.С., Солопова Г.Г., Маркелов М.И., Орил А.Р., Балашов Д.Н., Шелихова Л.Н. и др. Мониторинг мутаций в гене UL97 цитомегаловируса, ассоциированных с резистентностью к ганцикловиру, у детей после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2022; 24(1): 47–51. <https://doi.org/10.36488/emas.2022.1.47-51> <https://elibrary.ru/ygokdo>
- Chen S.J., Wang S.C., Chen Y.C. Antiviral agents as therapeutic strategies against cytomegalovirus infections. *Viruses.* 2019; 12(1): 21. <https://doi.org/10.3390/v12010021>
- Littler E., Stuart A., Chee M. Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature.* 1992; 358(6382): 160–2. <https://doi.org/10.1038/358160a0>
- Chen H., Beardsley G.P., Coen D.M. Mechanism of ganciclovir-induced chain termination revealed by resistant viral polymerase mutants with reduced exonuclease activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2014; 111(49): 17462–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405981111>
- Chou S. Approach to drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2015; 28(4): 293–9. <https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000170>
- Biron K.K. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res.* 2006; 71(2-3): 154–63. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.05.002>
- Fischer L., Imrich E., Sampaio K.L., Hofmann J., Jahn G., Hamprecht K., et al. Identification of resistance-associated HCMV UL97- and UL54-mutations and a UL97-polymorphism with impact on phenotypic drug-resistance. *Antiviral Res.* 2016; 131: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.04.002>
- Демин М.В., Тихомиров Д.С., Бидерман Б.В., Глинщикова О.А., Дроков М.Ю., Судариков А.Б. и др. Мутации в гене UL97 цитомегаловируса, ассоциированные с устойчивостью к ганцикловиру, у реципиентов аллогенных стволовых гемопоэтических стволовых клеток. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2019; 21(4): 352–7. <https://doi.org/10.36488/emas.2019.4.352-357> <https://elibrary.ru/nrtppq>
- Демин М.В., Тихомиров Д.С., Бидерман Б.В., Дроков М.Ю., Судариков А.Б., Туполева Т.А. и др. Мутации в гене UL97 цитомегаловируса (herpesvirales: herpesviridae: cytomegalovirus: human betaherpesvirus 5), ассоциированные с устойчивостью к ганцикловиру, у реципиентов аллогенных стволовых гемопоэтических клеток. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(1): 37–47. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-90> <https://elibrary.ru/jkpuqq>
- Камельских Д.В., Дроков М.Ю., Дубинкин И.В., Калмыкова О.С., Васильева В.А., Демидова Е.С. и др. Эффективность трансфузий концентратов тромбоцитов у больных после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток с сопутствующей рефрактерностью. *Клеточная терапия и трансплантология.* 2020; 9(3): 71–2. <https://elibrary.ru/bbkqth>
- Chou S., Van Wechel L.C., Lichy H.M., Marousek G.I. Phenotyping of cytomegalovirus drug resistance mutations by using recombinant viruses incorporating a reporter gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49(7): 2710–5. <https://doi.org/10.1128/aac.49.7.2710-2715.2005>
- Chou S., Marousek G., Guentzel S., Follansbee S.E., Poscher M.E., Lalezari J.P., et al. Evolution of mutations conferring multidrug resistance during prophylaxis and therapy for cytomegalovirus disease. *J. Infect. Dis.* 1997; 176(3): 786–9. <https://doi.org/10.1086/517302>
- Chou S., Waldemer R.H., Senters A.E., Michels K.S., Kemble G.W., Miner R.C., et al. Cytomegalovirus UL97 Phosphotransferase Mutations That Affect Susceptibility to Ganciclovir. *J. Infect. Dis.* 2002; 185(2): 162–9. <https://doi.org/10.1086/338362>
- Karrasch M., Michel D., Schneider S., Baier M., Busch M. Development of a combined CMV-UL97 C592F and CMV-UL54 T503I resistance mutation during ganciclovir treatment in a kidney transplant recipient. *Rev. Med. Microbiol.* 2019; 30(4): 197–9. <https://doi.org/10.1097/MRM.0000000000000190>
- Дмитрова А.А., Дроков М.Ю., Туполева Т.А., Савченко В.Г. Цитомегаловирусная инфекция при трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток: основное клиническое значение и определения. *Трансплантология.* 2022; 14(2): 210–25. <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2022-14-2-210-225> <https://elibrary.ru/cbrhiq>
- Boivin G., Goyette N., Rollag H., Jardine A.G., Pescovitz M.D., Asberg A., et al. Cytomegalovirus resistance in solid organ transplant recipients treated with intravenous ganciclovir or oral valganciclovir. *Antivir. Ther.* 2009; 14(5): 697–704.
- Hantz S., Garnier-Geoffroy F., Mazeran M.C., Garrigue I., Merville P., Mengelle C., et al. French CMV Resistance Survey Study Group. Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010; 65(12): 2628–40. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq368>
- Shmueli E., Shapira M.Y., Resnick I.B., Caplan O., Bdolah-Abram T., Wolf D.G. High rate of cytomegalovirus drug resistance

- among patients receiving preemptive antiviral treatment after haploidentical stem cell transplantation. *J. Infect. Dis.* 2014; 209(4): 557–61. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit475>
25. Chou S. Advances in the genotypic diagnosis of cytomegalovirus antiviral drug resistance. *Antiviral Res.* 2020; 176: 104711. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104711>
 26. Chou S., Marousek G.I., Van Wechel L.C., Li S., Weinberg A. Growth and drug resistance phenotypes resulting from cytomegalovirus DNA polymerase region III mutations observed in clinical specimens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51(11): 4160–2. <https://doi.org/10.1128/aac.00736-07>
 27. El Chaer F., Shah D.P., Chemaly R.F. How I treat resistant cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplantation recipients. *Blood.* 2016; 128(23): 2624–36. <https://doi.org/0.1182/blood-2016-06-688432>
- ### REFERENCES
1. Gerna G., Zavattoni M., Baldanti F., Furione M., Chezzi L., Revello M.G., et al. Circulating cytomegalic endothelial cells are associated with high human cytomegalovirus (HCMV) load in AIDS patients with late-stage disseminated HCMV disease. *J. Med. Virol.* 1998; 55(1): 64–74.
 2. Piret J., Boivin G. Antiviral drug resistance in herpesviruses other than cytomegalovirus. *Rev. Med. Virol.* 2014; 24(3):186–218. <https://doi.org/10.1002/rmv.1787>
 3. Ramanan P., Razonable R.R. Cytomegalovirus infections in solid organ transplantation: A review. *Infect. Chemother.* 2013; 45(3): 260–71. <https://doi.org/10.3947/ic.2013.45.3.260>
 4. Demin M.V., Tikhomirov D.S., Tupoleva T.A., Filatov F.P. Resistance to antiviral drugs in human viruses from the subfamily Betaherpesvirina. *Voprosy virusologii.* 2022; 67(5): 385–94. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-136> <https://elibrary.ru/fncclq> (in Russian)
 5. Piret J., Boivin G. Clinical development of letermovir and maribavir: Overview of human cytomegalovirus drug resistance. *Antiviral Res.* 2019; 163: 91–105. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.01.011>
 6. Orlova S.V., Stoma I.O., Shmaliyova N.P., Sivets N.V. The current state of the problem of infections caused by herpes viruses 6, 7 with different clinical forms and the possibilities of their treatment. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie.* 2021; 10(2): 78–86. <https://doi.org/10.33029/2305-3496-2021-10-1-78-86> <https://elibrary.ru/jjldax> (in Russian)
 7. Kozhushnaya O.S., Solopova G.G., Markelov M.I., Oril A.R., Balashov D.N., Shelikhova L.N., et al. Monitoring of resistance-associated mutations in UL97 gene of cytomegalovirus in children after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2022; 24(1): 47–51. <https://doi.org/10.36488/cmacc.2022.1.47-51> <https://elibrary.ru/ygokdo> (in Russian)
 8. Chen S.J., Wang S.C., Chen Y.C. Antiviral agents as therapeutic strategies against cytomegalovirus infections. *Viruses.* 2019; 12(1): 21. <https://doi.org/10.3390/v12010021>
 9. Littler E., Stuart A., Chee M. Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature.* 1992; 358(6382): 160–2. <https://doi.org/10.1038/358160a0>
 10. Chen H., Beardsley G.P., Coen D.M. Mechanism of ganciclovir-induced chain termination revealed by resistant viral polymerase mutants with reduced exonuclease activity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2014; 111(49): 17462–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405981111>
 11. Chou S. Approach to drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2015; 28(4): 293–9. <https://doi.org/10.1097/qco.0000000000000170>
 12. Biron K.K. Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases. *Antiviral Res.* 2006; 71(2-3): 154–63. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.05.002>
 13. Fischer L., Imrich E., Sampaio K.L., Hofmann J., Jahn G., Hamprecht K., et al. Identification of resistance-associated HCMV UL97- and UL54-mutations and a UL97-polymorphism with impact on phenotypic drug-resistance. *Antiviral Res.* 2016; 131: 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.04.002>
 14. Demin M.V., Tikhomirov D.S., Biderman B.V., Glinshchikova O.A., Drovkov M.Yu., Sudarikov A.B., et al. Mutations in the cytomegalovirus UL97 gene associated with ganciclovir resistance in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2019; 21(4): 352–7. <https://doi.org/10.36488/cmacc.2019.4.352-357> <https://elibrary.ru/nrtpqv> (in Russian)
 15. Demin M.V., Tikhomirov D.S., Biderman B.V., Drovkov M.YU., Sudarikov A.B., Tupoleva T.A., et al. Mutations in the UL97 gene of cytomegalovirus (Herpesvirales: Herpesviridae: Cytomegalovirus: Human Betaherpesvirus 5) associated with ganciclovir resistance in recipients of allogeneic hematopoietic stem cells. *Voprosy virusologii.* 2022; 67(1): 37–47. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-90> <https://elibrary.ru/jkpuqq> (in Russian)
 16. Kamel'skikh D.V., Drovkov M.Yu., Dubinkin I.V., Kalmykova O.S., Vasil'eva V.A., Demidova E.S., et al. The effectiveness of platelet concentrate transfusions in patients after transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells with concomitant refractoriness. *Kletochnaya terapiya i transplantologiya.* 2020; 9(3): 71–2. <https://elibrary.ru/bbkqth> (in Russian)
 17. Chou S., Van Wechel L.C., Lichy H.M., Marousek G.I. Phenotyping of cytomegalovirus drug resistance mutations by using recombinant viruses incorporating a reporter gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49(7): 2710–5. <https://doi.org/10.1128/aac.49.7.2710-2715.2005>
 18. Chou S., Marousek G., Guentzel S., Follansbee S.E., Poscher M.E., Lalezari J.P., et al. Evolution of mutations conferring multidrug resistance during prophylaxis and therapy for cytomegalovirus disease. *J. Infect. Dis.* 1997; 176(3): 786–9. <https://doi.org/10.1086/517302>
 19. Chou S., Waldemer R.H., Senters A.E., Michels K.S., Kemble G.W., Miner R.C., et al. Cytomegalovirus UL97 Phosphotransferase Mutations That Affect Susceptibility to Ganciclovir. *J. Infect. Dis.* 2002; 185(2): 162–9. <https://doi.org/10.1086/338362>
 20. Karrasch M., Michel D., Schneider S., Baier M., Busch M. Development of a combined CMV-UL97 C592F and CMV-UL54 T503I resistance mutation during ganciclovir treatment in a kidney transplant recipient. *Rev. Med. Microbiol.* 2019; 30(4): 197–9. <https://doi.org/10.1097/MRM.0000000000000190>
 21. Dmitrova A.A., Drovkov M.YU., Tupoleva T.A., Savchenko V.G. Cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: clinical significance and definitions. *Transplantologiya.* 2022; 14(2): 210–25. <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2022-14-2-210-225> <https://elibrary.ru/cbrhiq> (in Russian)
 22. Boivin G., Goyette N., Rollag H., Jardine A.G., Pescovitz M.D., Asberg A., et al. Cytomegalovirus resistance in solid organ transplant recipients treated with intravenous ganciclovir or oral valganciclovir. *Antivir. Ther.* 2009; 14(5): 697–704.
 23. Hantz S., Garnier-Geoffroy F., Mazon M.C., Garrigue I., Merville P., Mengelle C., et al. French CMV Resistance Survey Study Group. Drug-resistant cytomegalovirus in transplant recipients: a French cohort study. *J. Antimicrob. Chemother.* 2010; 65(12): 2628–40. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq368>
 24. Shmueli E., Shapira M.Y., Resnick I.B., Caplan O., Bdoolah-Abram T., Wolf D.G. High rate of cytomegalovirus drug resistance among patients receiving preemptive antiviral treatment after haploidentical stem cell transplantation. *J. Infect. Dis.* 2014; 209(4): 557–61. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit475>
 25. Chou S. Advances in the genotypic diagnosis of cytomegalovirus antiviral drug resistance. *Antiviral Res.* 2020; 176: 104711. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104711>
 26. Chou S., Marousek G.I., Van Wechel L.C., Li S., Weinberg A. Growth and drug resistance phenotypes resulting from cytomegalovirus DNA polymerase region III mutations observed in clinical specimens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51(11): 4160–2. <https://doi.org/10.1128/aac.00736-07>
 27. El Chaer F., Shah D.P., Chemaly R.F. How I treat resistant cytomegalovirus infection in hematopoietic cell transplantation recipients. *Blood.* 2016; 128(23): 2624–36. <https://doi.org/0.1182/blood-2016-06-688432>

Информация об авторах:

Тихомиров Дмитрий Сергеевич – канд. биол. наук, заведующий лабораторией анализа посттрансфузионных вирусных инфекций ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-2553-6579>

Демин Михаил Валерьевич✉ – канд. биол. наук, биолог лаборатории анализа посттрансфузионных вирусных инфекций ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: memindisha@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7579-3442>

Серикова Анастасия Андреевна – специалист лаборатории анализа посттрансфузионных вирусных инфекций ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Москва, Россия; <https://orcid.org/0009-0009-6094-3223>

Бидерман Белла Вениаминовна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной гематологии, ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-6253-3334>

Судариков Андрей Борисович – д-р биол. наук, заведующий лабораторией молекулярной гематологии, ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-9463-9187>

Филатов Феликс Петрович – канд. мед. наук, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-6182-2241>

Туполева Татьяна Алексеевна – д-р мед. наук, заведующая отделом вирусологии, заведующая отделением – врач-вирусолог отделения инфекционной безопасности трансфузий ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Москва, Россия; <https://orcid.org/0000-0003-4668-9379>

Участие авторов: Тихомиров Д.С. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста статьи; Серикова А.А. – проведение экспериментов, сбор данных; Демин М.В. – проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка и научное редактирование текста статьи; Бидерман Б.В. – техническая поддержка; Судариков А.Б. – одобрение окончательного варианта статьи для публикации; Филатов Ф.П. – консультирование по общим вопросам, научное редактирование текста; Туполева Т.А. – общее руководство, одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

Поступила 17.07.2024
Принята в печать 10.09.2024
Опубликована 31.10.2024

Information about the authors:

Dmitriy S. Tikhomirov – PhD in Biology, Head of the Laboratory for Analysis of Posttransfusion Viral Infections, National Medical Research Center of Hematology, Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-2553-6579>

Mikhail V. Demin✉ – PhD in Biology, Biologist of the Laboratory for the Analysis of Posttransfusion Viral Infections, National Medical Research Center of Hematology, Moscow, Russia. E-mail: memindisha@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7579-3442>

Anastasia A. Serikova – Specialist of the Laboratory for the Analysis of Posttransfusion Viral Infections, National Medical Research Center of Hematology of the Ministry, Moscow, Russia; <https://orcid.org/0009-0009-6094-3223>

Bella V. Biderman – PhD in Biology, Senior Researcher at the Laboratory of Molecular Hematology, National Medical Research Center of Hematology, Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-6253-3334>

Andrey B. Sudarikov – Doctor of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Molecular Hematology, National Medical Research Center of Hematology, Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-9463-9187>

Felix P. Filatov – PhD in Medicine, Doctor of Biological Sciences, Researcher in Laboratory of Molecular Biotechnology, I.I. Mechnikov Federal State Budgetary Research University, Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-6182-2241>

Tatiana A. Tupoleva – Doctor of Medical Sciences, Head of the Virology Department, Head of the Department – Virologist of the Infectious Transfusion Safety Department, National Medical Research Center of Hematology, Moscow, Russia; <https://orcid.org/0000-0003-4668-9379>

Contribution: Demin M.V. – research concept and design, conducting experiments, collecting, analyzing and interpreting data, preparing the text of the article; Serikova A.A. – conducting experiments, collecting data; Tikhomirov D.S. – analyzing and interpreting data, preparing the text of the article; Biderman B.V. – technical support, analyzing and interpreting data; Sudarikov A.B. – approval of the final version of the article for publication; Filatov F.P. – consulting on general issues, text editing; Tupoleva T.A. – approval of the final version of the article for publication.

Received 17 July 2024
Accepted 10 September 2024
Published 31 October 2024

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-253>

© ЖАППАРОВА Г.А., МЫРЗАХМЕТОВА Б.Ш., ТЛЕНЧИЕВА Т.М., ТУСИПОВА А.А., БИСЕНБАЕВА К.Б., ТОЙТАНОВА А.С., КУТУМБЕТОВ Л.Б., 2024



Оценка эффективности химической инактивации и иммуногенности варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2

Жаппарова Г.А.✉, Мырзахметова Б.Ш., Тленчиева Т.М., Тусипова А.А., Бисенбаева К.Б., Тойтанова А.С., Кутумбетов Л.Б.

ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», 080409, пгт. Гвардейский, Республика Казахстан

Резюме

Введение. Быстрое распространение новой коронавирусной инфекции (COVID-19) среди населения многих стран мира способствовало появлению множества генетических вариантов вируса SARS-CoV-2. По сравнению с предыдущими вариантами коронавируса, новые субварианты варианта Омикрон продемонстрировали заметную степень мутации. Инактивация вируса является одним из наиболее важных этапов разработки инактивированных вакцин. В качестве химического инактиванта в настоящее время используют β-пропиолактон и формальдегид, однако не существует единого стандарта для проектирования и определения процесса инактивации.

Цель работы. Оценка и сравнение эффективности химической инактивации двух агентов: формальдегида и β-пропиолактона в отношении иммуногенности варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2.

Материалы и методы. Для получения варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2 использованы назофарингеальные мазки. Для выделения, репродукции, титрования вируса, а также постановки реакции нейтрализации использовали культуру клеток Vero. Проведена кинетика изучения инактивации вируса химическими агентами: формальдегидом и β-пропиолактоном.

Результаты. Проведены исследования по сравнительной оценке эффективности химических инактиваторов, используемых для инактивации варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2, планируемого для использования в изготовлении инактивированной цельновирионной вакцины. В качестве инактиваторов использованы формальдегид и β-пропиолактон в концентрациях 0,05, 0,1, 0,5% от общего объема суспензии вируса. Установлено, что полная инактивация вируса формальдегидом в использованных концентрациях при температуре 37 °С происходит в течение 2 ч, а при использовании β-пропиолактона – в течение 12 ч.

Заключение. Образцы вируса, инактивированные использованными инактивантами, обладают разной антигенной активностью в зависимости от концентрации инактиваторов. Наиболее выраженная антигенная активность проявляется у образцов возбудителя, которые подвергались обработке инактиватором в щадящей концентрации, равной 0,05%. Повышение концентрации инактиваторов в 5 раз и более кратно приводит к значимому снижению антигенности вируса SARS-CoV-2. При использованных режимах инактивации потеря биологической активности вируса происходит быстрее, антигенность сохраняется в большей степени при обработке формальдегидом.

Ключевые слова: инактивация; иммуногенность; вирус SARS-CoV-2; вариант Омикрон; формальдегид; β-пропиолактон

Для цитирования: Жаппарова Г.А., Мырзахметова Б.Ш., Тленчиева Т.М., Тусипова А.А., Бисенбаева К.Б., Тойтанова А.С., Кутумбетов Л.Б. Оценка эффективности химической инактивации и иммуногенности варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(5): 459–469. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-253> EDN: <https://elibrary.ru/vpecsfj>

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания «Услуги по обеспечению биологической безопасности в сфере науки» на 2023 г., при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Республики Казахстан.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей 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). Протокол исследования одобрен Комитетом по Биоэтике Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности Министерства здравоохранения Республики Казахстан (Протокол № 2 от 14.08.2023).

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-253>

Evaluation of the effectiveness of chemical inactivation and immunogenicity of the Omicron variant of the SARS-CoV-2 virus

Gulzhan A. Zhapparova✉, Balzhan Sh. Myrzakhmetova, Karina B. Bissenbayeva, Talshyngul M. Tlenchiyeva, Aiganym A. Tussipova, Aizhan S. Toytanova, Lespek B. Kutumbetov

Research Institute for Biological Safety Problems, 080409, Gvardeyskiy, Republic of Kazakhstan

Abstract

Introduction. The rapid spread of coronavirus infection COVID-19 among the population of many countries around the world has contributed to the emergence of many genetic variants of SARS-CoV-2. Compared to previous coronavirus variants, the new Omicron variants have shown a noticeable degree of mutation. Virus inactivation is one of the most important steps in the development of inactivated vaccines. The chemical inactivation agents currently used are β -propiolactone and formaldehyde, but there is no uniform standard for designing and specifying the inactivation process.

Objective. Evaluation and comparison of the effectiveness of chemical inactivation of two agents, formaldehyde and β -propiolactone against immunogenicity of the Omicron variant of the SARS-CoV-2 virus.

Materials and methods. Nasopharyngeal swabs were used to obtain the SARS-CoV-2 Omicron variant virus. Vero cell culture was used to isolate, reproduce, titrate the virus, and perform a neutralization reaction. The kinetics of studying the inactivation of the virus by chemical agents such as formaldehyde and β -propiolactone was carried out.

Results. Studies have been conducted to comparatively evaluate the effectiveness of chemical agents used to inactivate the SARS-CoV-2 virus of the Omicron variant, planned for use in the production of an inactivated whole-virion vaccine. Formaldehyde and β -propiolactone were used as inactivation agents in concentrations of 0.05, 0.1, 0.5% of the total volume of the virus suspension. It has been established that complete inactivation of the virus by formaldehyde in the concentrations used at a temperature of 37 °C occurs within up to 2 hours, and when using beta-propiolactone, within up to 12 hours.

Conclusion. Inactivated virus samples have different antigenic activity depending on the concentration of the inactivation agents used. The most pronounced antigenic activity is manifested in samples of the pathogen that were treated with an inactivation agent at a mild concentration of 0.05%. Increasing the concentration of inactivation agent by 5 or more times leads to a significant decrease in the antigenicity of the SARS-CoV-2 virus. With the inactivation modes used, the loss of biological activity of the virus occurs faster and antigenicity is retained largely when treated with formaldehyde.

Keywords: *inactivation; immunogenicity; SARS-CoV-2 virus; Omicron variant; formaldehyde; β -propiolactone*

For citation: Zhapparova G.A., Myrzakhmetova B.Sh., Tlenchiyeva T.M., Tussipova A.A., Bissenbayeva K.B., Toytanova A.S., Kutumbetov L.B. Isolation of the Omicron variant of the SARS-CoV-2 virus and assessment of the effectiveness of inactivants for use in vaccine manufacturing technology. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(5): 459–469 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-253>
EDN: <https://elibrary.ru/vpecfj>

Funding. The work was carried out within the framework of the State assignment «Services for ensuring biological safety in the field of science» for 2023, with financial support from the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Ethics approval. The 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 Bioethics Committee of the Research Institute for Biological Safety Problems of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan (Protocol No 2 dated August 14, 2023).

Введение

Новая коронавирусная инфекция (COVID-19) является третьим коронавирусным заболеванием человека на сегодняшний день. COVID-19 значительно превзошел SARS и MERS как по количеству инфицированных людей, так и по пространственному диапазону эпидемических зон. Быстрое распространение этого высококонтагиозного заболевания представляет собой самую серьезную угрозу для глобального общественного здравоохранения в этом столетии [1].

По состоянию на 13 апреля 2024 г. вспышки COVID-19 унесли 7 010 681 жизнь, а подтвержденное

число случаев заболевания во всем мире превысило 704 753 890 в 229 странах¹.

В результате мониторинга возбудителя болезни установлено, что вирус SARS-CoV-2 обладает повышенной генетической изменчивостью, в результате которой в процессе пандемии появились новые его варианты [2, 3].

Новый мутированный в значительной степени вариант SARS-CoV-2, отмеченный как B.1.1.529 (Омикрон), впервые обнаружен в Южной Африке,

¹<https://www.worldometers.info/coronavirus/coronavirus-death-toll/>

а затем быстро распространился по всему миру [4]. Через несколько дней после обнаружения в Южной Африке и Ботсване, 26 ноября 2021 г., на основании последующего и быстрого роста случаев заболевания, Омикрон был признан Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) вариантом, имеющим высокую контагиозность с тяжелым течением заболевания и сниженной эффективностью лечения [5].

В настоящее время Омикрон разделен на 5 основных линий: ВА.1, ВА.2, ВА.3, ВА.4 и ВА.5. Первоначально Омикрон состоял из 3 сестринских линий: ВА.1, ВА.2 и ВА.3. Вариант ВА.1 стал причиной большинства инфекций 4-й эпидемической волны в Южной Африке. Однако, когда в середине января 2022 г. эта волна спала, ВА.2 стал доминирующей южноафриканской линией [6–9].

17 февраля 2023 г. стало известно еще об одном новом субварианте варианта Омикрон, который получил название Эрис (EG.5). По информации ВОЗ, подвид EG.5 относится к линейке ХВВ.1.9.2, как и другие подвиды варианта Омикрона. От своих предшественников штамм отличается наличием дополнительных мутаций аминокислот F456L и Q52H [10, 11]. Постепенно частота EG.5 среди других возбудителей COVID-19 увеличивалась и, по состоянию на июль 2023 г., достигла 17,4%. Наибольшее число случаев было зафиксировано в Китае, США, Корее, Японии, Канаде, Великобритании, Франции, Португалии².

Главное отличие нового субварианта варианта Омикрон – улучшенная способность ускользать от иммунного ответа, что обуславливает повышенную частоту заболеваемости. Также установлено крайне быстрое распространение вируса: всего за месяц доля субварианта Эрис среди всех типов коронавируса возросла на 10%. Он передается намного быстрее, чем предыдущие штаммы: Кракен, Арктур, Кентавр.

Таким образом, Омикрон является наиболее антигенно дивергентным вариантом. С момента появления Омикрона и его подвариантов (например, ВА.2, ВА.4, ВА.5, BF.7, ХВВ), он стал ключевым фактором пандемии, приведшей к нескольким новым волнам инфекции [12, 13].

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что SARS-CoV-2 продолжает мутировать и появляются новые штаммы с другими свойствами. Из-за частой мутации вируса защитное действие имеющихся вакцин, изготовленных на основе исходного варианта возбудителя, снижается [14, 15]. В связи с этим для поддержания высокой эффективности специфической профилактики становится востребованной вакцина, стимулирующая эффективный иммунитет против варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2.

Примерами зарегистрированных инактивированных вакцин являются CoronaVac (Sinovac, Китай), Covaxin (Bharat Biotech, Индия), Sinopharm (Sinopharm/институт биологических препаратов Ухана, Китай), «КовиВак» (Центр Чумакова, Россия),

ВВВ-CoV (Институт биологических препаратов Пекина, Китай).

Инактивированная вакцина широко используется для профилактики заболеваний [16], и ранее нами в НИИПББ была разработана инактивированная цельновирионная вакцина QazCovid-in против COVID-19 на основе SARS-CoV-2/human/KAZ/KZ_Almaly/2020 [17].

Подбор подходящего инактиватора, правильное проведение процедуры инаktivации и проверка инаktivации являются наиболее важными факторами в производстве инаktivированных вакцин. Обычно процедура инаktivации должна быть адаптирована к штамму вируса, концентрации инаktivатора и многим другим факторам, таким как время инкубации и концентрация вируса, для получения эффективного продукта [18–21]. Инаktivация вируса проводится физическими (тепло, ультрафиолетовое облучение) и химическими методами (детергенты, SDS, TRIzol, формальдегид и β -пропиолактон (БПЛ)) [22, 23]. Формальдегид и БПЛ являются наиболее доступными химическими инаktivаторами для инаktivации вирусов, и оба одобрены регулируемыми органами в разных странах для производства биологических продуктов, инаktivированных вирусами [24]. Формальдегид инаktivировывает вирусы посредством перекрестного связывания поверхностных белков вируса, тогда как БПЛ – главным образом посредством ацилирования или алкилирования вирусной ДНК или РНК [25]. В процессе приготовления вакцин против COVID-19 формальдегид и БПЛ используют для инаktivации частиц вируса SARS-CoV-2 [26–29]. В связи с тем SARS-CoV-2 – сравнительно новый вирус, в настоящее время не проводятся комплексные исследования инаktivации БПЛ и формальдегида на физические и химические свойства SARS-CoV-2, а также не существует научного стандарта для количественной оценки эффектов инаktivации [30].

Цель исследования – оценка и сравнение эффективности двух агентов: формальдегида и БПЛ, в отношении варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Клинические образцы. Для выделения варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2 были использованы назофарингеальные смывы (мазки), собранные медицинскими сотрудниками и доставленные в НИИПББ с соблюдением международных и отечественных требований по транспортировке клинических образцов^{3–5}, по разрешению Комитета санитарно-эпидемио-

²<https://id-clinic.ru/news/covid-19/kovid-eg5-eris-samoe-vazhnoe-novom-shtamme-koronavirusa/>

³WHO/WHE/CPI/2019.20 Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2019-2020.

⁴WHO Laboratory biosafety guidance related to the novel coronavirus (2019-nCoV). https://www.who.int/docs/default-source/coronavirus/laboratory-biosafety-novel-coronavirus-version-1-1.pdf?sfvrsn=912a9847_2

⁵Санитарно-эпидемиологические требования к лабораториям, использующим потенциально опасные химические и биологические вещества. Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 8 сентября 2017 г. № 684.

логического контроля (КСЭК) МЗ РК. Наличие искомого варианта вируса в клиническом образце подтверждали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и секвенирования спайк-белка возбудителя. Индикацию вируса и его принадлежности варианту Омикрон проводили сотрудники лаборатории «Коллективное пользование».

Культуры клеток и питательная среда. Для выделения, репродукции, титрования, вируса, а также постановки реакции нейтрализации использовали перевиваемую культуру клеток Vero, которые выращивали в питательной среде DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки крови крупного рогатого скота, 200 мкг/мл стрептомицина, 200 Ед/мл пенициллина и 400 мкг/мл гентамицина.

Выделение вируса. Для выделения вируса использовали односуточную монослойную культуру клеток Vero, выращенных в матрасах 0,25 см². На клеточный монослой наносили суспензию смывов со слизистой оболочки носовой полости больных в объеме 0,5 мл и выдерживали в течение 60 мин при температуре 37 °С с содержанием в воздухе 5% CO₂-инкубатора и 95% относительной влажности с ежедневной микроскопией. Наличие вируса устанавливали по цитопатогенному действию в культуре клеток. Выделенный вирус идентифицировали в реакции нейтрализации с использованием сыворотки крови, полученной для варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2 путем иммунизации интактных белых мышей.

Для получения новой генерации вируса культуры клеток с выраженным цитопатическим действием (ЦПД) замораживали, затем размораживали и полученным культуральным вирусом заражали свежую культуру клеток.

Титрование вируса. Инфекционную активность вируса определяли по общепринятой методике, титр вируса рассчитывали. Для титрования вируса культуру клеток Vero выращивали в 96-луночном культуральном микропланшете при температуре 37 °С до формирования монослоя. Для выращивания использовали DMEM с добавлением 2% фетальной бычьей сыворотки крови. Готовили последовательные 10-кратные разведения титруемой вирусной суспензии от 10⁻¹ до 10⁻⁸. Каждым разведением заражали культуру клеток не менее чем в 4 лунках. Клетки с вирусом инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 7 сут. Наличие вируса устанавливали по ЦПД, определяемого микроскопированием с помощью инвертированного микроскопа, а титр вируса рассчитывали по методу Reed-Muench [31].

Инактивация вируса. Химическую инактивацию проводили 37% формальдегидом и БПЛ (Sigma-Aldrich, США), для этого использовали вирус SARS-CoV-2/Omicron/KZ-Almaty/04.2023 с титром 6,83 lg ТЦД₅₀/мл. После сбора вирусную суспензию осветляли путем осаждения грубых частиц центрифугированием при 2000 г в течение 30 мин.

Для инактивации в осветленную вирусную суспензию добавляли 3% рабочий раствор формальдегида до конечной концентрации 0,05, 0,1 и 0,5%

с последующей выдержкой при температуре 37 °С в течение 48 ч при постоянном перемешивании со скоростью 60 ± 5 об/ч. Для установления срока инактивации каждый час из биомассы вируса с инактивантами отбирали пробы, в которые для прекращения действия инактиванта добавляли 25% раствор бисульфита натрия в концентрации, пропорциональной по молекулярной массе формальдегиду, добавленному в биомассу, и подвергали проверке на полноту инактивации вируса или помещали при температуре 4–6 °С до указанной проверки.

Для инактивации вируса SARS-CoV-2 БПЛ культуру клеток Vero выращивали в культуральных матрасах до формирования монослоя, затем инфицировали вирусом SARS-CoV-2. Через 3 сут после инфицирования собирали вирусную суспензию, клеточные остатки удаляли центрифугированием и хранили до дальнейшего использования. После этого вирусную суспензию инаktivировали БПЛ в разных концентрациях (0,05, 0,1 и 0,5%). Затем вирусную суспензию вместе с БПЛ инкубировали при 4 °С в течение 12 ч с последующей 4-часовой инкубацией при 37 °С для гидролиза оставшегося БПЛ.

Для изучения кинетики инактивации вируса проводили периодический отбор проб в течение 48 ч через каждый час. Полноту инактивации вируса подтверждали при отсутствии ЦПД в трех последовательных повторностях заражения.

Определение антигенной активности инаktivированного вируса. Антигенную активность оценивали по динамике и титрам вируснейтрализующих антител (ВНА) на испытуемый вирус, сформированных в организме привитых лабораторных биологических моделей (беспородные белые мыши SPF (specific pathogen free, без специфических патогенов)). Белым мышам (по 5 голов в группе) вводили внутримышечно по 0,5 мл испытуемых образцов инаktivированной вирусной суспензии, предварительно собрав образцы сыворотки крови. Затем через каждые 7 сут в течение 28 сут повторно собирали образцы сыворотки крови, которые в ретроспективе исследовали на наличие и титр специфических антител на вариант Омикрон вируса SARS-CoV-2. Антигенную активность оценивали по скорости формирования и титру ВНА.

Постановка реакции нейтрализации. Реакцию нейтрализации проводили на монослойной культуре клеток Vero, приготовленной в 96-луночных пластиковых планшетах. В качестве реакционной смеси использовали двукратные разведения (1 : 2, 1 : 4 и т.д.) исследуемой сыворотки крови у белых мышей на поддерживающей среде и культуральную суспензию варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2 с титром 100 ТЦД₅₀, взятых в равных объемных соотношениях. Полученную смесь выдерживали при температуре 37 °С в течение 60 мин и вносили в разных дозах в не менее чем 4 лунки 96-луночного планшета с тестовой культурой клеток. В качестве контроля дозы суспензию вируса титровали на той же культуре клеток используя ее 10-кратные (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴) разведения на поддерживающей среде. Для контроля

качества культуры клеток оставляли не менее 4 лунок без внесения реакционной смеси и вируса, но с заменой на поддерживающую среду. Культуру клеток в планшетах с реакцией нейтрализации выдерживали при температуре 37 °С в течение 5 сут, после чего проводили учет результатов по ЦПД вируса. Отсутствие ЦПД в культуре клеток, при наличии его в контрольных лунках с дозой вируса и отсутствии в лунках с контролем качества культуры клеток, определяли как нейтрализацию вируса или наличие антител, а наличие ЦПД при указанных состояниях в перечисленных контролях – как отсутствие нейтрализации и специфических антител. За титр антител принимали то наивысшее разведение сыворотки крови, которое в не менее 50% случаев нейтрализовало репродукцию вируса. Титр антител описывали в обратных цифровых величинах двукратных разведений сыворотки крови. Достоверность разности титров антител, формируемых у модельных животных, устанавливали по Стьюденту [32].

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с помощью программы GraphPad Prism версии 8.0.1. Титр вируса выражали в \lg ТЦД₅₀/мл.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Комитетом по Биоэтике Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности Министерства здравоохранения Республики Казахстан (Протокол № 2 от 14.08.2023).

Результаты

Поступившие клинические образцы (мазки), полученные из КСЭК МЗ РК и НЦЭ, при исследовании в ПЦР в 9 из 30 случаев содержали РНК вируса SARS-CoV-2. После заражения культуры клеток Vero клиническими образцами, позитивными в ПЦР на целевой вирус, в 3 пробах был выявлен цитопатогенный агент на 1-м пассаже, который проявил свое патоген-

ное действие на 3-и сутки. В других биологических образцах наличие цитопатогенного агента не отмечалось в течение 3 последовательных пассажей. Со временем количество округлых и деструктивных клеток увеличилось, на поверхности монослоя уменьшалось количество адгезивных и распластанных клеток, наблюдались формирование очагов пустоты вследствие открепившихся клеток и увеличение межклеточного пространства при сравнении с контрольной культурой (**рис. 1**). Полная деструкция монослоя пораженных клеток наступала в течение 48–72 ч после появления признаков цитопатологии.

Выделенный цитопатогенный агент с помощью ПЦР был идентифицирован как вирус SARS-CoV-2, а при секвенировании гена шипового белка определен как вариант Омикрон. На уровне 5-го пассажа в культуре клеток этот вирус накапливался в титре $6,83 \pm 0,22 \lg$ ТЦД₅₀/мл.

В опубликованной ранее статье [33] были изучены сроки и кинетика инактивации вирусосодержащей суспензии Уханьского штамма вируса SARS-CoV-2 формальдегидом при температурных режимах 4 °С, 22 °С и 37 °С, где по результатам исследования температура 37 °С была отмечена как наиболее эффективная для инактивации. В связи с этим в настоящем исследовании инкубацию проводили только при температуре 37 °С.

Скорость инактивации вируса под воздействием двух вышеназванных агентов при температуре 37 °С приведена на **рис. 2, 3**.

Как видно из **рис. 2 и 3**, при обработке 0,1 и 0,05% растворами формальдегида с выдерживанием при температуре 37 °С вирус теряет инфекционную активность через 2 ч. А инактивация этого возбудителя при обработке 0,5% формальдегидом наступала уже в течение 1 ч.

При использовании БПЛ в концентрации 0,1 и 0,05% полная потеря инфекционной активности вируса отмечалась через 11–12 ч соответственно. Для концентрации инактиванта 0,1% этот показатель составлял 8 ч.

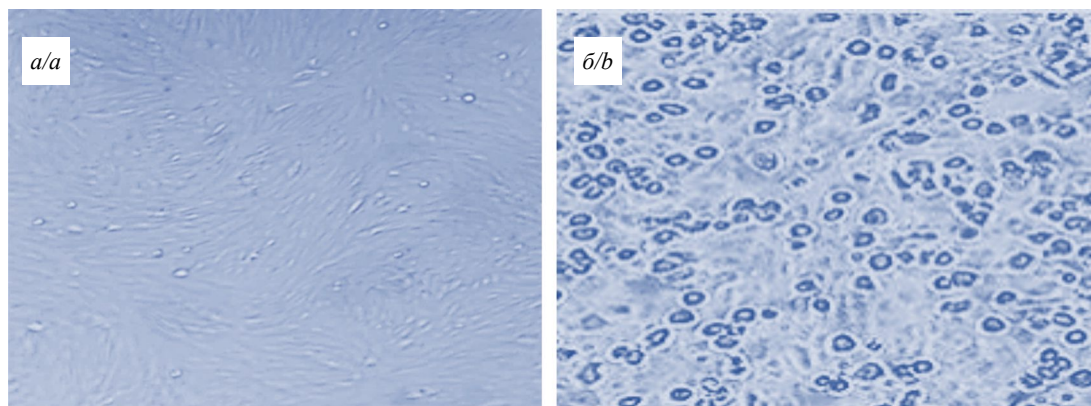


Рис. 1. Цитопатические изменения в монослое культуры клеток Vero, ув. 100.
а – неинфицированная культура клеток; б – цитопатическое изменение в культуре клеток.

Fig. 1. Cytopathic changes in a monolayer of Vero cell culture, 100× magnification.

a – uninfected cell culture; b – cytopathic change in cell culture.

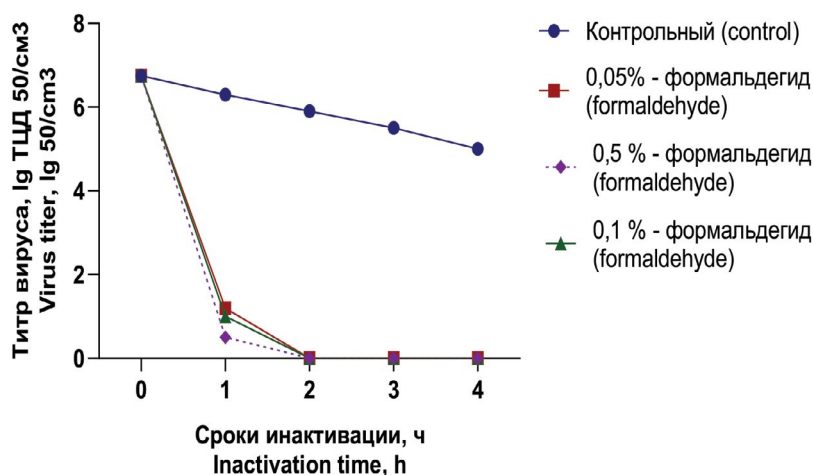


Рис. 2. Кинетика инактивации варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2 в конечной концентрации формальдегида 0,05, 0,1, 0,5% и сравнительного контроля при температурном режиме 37 °С.

Fig. 2. Kinetics of inactivation of the Omicron virus SARS-CoV-2 at a final formaldehyde concentration of 0.05, 0.1, 0.5% and a comparative control at a temperature of 37 °C.

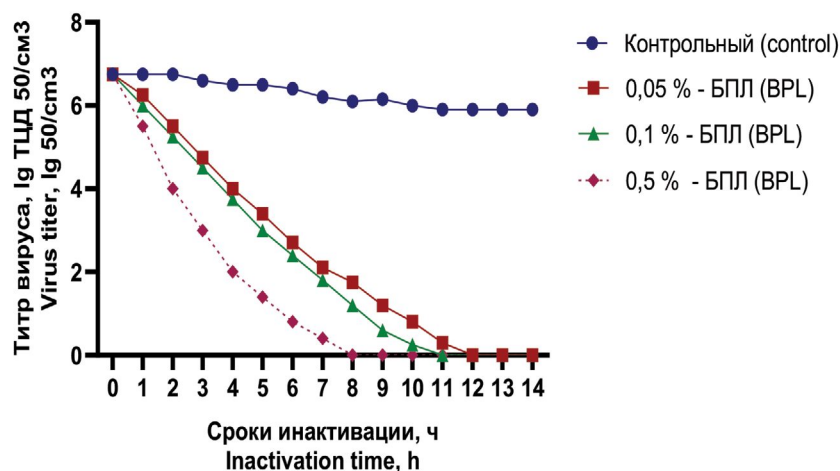


Рис. 3. Кинетика инактивации варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2 в конечной концентрации β-пропиолактона 0,05, 0,1, 0,5% и сравнительного контроля при температурном режиме 37 °С.

Fig. 3. Kinetics of inactivation of the Omicron virus SARS-CoV-2 at a final concentration β-propiolactone 0.05, 0.1, 0.5% and comparative control at a temperature of 37 °C.

После каждого случая отбора образцов вируса, обработанного инактивантами, их подвергали тестированию на полноту инактивации возбудителя путем инокуляции культуры клеток и проведением последовательных 3 слепых пассажей в этой биологической модели. Инокуляцию в культуру клеток проводили титрованием. Результаты исследований приведены в табл. 1.

Как видно из данных табл. 1, вариант Омикрон вируса SARS-CoV-2, обработанный формальдегидом в концентрациях 0,5, 0,1, 0,05%, независимо от концентрации инактиванта, терял свою биологическую активность в течение 2 ч. При исходном титре возбудителя $6,83 \pm 0,22 \text{ lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$, через 1 ч после обработки формальдегидом с выдержкой при температуре 37 °С, его титр составил: $0,2 \pm 0,11 \text{ lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$ при концентрации инактиванта 0,5%, $1,0 \pm 0,15 \text{ lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$ при концентрации инактиванта 0,1% и $1,2 \pm 0,12 \text{ lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$ при концентрации инактиванта 0,05%. А в образцах

вирусной суспензии, отобранной через 2 ч после выдержки с раствором формальдегида при той же температуре, независимо от концентрации инактиванта, наличие цитопатогенного вируса не было обнаружено. Такой же отрицательный результат на наличие репродуктивного вируса был получен при дополнительном слепом двукратном пассировании испытуемых образцов в чувствительной культуре клеток.

В исследованиях с БПЛ полная потеря инфекционности вируса происходила в течение до 12 ч. При этом так же, как и с предыдущим инактивантом, прослеживалась зависимость скорости инактивации вируса от концентрации инактиванта. При концентрации БПЛ 0,5% инфекционная активность вируса полностью терялась в течение 10 ч, в то время как в образцах с концентрацией этого инактиванта 0,1 и 0,05% в указанный срок отмечался цитопатогенный титр в пределах $1,00 \pm 0,2$ и $1,10 \pm 0,2 \text{ lg TCID}_{50}/\text{cm}^3$ соответственно.

Таблица 1. Результаты оценки титра вируса, обработанного инактивантами, по срокам выдержки при температуре 37 °С

Table 1. Results of the titer measurement of the virus treated with inactivation agents with different exposure duration at a temperature of 37 °C

Деактивирующий агент Inactivating agent	Экспозиция, ч Exposure, h	Концентрация инактиванта, % Inactivation agent concentration, %	t, °C	Титр вируса, lgТЦД ₅₀ /см ³ Virus titer, lgTCID ₅₀ /cm ³				
				исходный original	остаточный residual			
Формальдегид Formaldehyde	1	0,05	37	6,83 ± 0,22	1,2 ± 0,12			
		0,1			1,0 ± 0,15			
		0,5			0,2 ± 0,11			
	2	0,05			0,00			
		0,1			0,00			
		0,5			0,00			
	Контроль Control	2			0			6,58 ± 0,38
	β-пропиолактон β-propiolactone	4			0,05	37	6,83 ± 0,22	5,11 ± 0,14
					0,1			4,83 ± 0,23
0,5			3,50 ± 0,17					
6		0,05	3,80 ± 0,1					
		0,1	3,50 ± 0,17					
		0,5	2,00 ± 0,12					
8		0,05	2,50 ± 0,15					
		0,1	2,40 ± 0,17					
		0,5	0,5 ± 0,2					
10		0,05	1,10 ± 0,2					
		0,1	1,00 ± 0,2					
		0,5	0,00					
12		0,05	0,00					
		0,1	0,00					
		0,5	0,00					
Контроль Control	12	0			5,37 ± 0,17			

В исследованиях по оценке антигенной активности инактивированных образцов варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2 по скорости формирования и титру ВНА в организме беспородных белых мышей категории SPF в зависимости от вида и концентрации использованного инактиванта были получены результаты, которые отражены в **табл. 2**.

Как видно из данных табл. 2, скорость формирования ВНА была зависима от концентрации инактивантов, независимо от их вида. При использованных наибольших концентрациях инактивантов, равных 0,5 и 0,1%, ВНА в образцах сыворотки крови привитых мышей выявлялись на 21-е сутки после инокуляции инактивированного возбудителя, в то время как при концентрации этих химических веществ 0,05% уже на 14-е сутки отмечали наличие следов ВНА в титре 2,4 ± 0,8 и 1,6 ± 0,8 (формальдегид и БПЛ соответственно). Уровень титров ВНА в динамике изменялся также в зависимости от концентрации использованных инактивантов. Образцы вируса, инактивированные инактивантами в концентрации 0,5%, стимулировали

ВНА, титры которых за период наблюдения не превышали 4,4 ± 1,96 и 6,4 ± 1,968 (формальдегид и БПЛ соответственно), в то время как в организме мышей, привитых вирусом, инактивированным инактивантами в концентрации 0,1%, выявлялись специфические антитела в титрах 12,8 ± 3,92 и 11,2 ± 3,928 (формальдегид и БПЛ соответственно) на 28-е сутки после прививки. Выраженная антигенная стимуляция наблюдалась у вируса, инактивированного обоими инактивантами в концентрации 0,05%. У мышей, привитых вирусом, инактивированным инактивантами наименьшей концентрации, титры антител на 21-е сутки достигали 17,6 ± 7,84 и 14,4 ± 9,328 (формальдегид и БПЛ соответственно), а на 28-е сутки – 25,6 ± 2,8 и 19,2 ± 2,658 (формальдегид и БПЛ соответственно). Соответственно, кратность прироста титра ВНА за наблюдаемые 28 сут был наивысшим в образцах сыворотки крови мышей, привитых вирусом, инактивированным инактивантами в наименьшей концентрации, равной 0,05%, и составила 25 для вируса, инактивированного формальдегидом, а БПЛ – 19.

Таблица 2. Динамика титров вируснейтрализующих антител (ВНА) в организме мышей, иммунизированных образцами варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2, инактивированных двумя инактивантами в разных концентрациях при температуре 37 °С

Table 2. Dynamics of virus-neutralizing antibody (VNA) titers in mice inoculated with samples of the Omicron variant of the SARS-CoV-2 virus inactivated by two inactivation agents at different concentrations at 37°C

Инактивант Inactivation agent	Концентрация инактиванта, % Concentration of inactivation agent, %	Кол-во привитых мышей, гол. Number of vaccinated mice, head	Сроки исследования после иммунизации, сут Duration of the study after immunization, days				Прирост титра ВНА, кратно Increase in VNA titer, multiple
			0	14	21	28	
Формальдегид Formaldehyde	0,5	5	0	0	3,6 ± 0,8	4,4 ± 1,96	4
	0,1	5	0	0	9,6 ± 3,2	12,8 ± 3,92	12
	0,05	5	0	2,4 ± 0,8	17,6 ± 7,84	25,6 ± 2,8	25
β-пропиолактон β-propiolactone	0,5	5	0	0	0	6,4 ± 1,96	6
	0,1	5	0	0	7,2 ± 1,6	11,2 ± 3,92	11
	0,05	5	0	1,6 ± 0,8	14,4 ± 9,32	19,2 ± 2,65	19

Примечание. Титры ВНА приведены в обратных числовых значениях разведения сыворотки крови.

Note. Virus-neutralizing antibody (VNA) titers are given in reciprocal numerical values of blood serum dilution.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при концентрации инактивантов 0,05% целевой вариант вируса подвергается полной инаktivации за выявленное время при температуре 37 °С и сохраняет свою антигенную активность значительно дольше, чем при его инаktivации теми же инаktivантами, взятыми в 2- и 4-кратно повышенных концентрациях.

Обсуждение

Инаktivированные вирусные препараты традиционно используются при производстве вакцин. Они относятся к безопасным и эффективным препаратам для профилактики гриппа, полиомиелита, гепатита А, клещевого энцефалита и японского энцефалита [34–37].

Инаktivация вируса является одним из наиболее важных этапов вирусологических исследований и разработки инаktivированных вакцин. В качестве химического инаktivанта в настоящее время используют БПЛ и формальдегид, однако не существует единого стандарта для проекирования и определения процесса инаktivации [38].

В настоящей статье рассматриваются доступные методы инаktivации варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2 для таких целей, как производство вакцин и антисывороток. Была оптимизирована концентрация инаktivантов (формальдегида, БПЛ) и изучено их влияние на агрегацию вируса. Было выявлено, что обработка 0,05% и 0,1% формальдегидом и БПЛ культуральной суспензии при температуре +37 °С достаточна для полной инаktivации вируса. При этом процесс разрушения в этих концентрациях с БПЛ значительно дольше, чем с формальдегидом. Также результаты исследования показали, что более высокие концентрации 0,5% БПЛ и формальдегида отрицательно влияют на антигенный потенциал вируса, тем самым потенциально влияя на иммунный ответ при использовании в качестве антигенов. Однако более низкая концентрация (0,05 и 0,1%) оказывала минимальное влияние на антигенную целостность по сравнению с более высокой концентрацией, что позволяет предположить, что при этих концентрациях антигенный ответ должен быть устойчивым.

Имеются аналогичные работы использования БПЛ в разведении 1: 1000 при температуре +4–8 °С, в которых в течение короткого времени (2 ч) отмечалась низкая активность вируса.

По данным литературы, для инаktivации БПЛ обычно используют концентрации от 0,1 до 1%. Более ранние исследования показали, что обработка БПЛ вызывает агрегацию вирусных частиц, а увеличение его концентрации вызывает образование более крупных агрегатов [39].

Заключение

Результаты исследований показали, что выделенный генетический вариант Омикрон вируса SARS-CoV-2 из клинических образцов пациентов, больных COVID-19 (г. Астана), обладал цитопатогенной активностью в культуре клеток Vero, которая близко напоминает исходный вариант (Ухань) возбудителя. На уровне 5-го пассажа вирус накапливается в монослойной культуре клеток Vero, приготовленной в матрасах и клеточных фабриках, в титрах $6,83 \pm 0,22 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}^3$.

Выделенный вариант Омикрон вируса SARS-CoV-2 в культуральной жидкости при обработке формальдегидом в концентрациях 0,5, 0,1, 0,05% и выдержке при температуре 37 °С подвергается полной инаktivации в течение до 2 ч. Обработка вируса БПЛ в тех же концентрациях, которые использованы для формальдегида, также инаktivует вирус, но за более продолжительное время, равное 11 ч. Образцы вируса, инаktivированные использованными инаktivантами, обладают разной антигенной активностью в зависимости от концентрации инаktivантов. Наиболее выраженная антигенная активность проявляется у образцов возбудителя, которые подвергались обработке инаktivантом в щадящей концентрации, равной 0,05%. Повышение концентрации инаktivантов в 5 раз и более приводит к значимому снижению антигенности вируса SARS-CoV-2. При использованных режимах инаktivации потеря биологической активности вируса происходит быстрее и антигенность сохраняется в большей степени при обработке формальдегидом.

Полученные результаты исследований можно использовать в технологии изготовления инактивированной вакцины против новой коронавирусной инфекции (COVID-19) с использованием варианта Омикрон вируса SARS-CoV-2.

ЛИТЕРАТУРА

- Han Q., Lin Q., Jin S., You L. Coronavirus 2019-nCoV: A brief perspective from the front line. *J. Infect.* 2020; 80(4): 373–7. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.02.010>
- Wrapp D., Wang N., Corbett K.S., Goldsmith J.A., Hsieh C.L., Abiona O., et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020; 367(6483): 1260–3. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>
- Xu D., Zhang Z., Chu F., Li Y., Jin L., Zhang L., et al. Genetic variation of SARS coronavirus in Beijing Hospital. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10(5): 789–94. <https://doi.org/10.3201/eid1005.030875>
- Bai Y., Du Z., Xu M., Wang L., Wu P., Lau E.H.Y., et al. International risk of SARS-CoV-2 Omicron variant importations originating in South Africa. *medRxiv.* 2021; 2021.12.07.21267410. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.12.07.21267410>
- Viana R., Moyo S., Amoako D.G., Tegally H., Scheepers C., Althaus C.L., et al. Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa. *Nature.* 2022; 603(7902): 679–86. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04411-y>
- Tegally H., Moir M., Everatt J., Giovanetti M., Scheepers C., Wilkinson E., et al. Emergence of SARS-CoV-2 Omicron lineages BA.4 and BA.5 in South Africa. *Nat. Med.* 2022; 28(9): 1785–90. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01911-2>
- Rahimi F., Bezmin Abadi A.T. The Omicron subvariant BA.2: Birth of a new challenge during the COVID-19 pandemic. *Int. J. Surg.* 2022; 99: 106261. <https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2022.106261>
- Fonager J., Bennedbaek M., Bager P., Wohlfahrt J., Ellegaard K.M., Ingham A.C., et al. Molecular epidemiology of the SARS-CoV-2 variant Omicron BA.2 sub-lineage in Denmark, 29 November 2021 to 2 January 2022. *Euro Surveill.* 2022; 27(10): 2200181. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.10.2200181>
- Chen L.L., Abdullah S.M.U., Chan W.M., Chan B.P., Ip J.D., Chu A.W., et al. Contribution of low population immunity to the severe Omicron BA.2 outbreak in Hong Kong. *Nat. Commun.* 2022; 13(1): 3618. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31395-0>
- O'Toole A., Pybus O.G., Abram M.E., Kelly E.J., Rambaut A. Pango lineage designation and assignment using SARS-CoV-2 spike gene nucleotide sequences. *BMC Genomics.* 2022; 23(1): 121. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08358-2>
- Rambaut A., Holmes E.C., O'Toole A., Hill V., McCrone J.T., Ruis C., et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nat. Microbiol.* 2020; 5(11): 1403–7. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5>
- Jung C., Kmiec D., Koepke L., Zech F., Jacob T., Sparrer K.M.J., et al. Omicron: what makes the latest SARS-CoV-2 variant of concern so concerning? *J. Virol.* 2022; 96(6): e020772. <https://doi.org/10.1128/jvi.02077-21>
- Our world in data. Mathieu E., Ritchie H., Rodés-Guirao L., Appel C., Giattino C., Hasell J., et al. Coronavirus Pandemic (COVID-19); 2020. Available at: <https://ourworldindata.org/coronavirus>
- Malik J.A., Ahmed S., Mir A., Shinde M., Bender O., Alshammari F., et al. The SARS-CoV-2 mutations versus vaccine effectiveness: New opportunities to new challenges. *J. Infect. Public Health.* 2022; 15(2): 228–40. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.12.014>
- Wang Q., Ye S.B., Zhou Z.J., Song A.L., Zhu X., Peng J.M., et al. Key mutations in the spike protein of SARS-CoV-2 affecting neutralization resistance and viral internalization. *J. Med. Virol.* 2023; 95(1): e28407. <https://doi.org/10.1002/jmv.28407>
- Murdin A.D., Barreto L., Plotkin S. Inactivated poliovirus vaccine: past and present experience. *Vaccine.* 1996; 14(8): 735–46. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(95\)00211-i](https://doi.org/10.1016/0264-410x(95)00211-i)
- Zakarya K., Kutumbetov L., Orynbayev M., Abduraimov Y., Sultankulova K., Kassenov M., et al. Safety and immunogenicity of a QazCovid-in® inactivated whole-virion vaccine against COVID-19 in healthy adults: A single-centre, randomised, single-blind, placebo-controlled phase 1 and an open-label phase 2 clinical trials with a 6 months follow-up in Kazakhstan. *EClinicalMedicine.* 2021; 39: 101078. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101078>
- Gupta D., Parthasarathy H., Sah V., Tandel D., Vedagiri D., Reddy S., et al. Inactivation of SARS-CoV-2 by β -propiolactone causes aggregation of viral particles and loss of antigenic potential. *Virus Res.* 2021; 305: 198555. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198555>
- Widera M., Westhaus S., Rabenau H.F., Hoehl S., Bojkova D., Cinatl J., et al. Evaluation of stability and inactivation methods of SARS-CoV-2 in context of laboratory settings. *Med. Microbiol. Immunol.* 2021; 210(4): 235–44. <https://doi.org/10.1007/s00430-021-00716-3>
- Awadasseid A., Wu Y., Tanaka Y., Zhang W. Current advances in the development of SARS-CoV-2 vaccines. *Int. J. Biol. Sci.* 2021; 17(1): 8–19. <https://doi.org/10.7150/ijbs.52569>
- Herrera-Rodriguez J., Signorazzi A., Holtrop M., de Vries-Idema J., Huckriede A. Inactivated or damaged? Comparing the effect of inactivation methods on influenza virions to optimize vaccine production. *Vaccine.* 2019; 37(12): 1630–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.01.086>
- Patterson E.I., Prince T., Anderson E.R., Casas-Sanchez A., Smith S.L., Cansado-Utrilla C., et al. Methods of inactivation of SARS-CoV-2 for downstream biological assays. *J. Infect. Dis.* 2020; 222(9): 1462–7. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa507>
- Auerswald H., Yann S., Dul S., In S., Dussart P., Martin N.J., et al. Assessment of inactivation procedures for SARS-CoV-2. *J. Gen. Virol.* 2021; 102(3): 001539. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001539>
- Goldstein M.A., Tauraso N.M. Effect of formalin, beta-propiolactone, merthiolate, and ultraviolet light upon influenza virus infectivity chicken cell agglutination, hemagglutination, and antigenicity. *Appl. Microbiol.* 1970; 19(2): 290–4. <https://doi.org/10.1128/am.19.2.290-294.1970>
- Fan C., Ye X., Ku Z., Kong L., Liu Q., Xu C., et al. Beta-propiolactone inactivation of coxsackievirus A16 induces structural alteration and surface modification of viral capsids. *J. Virol.* 2017; 91(8): e00038-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00038-17>
- Wang H., Zhang Y., Huang B., Deng W., Quan Y., Wang W., et al. Development of an inactivated vaccine candidate, BBIBP-CorV, with potent protection against SARS-CoV-2. *Cell.* 2020; 182(3): 713–21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.008>
- Gao Q., Bao L., Mao H., Wang L., Xu K., Yang M., et al. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science.* 2020; 369(6499): 77–81. <https://doi.org/10.1126/science.abc1932>
- Zhang X.Y., Guo J., Wan X., Zhou J.G., Jin W.P., Lu J., et al. Biochemical and antigenic characterization of the structural proteins and their post-translational modifications in purified SARS-CoV-2 virions of an inactivated vaccine candidate. *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9(1): 2653–62. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1855945>
- Chen H., Xie Z., Long R., Fan S., Li H., He Z., et al. A valid protective immune response elicited in rhesus macaques by an inactivated vaccine is capable of defending against SARS-CoV-2 infection. *bioRxiv.* 2020; 2020.08.04.235747. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.08.04.235747>
- Basso C.R., Malossi C.D., Haisi A., de Albuquerque Pedrosa V., Barbosa A.N., Grotto R.T., et al. Fast and reliable detection of SARS-CoV-2 antibodies based on surface plasmon resonance. *Anal. Methods.* 2021; 13(29): 3297–306. <https://doi.org/10.1039/d1ay00737h>
- Reed L., Muench H. A simple method of estimation fifty percent and pints. *J. Amer. Hyg.* 1938; 27(3): 493–7. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
- Мырзахметова Б.Ш., Жаппарова Г.А., Бисенбаева К.Б., Тойтанова А.С., Туысканова М.С., Жугунисов К.Д. и др. Иммуная реактивность двух биологических моделей на прививку инактивированной вакциной QazVac против коронавирусной инфекции COVID-19. *Вопросы вирусологии.* 2024; 69(3): 219–30. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-222> <https://elibrary.ru/mcackf>
- Жугунисов К.Д., Керимбаев А.А., Копеев С.К., Мырзахметова Б.Ш., Туысканова М.С., Наханов А.К. и др. Вирус SARS-CoV-2: выделение, культивирование, термостабильность, инактивация и пассирование. *Вестник КазНУ. Серия биологическая.* 2022; 90(1): 73–89. <https://doi.org/10.26577/eb.2022.v90.i1.07>
- Chan J.F., Yip C.C., To K.K., Tang T.H., Wong S.C., Leung K.H., et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated in vitro and with clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 58(5): e00310-20. <https://doi.org/10.1128/jcm.00310-20>


35. Yuan Y., Wang R.T., Xia J., Cao H.J. Interventions for preventing influenza: an overview of Cochrane systematic reviews and a Bayesian network meta-analysis. *J. Integr. Med.* 2021; 19(6): 503–14. <https://doi.org/10.1016/j.joim.2021.09.001>
36. Stuurman A.L., Marano C., Bunge E.M., De Moerloose L., Shouval D. Impact of universal mass vaccination with monovalent inactivated hepatitis A vaccines – a systematic review. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2017; 13(3): 724–36. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1242539>
37. Hegde N.R., Gore M.M. Japanese encephalitis vaccines: immunogenicity, protective efficacy, effectiveness, and impact on the burden of disease. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2017; 13(6): 1–18. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1285472>
38. Yu S., Wei Y., Liang H., Ji W., Chang Z., Xie S., et al. Comparison of physical and biochemical characterizations of SARS-CoV-2 inactivated by different treatments. *Viruses.* 2022, 14(9): 1938. <https://doi.org/10.3390/v14091938>
39. Kordyukova L.V., Moiseenko A.V., Serebryakova M.V., Shuklina M.A., Sergeeva M.V., Lioznov D.A., et al. Structural and immunoreactivity properties of the SARS-CoV-2 spike protein upon the development of an inactivated vaccine. *Viruses.* 2023; 15(2): 480. <https://doi.org/10.3390/v15020480>

REFERENCES

1. Han Q., Lin Q., Jin S., You L. Coronavirus 2019-nCoV: A brief perspective from the front line. *J. Infect.* 2020; 80(4): 373–7. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.02.010>
2. Wrapp D., Wang N., Corbett K.S., Goldsmith J.A., Hsieh C.L., Abiona O., et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020; 367(6483): 1260–3. <https://doi.org/10.1126/science.abb2507>
3. Xu D., Zhang Z., Chu F., Li Y., Jin L., Zhang L., et al. Genetic variation of SARS coronavirus in Beijing Hospital. *Emerg. Infect. Dis.* 2004; 10(5): 789–94. <https://doi.org/10.3201/eid1005.030875>
4. Bai Y., Du Z., Xu M., Wang L., Wu P., Lau E.H.Y., et al. International risk of SARS-CoV-2 Omicron variant importations originating in South Africa. *medRxiv.* 2021; 2021.12.07.21267410. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2021.12.07.21267410>
5. Viana R., Moyo S., Amoako D.G., Tegally H., Scheepers C., Althaus C.L., et al. Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa. *Nature.* 2022; 603(7902): 679–86. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04411-y>
6. Tegally H., Moir M., Everatt J., Giovanetti M., Scheepers C., Wilkinson E., et al. Emergence of SARS-CoV-2 Omicron lineages BA.4 and BA.5 in South Africa. *Nat. Med.* 2022; 28(9): 1785–90. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-01911-2>
7. Rahimi F., Bezmin Abadi A.T. The Omicron subvariant BA.2: Birth of a new challenge during the COVID-19 pandemic. *Int. J. Surg.* 2022; 99: 106261. <https://doi.org/10.1016/j.ijsu.2022.106261>
8. Fonager J., Bennedbæk M., Bager P., Wohlfahrt J., Ellegaard K.M., Ingham A.C., et al. Molecular epidemiology of the SARS-CoV-2 variant Omicron BA.2 sub-lineage in Denmark, 29 November 2021 to 2 January 2022. *Euro Surveill.* 2022; 27(10): 2200181. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.10.2200181>
9. Chen L.L., Abdullah S.M.U., Chan W.M., Chan B.P., Ip J.D., Chu A.W., et al. Contribution of low population immunity to the severe Omicron BA.2 outbreak in Hong Kong. *Nat. Commun.* 2022; 13(1): 3618. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-31395-0>
10. O'Toole A., Pybus O.G., Abram M.E., Kelly E.J., Rambaut A. Pango lineage designation and assignment using SARS-CoV-2 spike gene nucleotide sequences. *BMC Genomics.* 2022; 23(1): 121. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08358-2>
11. Rambaut A., Holmes E.C., O'Toole A., Hill V., McCrone J.T., Ruis C., et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nat. Microbiol.* 2020; 5(11): 1403–7. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5>
12. Jung C., Kmiec D., Koepke L., Zech F., Jacob T., Sparrer K.M.J., et al. Omicron: what makes the latest SARS-CoV-2 variant of concern so concerning? *J. Virol.* 2022; 96(6): e020772. <https://doi.org/10.1128/jvi.02077-21>
13. Our world in data. Mathieu E., Ritchie H., Rodés-Guirao L., Appel C., Giattino C., Hasell J., et al. Coronavirus Pandemic (COVID-19); 2020. Available at: <https://ourworldindata.org/coronavirus>
14. Malik J.A., Ahmed S., Mir A., Shinde M., Bender O., Alshammari F., et al. The SARS-CoV-2 mutations versus vaccine effectiveness: New opportunities to new challenges. *J. Infect. Public Health.* 2022; 15(2): 228–40. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2021.12.014>
15. Wang Q., Ye S.B., Zhou Z.J., Song A.L., Zhu X., Peng J.M., et al. Key mutations in the spike protein of SARS-CoV-2 affecting neutralization resistance and viral internalization. *J. Med. Virol.* 2023; 95(1): e28407. <https://doi.org/10.1002/jmv.28407>
16. Mardin A.D., Barreto L., Plotkin S. Inactivated poliovirus vaccine: past and present experience. *Vaccine.* 1996; 14(8): 735–46. [https://doi.org/10.1016/0264-410x\(95\)00211-i](https://doi.org/10.1016/0264-410x(95)00211-i)
17. Zakarya K., Kutumbetov L., Orynbayev M., Abduraimov Y., Sultankulova K., Kassenov M., et al. Safety and immunogenicity of a QazCovid-in® inactivated whole-virion vaccine against COVID-19 in healthy adults: A single-centre, randomised, single-blind, placebo-controlled phase 1 and an open-label phase 2 clinical trials with a 6 months follow-up in Kazakhstan. *EClinicalMedicine.* 2021; 39: 101078. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101078>
18. Gupta D., Parthasarathy H., Sah V., Tandel D., Vedagiri D., Reddy S., et al. Inactivation of SARS-CoV-2 by β -propiolactone causes aggregation of viral particles and loss of antigenic potential. *Virus Res.* 2021; 305: 198555. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198555>
19. Widera M., Westhaus S., Rabenau H.F., Hoehl S., Bojkova D., Cinatl J., et al. Evaluation of stability and inactivation methods of SARS-CoV-2 in context of laboratory settings. *Med. Microbiol. Immunol.* 2021; 210(4): 235–44. <https://doi.org/10.1007/s00430-021-00716-3>
20. Awadasseid A., Wu Y., Tanaka Y., Zhang W. Current advances in the development of SARS-CoV-2 vaccines. *Int. J. Biol. Sci.* 2021; 17(1): 8–19. <https://doi.org/10.7150/ijbs.52569>
21. Herrera-Rodriguez J., Signorazzi A., Holtrop M., de Vries-Idema J., Huckriede A. Inactivated or damaged? Comparing the effect of inactivation methods on influenza virions to optimize vaccine production. *Vaccine.* 2019; 37(12): 1630–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.01.086>
22. Patterson E.I., Prince T., Anderson E.R., Casas-Sanchez A., Smith S.L., Cansado-Utrilla C., et al. Methods of inactivation of SARS-CoV-2 for downstream biological assays. *J. Infect. Dis.* 2020; 222(9): 1462–7. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa507>
23. Auerswald H., Yann S., Dul S., In S., Dussart P., Martin N.J., et al. Assessment of inactivation procedures for SARS-CoV-2. *J. Gen. Virol.* 2021; 102(3): 001539. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001539>
24. Goldstein M.A., Tauraso N.M. Effect of formalin, beta-propiolactone, merthiolate, and ultraviolet light upon influenza virus infectivity chicken cell agglutination, hemagglutination, and antigenicity. *Appl. Microbiol.* 1970; 19(2): 290–4. <https://doi.org/10.1128/am.19.2.290-294.1970>
25. Fan C., Ye X., Ku Z., Kong L., Liu Q., Xu C., et al. Beta-propiolactone inactivation of coxsackievirus A16 induces structural alteration and surface modification of viral capsids. *J. Virol.* 2017; 91(8): e00038-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.00038-17>
26. Wang H., Zhang Y., Huang B., Deng W., Quan Y., Wang W., et al. Development of an inactivated vaccine candidate, BBIBP-CorV, with potent protection against SARS-CoV-2. *Cell.* 2020; 182(3): 713–21. e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.008>
27. Gao Q., Bao L., Mao H., Wang L., Xu K., Yang M., et al. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science.* 2020; 369(6499): 77–81. <https://doi.org/10.1126/science.abc1932>
28. Zhang X.Y., Guo J., Wan X., Zhou J.G., Jin W.P., Lu J., et al. Biochemical and antigenic characterization of the structural proteins and their post-translational modifications in purified SARS-CoV-2 virions of an inactivated vaccine candidate. *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9(1): 2653–62. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1855945>
29. Chen H., Xie Z., Long R., Fan S., Li H., He Z., et al. A valid protective immune response elicited in rhesus macaques by an inactivated vaccine is capable of defending against SARS-CoV-2 infection. *bioRxiv.* 2020; 2020.08.04.235747. Preprint. <https://doi.org/10.1101/2020.08.04.235747>
30. Basso C.R., Malossi C.D., Haisi A., de Albuquerque Pedrosa V., Barbosa A.N., Grotto R.T., et al. Fast and reliable detection of SARS-CoV-2 antibodies based on surface plasmon resonance. *Anal. Methods.* 2021; 13(29): 3297–306. <https://doi.org/10.1039/d1ay00737h>
31. Reed L., Muench H. A simple method of estimation fifty percent and pints. *J. Amer. Hyg.* 1938; 27(3): 493–7. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
32. Myrzakhmetova B.Sh., Zhapparova G.A., Bisenbaeva K.B., Toytanova A.S., Tuyskanova M.S., Zhugunisov K.D., et al. Immune reactivity of two biological models to vaccination with the inactivated

- vaccine QazVac against coronavirus infection COVID-19. *Voprosy virusologii*. 2024; 69(3): 219–30. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-222> <https://elibrary.ru/mcackf> (in Russian)
33. Zhugunisov K.D., Kerimbayev A.A., Kopeev S.K., Myrzakhmetova B.Sh., Tuyskanova M.S., Nakhanov A.K., et al. SARS-CoV-2 virus: isolation, growth, thermostability, inactivation and passages. *Vestnik KazNU. Seriya biologicheskaya*. 2022; 90(1): 73–89. <https://doi.org/10.26577/eb.2022.v90.i1.07> (in Russian)
 34. Chan J.F., Yip C.C., To K.K., Tang T.H., Wong S.C., Leung K.H., et al. Improved molecular diagnosis of COVID-19 by the novel, highly sensitive and specific COVID-19-RdRp/Hel real-time reverse transcription-PCR assay validated in vitro and with clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2020; 58(5): e00310-20. <https://doi.org/10.1128/jcm.00310-20>
 35. Yuan Y., Wang R.T., Xia J., Cao H.J. Interventions for preventing influenza: an overview of Cochrane systematic reviews and a Bayesian network meta-analysis. *J. Integr. Med.* 2021; 19(6): 503–14. <https://doi.org/10.1016/j.joim.2021.09.001>
 36. Stuurman A.L., Marano C., Bunge E.M., De Moerlooze L., Shouval D. Impact of universal mass vaccination with monovalent inactivated hepatitis A vaccines – a systematic review. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2017; 13(3): 724–36. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1242539>
 37. Hegde N.R., Gore M.M. Japanese encephalitis vaccines: immunogenicity, protective efficacy, effectiveness, and impact on the burden of disease. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2017; 13(6): 1–18. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1285472>
 38. Yu S., Wei Y., Liang H., Ji W., Chang Z., Xie S., et al. Comparison of physical and biochemical characterizations of SARS-CoV-2 inactivated by different treatments. *Viruses*. 2022, 14(9): 1938. <https://doi.org/10.3390/v14091938>
 39. Kordyukova L.V., Moiseenko A.V., Serebryakova M.V., Shuklina M.A., Sergeeva M.V., Lioznov D.A., et al. Structural and immunoreactivity properties of the SARS-CoV-2 spike protein upon the development of an inactivated vaccine. *Viruses*. 2023; 15(2): 480. <https://doi.org/10.3390/v15020480>

Информация об авторах:

Жаппарова Гулжан Амировна  – магистр биологии, старший научный сотрудник лаборатории «Особо опасные инфекционные заболевания» ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», пгт. Гвардейский, Республика Казахстан. E-mail: gulzhan1003@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5382-831X>

Мырзахметова Балжан Шайзадаевна – канд. биол. наук, заведующая лабораторией «Особо опасные инфекционные заболевания» ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», пгт. Гвардейский, Республика Казахстан. E-mail: balzhan.msh@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4141-7174>

Тленчиева Талшынгул Муратовна – магистр химии, младший научный сотрудник лаборатории «Особо опасные инфекционные заболевания» ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», пгт. Гвардейский, Республика Казахстан. E-mail: t.m.tlenchieva@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0006-7831-4212>

Тусипова Айганым Айткаликизы – магистр естественных наук, старший лаборант лаборатории «Особо опасные инфекционные заболевания» ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», пгт. Гвардейский, Республика Казахстан. E-mail: aiganym.t24@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7767-0542>

Бисенбаева Карина Бисенбаевна – магистр биологии, младший научный сотрудник лаборатории «Особо опасные инфекционные заболевания» ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», пгт. Гвардейский, Республика Казахстан. E-mail: bisenbayeva.karina@bk.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5788-6074>


Тойтанова Айжан Сейткаримовна – магистр биологии, младший научный сотрудник лаборатории «Особо опасные инфекционные заболевания» ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», пгт. Гвардейский, Республика Казахстан. E-mail: aizhana-1308@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0004-9526-3539>

Кутумбетов Леспек Бекболатович – д-р вет. наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории «Особо опасные инфекционные заболевания» ТОО «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности», пгт. Гвардейский, Республика Казахстан. E-mail: lespek.k@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-8481-0673>

Участие авторов: Жаппарова Г.А. – проведение экспериментов, оформление статьи; Мырзахметова Б.Ш. – планирование исследования, проведение экспериментов, оформление статьи; Тленчиева Т.М. – проведение экспериментов; Тусипова А.А. – проведение экспериментов; Бисенбаева К.Б. – проведение экспериментов; Тойтанова А.С. – проведение экспериментов; Кутумбетов Л.Б. – планирование исследования, статистическая обработка результатов, помощь в оформлении статьи.

Поступила 19.07.2024
Принята в печать 16.09.2024
Опубликована 31.10.2024

Information about the authors:

Gulzhan A. Zhapparova  – master of biology, senior researcher of the laboratory Especially Dangerous Infectious Diseases, Research Institute of Biological Safety Problems, Gvardeyskiy, Republic of Kazakhstan. E-mail: gulzhan1003@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5382-831X>

Balzhan Sh. Myrzakhmetova – candidate of biological sciences, head of the laboratory Especially Dangerous Infectious Diseases, Research Institute of Biological Safety Problems, Gvardeyskiy, Republic of Kazakhstan. E-mail: balzhan.msh@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4141-7174>

Talshyngul M. Tlenchiyeva – master of chemistry, senior researcher of the laboratory Especially Dangerous Infectious Diseases, Research Institute of Biological Safety Problems, Gvardeyskiy, Republic of Kazakhstan. E-mail: t.m.tlenchieva@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0006-7831-4212>

Aiganym A. Tussipova – master of Natural Sciences, senior laboratory assistant of the laboratory Especially Dangerous Infectious Diseases, Research Institute of Biological Safety Problems, Gvardeyskiy, Republic of Kazakhstan. E-mail: aiganym.t24@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7767-0542>

Karina B. Bisenbayeva – master of biology, senior researcher of the laboratory Especially Dangerous Infectious Diseases, Research Institute of Biological Safety Problems, Gvardeyskiy, Republic of Kazakhstan. E-mail: bisenbayeva.karina@bk.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5788-6074>

Aizhan S. Toytanova – master of biology, senior researcher of the laboratory Especially Dangerous Infectious Diseases, Research Institute of Biological Safety Problems, Gvardeyskiy, Republic of Kazakhstan. E-mail: aizhana-1308@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0004-9526-3539>

Lespek B. Kutumbetov – doctor of veterinary sciences, professor, chief researcher of the laboratory Especially Dangerous Infectious Diseases, Research Institute of Biological Safety Problems, Gvardeyskiy, Republic of Kazakhstan. E-mail: lespek.k@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-8481-0673>

Contribution: Zhapparova G.A. – conducting experiments, preparing the article; Myrzakhmetova B.Sh. – planning the research, conducting experiments, preparing the article; Tlenchiyeva T.M. – conducting experiments; Tussipova A.A. – conducting experiments; Bisenbayeva K.B. – conducting experiments; Toytanova A.S. – conducting experiments; Kutumbetov L.B. – study planning, statistical processing of results, assistance in design of the article.

Received 19 July 2024
Accepted 16 September 2024
Published 31 October 2024

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-262>

© АНТОНОВА А.А., ЛЕБЕДЕВ А.В., ОЖМЕГОВА Е.Н., ШЛЫКОВА А.В., ЛАПОВOK И.А., КУЗНЕЦОВА А.И., 2024



Вариабельность неструктурных белков у вариантов ВИЧ-1 суб-субтипа А6 (Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1, sub-subtype А6), циркулирующих в разных регионах Российской Федерации

Антонова А.А.¹, Лебедев А.В.¹, Ожмегова Е.Н.¹, Шлыкова А.В.², Лаповок И.А.², Кузнецова А.И.^{1✉}

¹Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

²ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, Россия

Резюме

Введение. Неструктурные белки ВИЧ-1 являются перспективными мишенями для разработки вакцин и для создания подходов персонализированной медицины. На протяжении многих лет на территории Российской Федерации доминирует суб-субтип А6 ВИЧ-1. Однако имеющиеся географические, экономические и демографические особенности страны могут способствовать формированию различий между вариантами вируса, циркулирующими в разных регионах России.

Цель работы: провести сравнительный анализ консенсусных последовательностей неструктурных белков ВИЧ-1 вариантов А6, циркулирующих в Амурской области, в гг. Архангельске, Иркутске и Мурманске.

Материалы и методы. Исследовали 48 образцов цельной крови, которые были получены от ВИЧ-инфицированных пациентов без опыта приема терапии, наблюдавшихся в центрах по профилактике и борьбе со СПИДом в гг. Архангельске, Иркутске, Мурманске и в Амурской области. Получали полногеномные нуклеотидные последовательности ВИЧ-1, субтипировали. Формировали консенсусные последовательности каждого неструктурного белка ВИЧ-1 для каждого анализируемого региона. Дополнительно формировали референсные последовательности неструктурных белков ВИЧ-1 суб-субтипа А6 на основе полногеномных последовательностей, загруженных из международной базы данных Los Alamos. Сравнение консенсусных и референсных последовательностей осуществляли с помощью программ MEGA v.10.2.2 и PSIPRED.

Результаты. Впервые представлены референсные последовательности белков Vif, Vpr и Nef ВИЧ-1 суб-субтипа А6. Для белка Vpr различий в консенсусных последовательностях вариантов вируса, циркулирующих в разных регионах РФ, не обнаружено. Для консенсусных последовательностей белков Tat, Rev, Vpr, Vif и Nef вариантов ВИЧ-1 из разных регионов РФ определены характерные особенности.

Заключение. Ограничением проведенного исследования является небольшая выборка образцов. В целом полученные результаты указывают на существующее разнообразие неструктурных белков ВИЧ-1 суб-субтипа А6 в разных регионах страны и обозначают актуальность исследования полиморфизма неструктурных белков вариантов вируса в разных регионах в будущем.

Ключевые слова: ВИЧ-1; суб-субтип А6; неструктурные белки

Для цитирования: Антонова А.А., Лебедев А.В., Ожмегова Е.Н., Шлыкова А.В., Лаповок И.А., Кузнецова А.И. Вариабельность неструктурных белков у вариантов ВИЧ-1 суб-субтипа А6 (Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1, sub-subtype А6), циркулирующих в разных регионах Российской Федерации. *Вопросы вирусологии.* 2024; 69(5): 470–480. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-262> EDN: <https://elibrary.ru/wbbkuq>

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23–15–00027, <https://rscf.ru/project/23-15-00027/> (дата заключения соглашения 15 мая 2023).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом при ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» протокол № 1 от 30 марта 2010 г.

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-262>

Variability of non-structural proteins of HIV-1 sub-subtype A6 (Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1, sub-subtype A6) variants circulating in different regions of the Russian Federation

Anastasiia A. Antonova¹, Aleksey V. Lebedev¹, Ekaterina N. Ozhmegova¹,
Anastasia V. Shlykova², Ilya A. Lapavok², Anna I. Kuznetsova¹✉

¹D.I. Ivanovsky Institute of Virology of National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia;

²Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, 111123, Russia

Abstract

Introduction. HIV-1 non-structural proteins are promising targets for vaccine development and for creating approaches to personalized medicine. HIV-1 sub-subtype A6 has become the dominating strain in Russia. However, the geographic, economic and demographic characteristics of the country can contribute to the formation of differences between A6 variants circulating in different regions.

The aim of the study is a comparative analysis of the consensus sequences of non-structural proteins in A6 variants circulating in the Amur Region, in Arkhangelsk, Irkutsk and Murmansk.

Materials and methods. 48 whole blood samples obtained from HIV-infected patients without experience of therapy observed at the AIDS Centers in Arkhangelsk, Irkutsk, Murmansk and Amur Region were analyzed. HIV-1 whole-genome nucleotide sequences were obtained and were subtyped. Consensus sequences of sub-subtype A6 variants non-structural proteins for each analyzed region were formed. Furthermore, reference sequences of sub-subtype A6 non-structural proteins were formed based on whole-genome sequences retrieved from the international Los Alamos database. Comparison of consensus sequences and references was performed using the MEGA v.10.2.2 and the PSIPRED programs.

Results. Vif, Vpr and Nef reference sequences have been obtained for HIV-1 sub-subtype A6. There was not difference in consensus sequences of Vpr in different regions. Characteristic features were found for consensus sequences of Tat, Rev, Vpu, Vif and Nef proteins in different regions.

Conclusion. A limitation of the study is a small sample size. Overall, the results demonstrate the existing diversity of non-structural proteins in sub-subtype A6 variants in different regions and indicate the relevance of studying the polymorphism of non-structural proteins of virus variants in different regions.

Keywords: HIV-1; sub-subtype A6; non-structural proteins

For citation: Antonova A.A., Lebedev A.V., Ozhmegova E.N., Shlykova A.V., Lapavok I.A., Kuznetsova A.I. Variability of non-structural proteins in HIV-1 sub-subtype A6 (Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1, sub-subtype A6) variants circulating in different regions of the Russian Federation. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(5): 470–480. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-262> EDN: <https://elibrary.ru/wbbkuq>

Funding. The research was funded by the Russian Science Foundation, grant number 23–15–00027, <https://rscf.ru/project/23-15-00027/> (date of agreement 15 May 2023).

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

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee at the Federal Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», protocol No. 1 dated March 30, 2010.

Введение

Геном вируса иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1) (Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1) кодирует 6 неструктурных белков: Tat, Rev, Vpu, Vif, Vpr, Nef. Неструктурные белки создают необходимые условия для репликации вируса и обеспечивают защиту вируса от действия иммунной системы хозяина [1]. Ранее проведенные исследования показали, что в неструктурных белках ВИЧ-1 содержатся эпитопы, которые могут быть использованы для разработки вакцин

[2–4]. Отмечалось, что иммунизация конструкторскими на основе белка Tat способствовала восстановлению уровня CD4-клеток и сокращению вирусных резервуаров [5]. В настоящее время разработка новых подходов к стимуляции иммунного ответа на основе неструктурных белков продолжается [6–8]. В связи с этим изучение вариативности неструктурных белков ВИЧ-1 является важной задачей и создает основу для подобного рода разработок. Кроме того, в неструктурных белках ВИЧ-1 были определены аминокислотные замены, ассоциированные как с изменением

скорости течения ВИЧ-инфекции, так и с развитием коморбидных заболеваний у ВИЧ-инфицированных пациентов [1]. Таким образом, изучение разнообразия неструктурных белков ВИЧ-1 также может стать платформой для разработки подходов персонализированной медицины.

Молекулярная эпидемиология ВИЧ-1 в России имеет свои характерные особенности. Изначально активное распространение ВИЧ-инфекции в России было связано с проникновением в 90-х годах XX в. в среду потребителей инъекционных наркотиков (ПИН) вируса суб-субтипа А6 и его последующим быстрым распространением внутри этой социальной группы во всех регионах страны [9]. Затем было отмечено постепенное снижение доли ПИН в популяции ВИЧ-инфицированных на территории РФ с одновременным увеличением числа случаев передачи вируса при гетеросексуальных контактах [10]. В настоящее время на территории России суб-субтип А6 по-прежнему остается доминирующим (82,9%) генетическим вариантом ВИЧ-1, однако при этом отмечается постоянный рост генетического разнообразия вируса [11, 12].

Эпидемический процесс ВИЧ-инфекции на территории Российской Федерации вызывает большой интерес и обусловлен рядом особенностей страны: Россия по размерам территории занимает 1-е место в мире, является многонациональной и многоконфессиональной страной, что определяет разницу культур и поведения, образа жизни и моделей мобильности населения. Кроме того, наша страна граничит с 18 государствами, обладает многочисленными транспортными коридорами, что способствует высокому генетическому разнообразию и быстрому распространению ВИЧ-1 за счет миграционных процессов [13, 14]. Так, отмечалось, что доля и разнообразие циркулирующих не-А6 вариантов может существенно отличаться между разными федеральными округами РФ [12]. Вероятно, географическое положение, особенности социально-экономического развития региона и состава населения могут оказывать влияние также на

селекцию циркулирующих генетических вариантов вируса внутри суб-субтипа А6.

Принимая во внимание вышесказанное, мы предположили, что неструктурные белки могут различаться у вариантов ВИЧ-1 суб-субтипа А6, циркулирующих в разных регионах РФ. До настоящего момента исследований по изучению разнообразия неструктурных белков вариантов ВИЧ-1 суб-субтипа А6, циркулирующих в разных регионах России, не проводилось.

Цель – сравнительный анализ консенсусных последовательностей неструктурных белков ВИЧ-1 суб-субтипа А6 у вариантов вируса, циркулирующих в разных регионах России: в Амурской области, в гг. Архангельске, Иркутске и Мурманске.

Материалы и методы

Материалом настоящего исследования служили клинические образцы цельной крови, полученные от 48 наивных (без опыта приема антиретровирусной терапии (АРТ), ВИЧ-инфицированных пациентов из следующих регионов России: Амурской области, гг. Архангельска, Иркутска и Мурманска (табл. 1). Забор крови у пациентов осуществляли единоразово в период 2012–2014 гг. в рамках реализации проекта CHAIN 7-й Рамочной программы Европейского сообщества «Единая сеть по изучению лекарственной устойчивости к антиретровирусным препаратам» (<https://cordis.europa.eu/project/id/223131>). Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом при ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» протокол № 1 от 30 марта 2010 г.

Образцы анализировали путем массового параллельного секвенирования с помощью набора «Ампли-Сенс HIV-Resist-NGS» в соответствии с инструкцией производителя (ФБУН «ЦНИИЭ Роспотребнадзора», Россия). Полногеномное секвенирование образцов было выполнено с применением технологии MiSeq и соответствующих наборов MiSeq reagent kits V2

Таблица 1. Характеристики ВИЧ-1-инфицированных пациентов, включенных в исследование

Table 1. Characteristics of HIV-1 infected patients included in the study

Регион Region	Число пациентов Number of patients	Год забора образца Date of sampling	Пол Sex		Возраст Age	Путь инфицирования Route of infection		Стадия заболевания* Stage of HIV-infection*			
			муж. male	жен. female		ПИН IDU	гетеро hetero	2	3	4	неизвестно unknown
Амурская область Amur Region	10	2012	8	2	30,8 (18–41)	4	6	–	4	5	1
Архангельск Arkhangelsk	12	2013	3	9	30,3 (18–42)	5	7	1	10	1	–
Мурманск Murmansk	13	2013–2014	6	7	33 (26–42)	10	3	–	5	8	–
Иркутск Irkutsk	13	2012	10	3	31,9 (23–49)	10	3	–	7	6	–

Примечание. *В соответствии с клиническими рекомендациями [15].

Note. *In according to clinical recommendation [15].

(Illumina, США) путем анализа 4 перекрывающихся специфических фрагментов (общая протяженность анализируемого фрагмента 704–9563 по HXB2).

Определение генетических вариантов полученных полногеномных последовательностей проводили с применением программы Comet (<https://comet.lih.lu>). Парное и множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей выполняли в программе MEGA v.10.2.2. (megasoftware.net), затем из полученных алайнментов «вырезали» участки, кодирующие соответствующие анализируемые неструктурные белки ВИЧ-1 (Tat, Rev, Vpr, Vif, Vpr, Nef). Для всех последовательностей генов *tat*, *rev*, *vpr*, *vif*, *vpr*, *nef* был проведен филогенетический анализ. Филогенетический анализ осуществляли методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood, ML) с использованием программы IQ-TREE (<http://www.iqtree.org>). Источником эталонных последовательностей служила база данных Лос-Аламосской лаборатории США (<https://www.hiv.lanl.gov/>). Модель замещения нуклеотидов определяли в программе jModelTest v.2.1.7 на основании информационного критерия Акаике (Akaike information criterion, AIC). Наиболее подходящей моделью для последующего анализа считали модель с наименьшим значением критерия. Достоверность выведенных филогений оценивали с помощью бутстрэп-теста (bootstrap) и критерия приближенного отношения правдоподобия Шимодайры–Хасегавы (SH-aLRT) с 1000 послестартовых итераций. Кластеры с поддержкой SH-aLRT > 0,9 считали достоверно установленными. Визуализацию и графическую обработку результатов филогенетического анализа осуществляли в программе iTOL (<https://itol.embl.de>).

На следующем этапе исследования полученные нуклеотидные последовательности были переведены в аминокислотные с помощью онлайн-инструмента для трансляции, представленного на сайте <https://www.bioinformatics.org/sms2/translate.html>. Затем с помощью инструмента Simple Consensus Maker (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/CONSENSUS/SimpCon.html>) на основе полученных аминокислотных последовательностей были сформированы консенсусные последовательности для каждого неструктурного белка (Tat, Rev, Vpr, Vif, Vpr, Nef) для каждого региона РФ.

Для проведения дальнейшего сравнительного анализа консенсусных последовательностей дополнительно формировали референсные последовательности для каждого белка. Для этого из международной базы данных Los Alamos (Main Search Interface of HIV Sequence Database (lanl.gov)) были выгружены все имеющиеся полногеномные последовательности ВИЧ-1 суб-субтипа А6 (235 последовательностей на 13.08.2024). Выборка последовательностей не содержала дубликатов: только одна последовательность от одного пациента. Для каждого белка одновременно выгружали аминокислотные и нуклеотидные последовательности. Затем для каждого анализируемого

белка в программе MEGA v.10.2.2. (megasoftware.net) нуклеотидные и аминокислотные последовательности сопоставляли между собой. Последовательности, кодирующие неполный белок, были удалены из анализа. Инсерции при формировании референсных последовательностей не учитывали. Референсные последовательности для каждого неструктурного белка (Tat, Rev, Vpr, Vif, Vpr, Nef) были сформированы с помощью инструмента Simple Consensus Maker (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/CONSENSUS/SimpCon.html>) на основе аминокислотных последовательностей.

Дальнейшее сравнение полученных референсных и консенсусных последовательностей проводили с применением программы MEGA v.10.2.2. При этом определяли позиции аминокислот (АК) в консенсусных последовательностях, которые содержали аминокислотные замены относительно референсных последовательностей.

Далее проводили сравнительный анализ вторичных структур консенсусных последовательностей, полученных для каждого региона, с референсными последовательностями анализируемых белков ВИЧ-1 с помощью программы PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

Результаты

Все полученные в ходе настоящего исследования нуклеотидные последовательности (48) были депонированы в международную базу данных генотипов GenBank под следующими номерами (**табл. 2**).

По результатам предварительного субтипирования, все исследуемые нуклеотидные последовательности принадлежали ВИЧ-1 суб-субтипа А6. Проведенный филогенетический анализ подтвердил результаты предварительного субтипирования (**рис. 1**).

На следующем этапе исследования были сформированы консенсусные аминокислотные последовательности каждого неструктурного белка ВИЧ-1 (Tat, Rev, Vpr, Vif, Vpr, Nef) для каждого региона: для Амурской области – на основании 10 последовательностей, для г. Архангельска – 12 последовательностей, для Мурманска – 13, для Иркутска – 13. При их формировании инсерции (аминокислотные вставки) не учитывали. В **табл. 3** указаны все инсерции и делеции (точечные мутации, связанные с отсутствием АК в заданной позиции), которые были обнаружены в процессе анализа.

Затем на основе последовательностей, загруженных из международной базы данных Los Alamos, формировали референсные последовательности белков. Референсные последовательности белков Tat, Rev, Vif, Vpr были сформированы на основе 235 последовательностей и имели следующие длины: 101 АК, 123 АК, 192 АК, 96 АК соответственно. Референсная последовательность белка Vpr была сформирована на основе 232 последовательностей и содержала 81 АК. Референсная последовательность белка Nef была сформирована на основе 223 последовательностей и содержала 207 АК (**рис. 2**).

Таблица 2. Регистрационные номера GenBank использованных в работе нуклеотидных последовательностей ВИЧ-1

Table 2. GenBank accession numbers for the HIV-1 nucleotide sequences used in the work

Регион РФ Region of the Russian Federation	Номера последовательностей GenBank GenBank accession numbers for sequences
Амурская область Amur region	MH330347, MH330348, MH330349, MH330350, MH330351, MH330352, MH330353, MH330354, MH330355, MH330356
Архангельск Arkhangelsk	MG902950, MG902951, MH330337, MH330338, MH330339, MH330340, MH330341, MH330342, MH330343, MH330344, MH330345, MH330346
Мурманск Murmansk	MH330370, PP816220, MH330371, MH330372, MH330373, MH330374, MH330375, MH330376, MH330377, MH330378, MH330379, MH330380, MH330381
Иркутск Irkutsk	MH330357, MH330358, MH330359, PP816221, MH330361, PP816222, MH330363, MH330364, MH330365, PP816223, MH330367, PP816224, PP816225

Таблица 3. Инсерции и делеции аминокислот в анализируемых последовательностях*

Table 3. Insertions and deletions of amino acids (a.a.) in the analyzed sequences*

Белок ВИЧ-1 HIV-1 protein	Амурская область Amur region		Архангельск Arkhangelsk		Мурманск Murmansk		Иркутск Irkutsk	
	инсерция (N посл-ти) insertion (sequence ID)	делеция (N посл-ти) deletion (sequence ID)	инсерция (N посл-ти) insertion (sequence ID)	делеция (N посл-ти) deletion (sequence ID)	инсерция (N посл-ти) insertion (sequence ID)	делеция (N посл-ти) deletion (sequence ID)	инсерция (N посл-ти) insertion (sequence ID)	делеция (N посл-ти) deletion (sequence ID)
Tat	–	–	–	–	79–80insE (MH330380)	–	54–55insS (MH330364)	–
Rev	–	del97–119 (MH330355, MH330353)	–	del93–99 (MH330341), del94–115 (MH330339)	33–34insR (MH330380)	–	8–9insA (MH330364)	del91–97 (MH330358)
Vpu	–	–	–	–	–	del77 (PP816220)	7–8insTIV (PP816225)	del5 (PP816223)
Vif	–	–	–	–	–	–	–	del109–115 (PP816224)
Vpr	–	–	–	del85–86 (MH330345)	84–85insI/M (MH330371)	–	–	del85–86 (PP816225)
Nef	25–26insPA (MH330352, MH330354), 25–26ins PAASGVE (MH330355), 63–64insEE (MH330355)	del8–11 (MH330351), del8–11 (MH330355)	25–26insPA (MH330342, MH330343)	Del8–9 (MG902950)	25–26insPA (MH330371), 25–26insP (MH330370), 25–26in- sPAAGG[G/V] (MH330378), 25–26ins PXARRAPE (MH330380), 63–64insE (PP816220, MH330380)	–	25–26insPAP (PP816221), 25–26insPA (PP816225), 25–26insPAA (MH330363), 63–64insE (MH330358)	del8–11 (PP816221, MH330361), del10 (PP816223)

Примечание. *Расположение инсерций и делеций указано относительно консенсусной последовательности неструктурного белка ВИЧ-1 соответствующего региона.

Note. *The locations of insertions and deletions are shown according to the consensus sequence of the corresponding HIV-1 protein.

Полученные консенсусные последовательности неструктурных белков сравнивали с референсными последовательностями. В **табл. 4** указаны позиции, в которых консенсусные последовательности неструктурных белков ВИЧ-1 отдельных регионов России отличались от референсных последовательностей.

Консенсусы белка Vpr вариантов вирусов, циркулирующих в анализируемых регионах, не содержали замен относительно референсных. В связи с этим срав-

нительный анализ вторичной структуры белка Vpr в дальнейшем исследовании не проводили.

Результаты прогнозирования вторичных структур референсных последовательностей анализируемых белков ВИЧ-1 представлены в **табл. 5**.

Аналогичным образом были спрогнозированы вторичные структуры консенсусных последовательностей неструктурных белков вариантов ВИЧ-1 суб-суб-типа А6, циркулирующих в анализируемых регионах России.

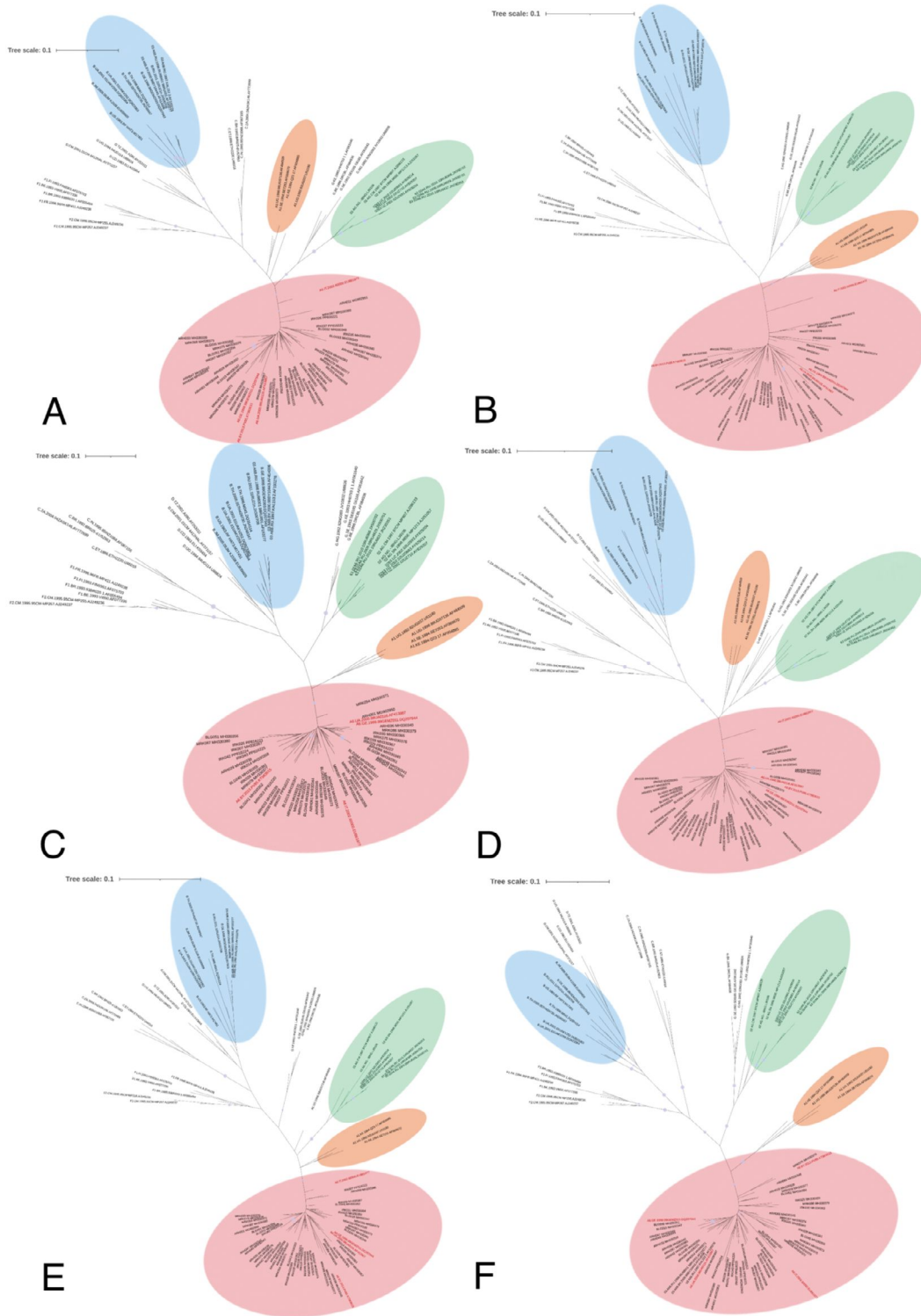


Рис. 1. Филогенетический анализ полученных последовательностей: *tat* (A), *rev* (B), *vpu* (C), *vif* (D), *vpr* (E), *nef* (F).

Цветом на филогенетических деревьях отмечены кластеры наиболее характерных для территории РФ генетических вариантов ВИЧ-1: розовым цветом – ВИЧ-1 суб-субтипа А6, голубым – субтипа В, салатовым – циркулирующих рекомбинантных форм CRF02_AG и CRF63_02A6; также отмечен кластер, образованный референсными последовательностями ВИЧ-1 суб-субтипа А1. Внутри кластера ВИЧ-1 суб-субтипа А6 референсные последовательности обозначены красным цветом, исследуемые последовательности – черным цветом; все остальные кластеры ВИЧ-1 других генетических вариантов (А1, С, D, F1, F2, G) включают исключительно референсные последовательности (HIV Databases (lanl.gov)).

Fig. 1. Phylogenetic analysis of the obtained sequences: *tat* (A), *rev* (B), *vpu* (C), *vif* (D), *vpr* (E), *nef* (F).

Clusters of the most typical HIV-1 genetic variants for the territory of the Russian Federation are marked in color on the phylogenetic trees: pink – HIV-1 sub-subtype A6, blue – subtype B, light green – circulating recombinant forms CRF02_AG and CRF63_02A6; a cluster formed by the reference sequences of HIV-1 sub-subtype A1 is also marked. Within the HIV-1 sub-subtype A6 cluster, the reference sequences are shown in red, the studied sequences are shown in black; all other clusters of HIV-1 of other genetic variants (A1, C, D, F1, F2, G) include exclusively reference sequences (HIV Databases (lanl.gov)).

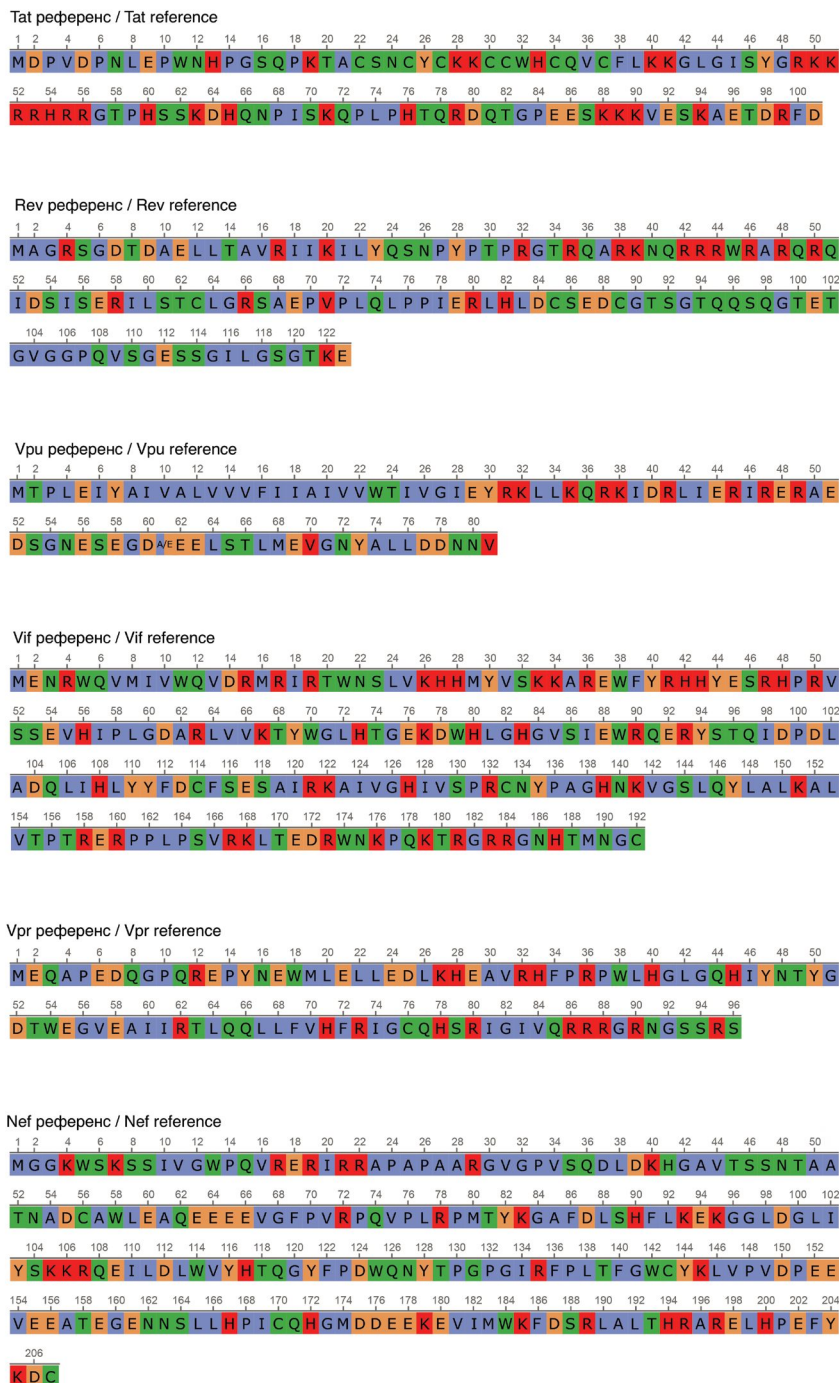


Рис. 2. Референсные последовательности белков Tat, Rev, Vpr, Vif, Vpr, Nef.

Неполярные аминокислоты: G (глицин), A (аланин), V (валин), L (лейцин), I (изолейцин), P (пролин), M (метионин) и F (фенилаланин) – отмечены синим цветом; полярные незаряженные, нейтральные, аминокислоты: S (серин), T (треонин), C (цистеин), N (аспарагин), Q (глутамин) и W (триптофан) – зеленым; полярные кислые, отрицательно заряженные, аминокислоты: D (аспарагиновая кислота) и E (глутаминовая кислота), Y (тирозин) – оранжевым; полярные основные, положительно заряженные, аминокислоты: K (лизин), R (аргинин) и H (гистидин) – красным [16].

Fig. 2. Reference sequences of the proteins Tat, Rev, Vpr, Vif, Vpr, Nef.

Non-polar amino acids: G (glycine), A (alanine), V (valine), L (leucine), I (isoleucine), P (proline), M (methionine) and F (phenylalanine), – are marked in blue; Polar uncharged, neutral, amino acids: S (serine), T (threonine), C (cysteine), N (asparagine), Q (glutamine) and W (tryptophan) – green; polar acidic, negatively charged, amino acids: D (aspartic acid) and E (glutamic acid), Y (tyrosine) – orange; polar basic, positively charged amino acids: K (lysine), R (arginine) and H (histidine) [16].

При сравнительном анализе спрогнозированных вторичных структур консенсусных последовательностей с референсными были обнаружены следующие отличия:

- для варианта белка Tat, характерного для ВИЧ-1 суб-субтипа А6 в Амурской области, содержащего замены Р68L и R99P, выявлено смещение расположения спирали из положения 86–95 в положение 85–94;

- для варианта белка Vif, характерного для ВИЧ-1 суб-субтипа А6 в Амурской области, – смещение расположения цепи из положения 38–41 в положение 39–41. При этом для вариантов белка Vif ВИЧ-1 суб-субтипа А6, циркулирующих в г. Архангельске,

Мурманске и Иркутске, было отмечено смещение расположения цепи из положения 38–41 в положение 38–39. Дополнительно для белка Vif, характерного для вариантов вируса в г. Мурманске, установлено смещение цепи из положения 93–97 в положение 94–97, а для белка Vif, характерного для вариантов вируса в г. Архангельске, – отсутствие структуры цепи в положении 128–129;

- для вариантов белка Nef, характерного для ВИЧ-1 суб-субтипа А6 в г. Архангельске, Мурманске и Иркутске, – смещение элемента спирали из положении 13–21 в 14–21. Дополнительно для варианта белка Nef вируса, характерного для г. Архангельска,

Таблица 4. Аминокислотные замены в консенсусных последовательностях неструктурных белков вариантов вирусов, циркулирующих в Амурской области, г. Архангельске, Мурманске, Иркутске, относительно референсных последовательностей*

Table 4. Amino acid substitutions in the consensus sequences of non-structural proteins of virus variants circulating in the Amur Region, Arkhangel'sk, Murmansk, and Irkutsk, relative to the reference sequences*

Белок ВИЧ-1 HIV-1 protein	Амурская область Amur region	Архангельск Arkhangel'sk	Мурманск Murmansk	Иркутск Irkutsk
Tat	P68L, R99P/R	–	–	P68L
Rev	K39R	K39R, A68E , V109I	K39R, V109I	–
Vpu	F16S/A	F16F/S/A	L33V	Y73L
Vif	F39V	E37G , R50K, E92E/K , V125V/L	E37G , R50K, E92R , I98I/V, H127Q	E37G , R50K/R
Vpr	–	–	–	–
Nef	I10I/L, K179R	R29T , Y82F , E152E/S , K179R	R29T , I134I/E , Y144Y/F , E152D, K179R, T193T/K	R29P/T , G84A, F136Y , K179R, T193K

Примечание. *R99P/R обозначает, что в консенсусной последовательности с равной вероятностью в позиции встречались аминокислоты Р и R. Жирным шрифтом выделены замены, ассоциированные с изменениями свойств аминокислот: заряженная/незаряженная, полярная/неполярная.

Note. *R99P/R indicates that the consensus sequence contained amino acids P and R with equal probability at the position. Substitutions associated with changes in the properties of amino acids, charged/uncharged or polar/non-polar, are highlighted in bold.

Таблица 5. Спрогнозированное расположение элементов спиралей и цепей во вторичных структурах референсных последовательностей неструктурных белков ВИЧ-1

Table 5. Predicted arrangement of helical and strand elements in secondary structures of reference sequences of HIV-1 nonstructural proteins

Тип вторичной структуры Secondary structure type	Tat (позиция АК / a.a. position)	Rev (позиция АК / a.a. position)	Vpu (позиция АК / a.a. position)	Vif (позиция АК / a.a. position)	Nef (позиция АК / a.a. position)
Спираль / Helix	32–33, 36–39, 86–95	9–24, 35–61	3–52, 61–70	15–31, 78–80, 100–110, 117–124, 145–153	13–21, 38–40, 50–51, 57–66, 82–94, 106–110, 151–156, 168–171, 188–192, 196–199, 201–204
Цепь / Strand	–	–	–	4–13, 38–41, 50–59, 63–69, 85–91, 93–97, 128–129	102–104, 111–118, 142–148, 181–186

смещение элемента спирали из положения 57–66 в положение 56–66.

Обсуждение

В настоящее время в России регулярно проводятся исследования гена *pol* ВИЧ-1 как у вариантов вирусов, циркулирующих в отдельных регионах [17–19], так и в целом по стране [11, 12, 20]. Это объясняется тем, что для лечения ВИЧ-инфекции в основном используются ингибиторы вирусных ферментов – интегразы, протеазы и обратной транскриптазы, которые кодируются геном *pol* [1, 15]. Соответственно, в гене *pol* возникает большинство мутаций лекарственной устойчивости к антиретровирусным препаратам, и изучение этой области генома регламентировано нормативными документами в клинической практике. Гены неструктурных белков находятся за пределами анализируемой области генома, и вариабельность неструктурных белков вариантов вируса, циркулирующих в разных регионах страны, остается неизученной. В недавно проведенном нами исследовании было показано, что в некоторых участках белка Tat у вариантов ВИЧ-1 суб-субтипа А6, циркулирующих на территории Московской области, консервативность меньше, чем в общей популяции вариантов ВИЧ-1 суб-субтипа А6 [21].

В основу настоящего исследования было положено предположение о существующей вариабельности неструктурных белков у вариантов ВИЧ-1 суб-субтипа А6, циркулирующих в разных регионах нашей страны. Были проанализированы последовательности неструктурных белков вариантов ВИЧ-1 суб-субтипа А6, полученные в результате анализа клинических образцов цельной крови наивных пациентов, т.е. ранее не получавших АРТ, в период 2012–2014 гг. Пациенты находились под наблюдением в центрах СПИДа Амурской области, г. Архангельска, Мурманска и Иркутска (табл. 1).

При формировании консенсусных последовательностей для каждого неструктурного белка ВИЧ-1 были отмечены последовательности, содержащие делеции/инсерции (табл. 3), при этом в белке Vif только одна последовательность (PP816224) содержала делецию – del109–115, а наибольшее число делеций/инсерций анализируемые последовательности содержали в белке Nef (табл. 3). Такой результат может быть объяснен тем, что основной функцией белка Vif является противодействие клеточному белку APOBEG3G, тогда как белок Nef обладает многочисленными видами деятельности и контактирует с большим количеством белков клетки-хозяина, что, соответственно, предполагает наличие более гибкой структуры [1].

Референсные последовательности неструктурных белков ВИЧ-1 суб-субтипа А6 формировали на основе 235 полногеномных последовательностей, загруженных из международной базы данных Los Alamos.

Сформированная референсная последовательность белка Tat в положении 54 и 60 содержала гистидин (H), в положении 57 – глицин (G), а также мотив ⁷⁸QRD⁸⁰, характерные для ВИЧ-1 суб-субтипа А6 [21, 22].

Сформированная референсная последовательность белка Rev в положении 41 содержала глутамин (Q) и после положения 95 – мотив QSQGTET, характерные для ВИЧ-1 суб-субтипа А6 [23].

Сформированная референсная последовательность белка Vpr относительно ранее опубликованной последовательности Vpr суб-субтипа А6 в положении 73 вместо лейцина (L) содержала тирозин (Y) [24].

Референсные последовательности белков Vif, Vpr и Nef ВИЧ-1 суб-субтипа А6 были сформированы и представлены впервые.

Несмотря на характерную для белка Vpr вариабельность в СООН-концевой области, о которой сообщалось ранее, консенсусные последовательности белка Vpr из разных регионов РФ не содержали замен относительно референсной последовательности [25].

Консенсусные последовательности белков Tat, Rev, Vpr, Vif и Nef отличались от референсных последовательностей и различались между собой наличием характерных аминокислотных замен. Некоторые из выявленных аминокислотных замен были ассоциированы с изменением химических свойств аминокислот, при этом для белков Tat, Vif и Nef были обнаружены изменения во вторичной структуре белка относительно референсных последовательностей.

Полученные результаты указывают на существование различий в неструктурных белках у вариантов ВИЧ-1 суб-субтипа А6, циркулирующих в разных регионах Российской Федерации, что может быть объяснено «эффектом основателя».

Проведенное исследование имеет ограничение, связанное с небольшой выборкой анализируемых последовательностей. Для подтверждения полученных результатов необходимо проведение дальнейшего ряда исследований полиморфизма неструктурных белков вариантов ВИЧ-1 суб-субтипа А6, циркулирующих в разных регионах страны.

Заключение

Впервые проведен сравнительный анализ консенсусных последовательностей неструктурных белков вариантов ВИЧ-1 суб-субтипа А6, циркулирующих в разных регионах Российской Федерации. В процессе исследования впервые были получены и представлены референсные последовательности белков Vif, Vpr и Nef ВИЧ-1 суб-субтипа А6. Белок Vpr определен как наиболее консервативный. В целом полученные результаты свидетельствуют о присутствующих особенностях в неструктурных белках вариантов ВИЧ-1 суб-субтипа А6 в разных регионах России.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кузнецова А.И. Роль полиморфизма ВИЧ-1 в патогенезе заболевания. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2023; 15(3): 26–37. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2023-15-3-26-37> <https://elibrary.ru/cwjjai>
2. Frahm N., Korber B.T., Adams C.M., Szinger J.J., Draenert R., Addo M.M., et al. Consistent cytotoxic-T-lymphocyte targeting of immunodominant regions in human immunodeficiency virus across multiple ethnicities. *J. Virol.* 2004; 78(5): 2187–200. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.5.2187-2200.2004>
3. Mothe B., Hu X., Llano A., Rosati M., Olvera A., Kulkarni V., et al. A human immune data-informed vaccine concept elicits strong and broad T-cell specificities associated with HIV-1 control in mice and macaques. *J. Transl. Med.* 2015; 13: 60. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0392-5>
4. Frahm N., Kiepiela P., Adams S., Linde C.H., Hewitt H.S., Sango K., et al. Control of human immunodeficiency virus replication by cytotoxic T lymphocytes targeting subdominant epitopes. *Nat. Immunol.* 2006; 7(2): 173–8. <https://doi.org/10.1038/ni1281>
5. Sgadari C., Monini P., Tripiciano A., Picconi O., Casabianca A., Orlandi C., et al. Continued decay of HIV proviral DNA upon vaccination with HIV-1 Tat of subjects on long-term ART: An 8-year follow-up study. *Front. Immunol.* 2019; 10: 233. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00233>
6. Kardani K., Hashemi A., Bolhassani A. Comparison of HIV-1 Vif and Vpr accessory proteins for delivery of polypeptide constructs harboring Nef, Gp160 and P24 using various cell penetrating peptides. *PLoS One.* 2019; 14(10): e0223844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223844>
7. Kardani K., Hashemi A., Bolhassani A. Comparative analysis of two HIV-1 multiepitope polypeptides for stimulation of immune responses in BALB/c mice. *Mol. Immunol.* 2020; 119: 106–22. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.01.013>
8. Sadeghi L., Bolhassani A., Mohit E., Baesi K., Aghasadeghi M.R. Heterologous DNA prime/protein boost immunization targeting Nef-Tat fusion antigen induces potent T-cell activity and in vitro anti-SCR HIV-1 effects. *Curr. HIV Res.* 2024; 22(2): 109–19. <https://doi.org/10.2174/011570162X297602240430142231>
9. Лаповок И.А., Лопатухин А.Э., Киреев Д.Е., Казеннова Е.В., Лебедев А.В., Бобкова М.Р. и др. Молекулярно-эпидемиологический анализ вариантов ВИЧ-1, циркулировавших в России в 1987–2015 гг. *Терапевтический архив*. 2017; 89(11): 44–9. <https://doi.org/10.17116/terarkh2017891144-49> <https://elibrary.ru/zwosol>
10. Адамов Р.Р., Антонова А.А., Огаркова Д.А., Кузнецова А.И., Почтовый А.А., Клейменов Д.А. и др. ВИЧ-инфекция в Российской Федерации: современные тенденции диагностики. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2024; 16(1): 45–59. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2024-16-1-45-59> <https://elibrary.ru/rllhujr>
11. Антонова А.А., Кузнецова А.И., Ожмегова Е.Н., Лебедев А.В., Казеннова Е.В., Ким К.В. и др. Генетическое разнообразие ВИЧ-1 на современном этапе эпидемии в Российской Федерации: увеличение распространенности рекомбинантных форм. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2023; 15(3): 61–72. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2023-15-3-61-72> <https://elibrary.ru/tpwttt>
12. Antonova A., Kazennova E., Lebedev A., Ozhmegova E., Kuznetsova A., Tumanov A., et al. Recombinant forms of HIV-1 in the last decade of the epidemic in the Russian Federation. *Viruses*. 2023; 15(12): 2312. <https://doi.org/10.3390/v15122312>
13. Гришина Е.А. Особенности географического положения Российской Федерации. Теория и практика решения сложных заданий ГИА по географии. *Вестник науки и образования*. 2019; (6-1): 38–42. <https://elibrary.ru/zbmuep>
14. Ившина И.Н. Многонациональность и многоконфессиональность как социально-культурные предпосылки Федерализации России. *Вестник МГПУ. Серия: Юридические науки*. 2018; (4): 19–24. <https://doi.org/10.25688/2076-9113.2018.32.4.02> <https://elibrary.ru/ypwurf>
15. Рубриктор КР. Клинические рекомендации. ВИЧ-инфекция у взрослых. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/79_1
16. Якубке Х.Д., Ешкайт Х. *Аминокислоты. Пептиды. Белки*. М.: Мир; 1985.
17. Щемелев А.Н., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Найденова Е.В., Зуева Е.Б., Валутите Д.Э. и др. Генетическое разнообразие вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) в Калининградской

- области. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(4): 310–21. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-119> <https://elibrary.ru/bkswno>
18. Lebedev A., Lebedeva N., Moskalychik F., Pronin A., Kazennova E., Bobkova M. Human immunodeficiency virus-1 diversity in the Moscow Region, Russia: Phylodynamics of the most common subtypes. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 320. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00320>
 19. Антонова А.А., Туманов А.С., Лебедев А.В., Казеннова Е.В., Глинкина Л.Н., Кулагин В.В. и др. Генетический профиль и характеристика мутаций лекарственной устойчивости ВИЧ-1 на территории Краснодарского края в период 2014–2019 гг. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2022; 14(2): 20–30. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2022-14-2-20-30> <https://elibrary.ru/vzklej>
 20. Kirichenko A., Kireev D., Lapovok I., Shlykova A., Lopatukhin A., Pokrovskaya A., et al. HIV-1 drug resistance among treatment-naïve patients in Russia: analysis of the national database, 2006–2022. *Viruses*. 2023; 15(4): 991. <https://doi.org/10.3390/v15040991>
 21. Kuznetsova A., Kim K., Tumanov A., Munchak I., Antonova A., Lebedev A., et al. Features of Tat protein in HIV-1 sub-subtype A6 variants circulating in the Moscow region, Russia. *Viruses*. 2023; 15(11): 2212. <https://doi.org/10.3390/v15112212>
 22. Кузнецова А.И., Громов К.Б., Киреев Д.Е., Шлыкова А.В., Лопатухин А.Э., Казеннова Е.В. и др. Анализ особенностей белка Tat вируса иммунодефицита человека 1 типа суб-субтипа А6 (Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(6): 452–63. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-83> <https://elibrary.ru/cmzgyz>
 23. Lebedev A., Kim K., Ozhmegova E., Antonova A., Kazennova E., Tumanov A., et al. Rev protein diversity in HIV-1 group M clades. *Viruses*. 2024; 16(5): 759. <https://doi.org/10.3390/v16050759>
 24. Антонова А.А., Лебедев А.В., Казеннова Е.В., Ким К.В., Ожмегова Е.Н., Туманов А.С. и др. Вариабельность белка VPU ВИЧ-1 суб-субтипа А6 у пациентов с различными стадиями ВИЧ-инфекции. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2024; 16(2): 40–50. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2024-16-2-40-50> <https://elibrary.ru/lpjxqk>
 25. Лаповок И.А. *Анализ полиморфизма неструктурных областей генома варианта ВИЧ-1, доминирующего в России*: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М.; 2009. <https://elibrary.ru/nkranl>
- ### REFERENCES
1. Kuznetsova A.I. The role of HIV-1 polymorphism in the pathogenesis of the disease. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2023; 15(3): 26–37. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2023-15-3-26-37> <https://elibrary.ru/cwjjai> (in Russian)
 2. Frahm N., Korber B.T., Adams C.M., Szinger J.J., Draenert R., Addo M.M., et al. Consistent cytotoxic-T-lymphocyte targeting of immunodominant regions in human immunodeficiency virus across multiple ethnicities. *J. Virol.* 2004; 78(5): 2187–200. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.5.2187-2200.2004>
 3. Mothe B., Hu X., Llano A., Rosati M., Olvera A., Kulkarni V., et al. A human immune data-informed vaccine concept elicits strong and broad T-cell specificities associated with HIV-1 control in mice and macaques. *J. Transl. Med.* 2015; 13: 60. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0392-5>
 4. Frahm N., Kiepiela P., Adams S., Linde C.H., Hewitt H.S., Sango K., et al. Control of human immunodeficiency virus replication by cytotoxic T lymphocytes targeting subdominant epitopes. *Nat. Immunol.* 2006; 7(2): 173–8. <https://doi.org/10.1038/ni1281>
 5. Sgadari C., Monini P., Tripiciano A., Picconi O., Casabianca A., Orlandi C., et al. Continued decay of HIV proviral DNA upon vaccination with HIV-1 Tat of subjects on long-term ART: An 8-year follow-up study. *Front. Immunol.* 2019; 10: 233. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00233>
 6. Kardani K., Hashemi A., Bolhassani A. Comparison of HIV-1 Vif and Vpu accessory proteins for delivery of polypeptide constructs harboring Nef, Gp160 and P24 using various cell penetrating peptides. *PLoS One*. 2019; 14(10): e0223844. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223844>
 7. Kardani K., Hashemi A., Bolhassani A. Comparative analysis of two HIV-1 multi-epitope polypeptides for stimulation of immune responses in BALB/c mice. *Mol. Immunol.* 2020; 119: 106–22. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2020.01.013>
 8. Sadeghi L., Bolhassani A., Mohit E., Baesi K., Aghasadeghi M.R. Heterologous DNA prime/protein boost immunization targeting Nef-Tat fusion antigen induces potent T-cell activity and in vitro anti-SCR HIV-1 effects. *Curr. HIV Res.* 2024; 22(2): 109–19. <https://doi.org/10.2174/011570162X297602240430142231>
 9. Lapovok I.A., Lopatukhin A.E., Kireev D.E., Kazennova E.V., Lebedev A.V., Bobkova M.R., et al. Molecular epidemiological analysis of HIV-1 variants circulating in Russia in 1987–2015. *Terapevticheskiy arkhiv*. 2017; 89(11): 44–9. <https://doi.org/10.17116/terarkh2017891144-49> <https://elibrary.ru/zwsol> (in Russian)
 10. Adgamon R.R., Antonova A.A., Ogarkova D.A., Kuznetsova A.I., Pochtovyi A.A., Kleimenov D.A., et al. HIV-infection in the Russian Federation: current diagnostic trends. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2024; 16(1): 45–59. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2024-16-1-45-59> <https://elibrary.ru/rlhujr> (in Russian)
 11. Antonova A.A., Kuznetsova A.I., Ozhmegova E.N., Lebedev A.V., Kazennova E.V., Kim K.V., et al. Genetic diversity of HIV-1 at the current stage of the epidemic in the Russian Federation: an increase in the prevalence of recombinant forms. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2023; 15(3): 61–72. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2023-15-3-61-72> <https://elibrary.ru/tpwttn> (in Russian)
 12. Antonova A., Kazennova E., Lebedev A., Ozhmegova E., Kuznetsova A., Tumanov A., et al. Recombinant forms of HIV-1 in the last decade of the epidemic in the Russian Federation. *Viruses*. 2023; 15(12): 2312. <https://doi.org/10.3390/v15122312>
 13. Grishina E.A. Features of the geographical position of the Russian Federation. Theory and practice of solving complex tasks of the State Final Attestation in Geography. *Vestnik nauki i obrazovaniya*. 2019; (6-1): 38–42. <https://elibrary.ru/zbmuep> (in Russian)
 14. Ivshina I.N. Multi-nationality and multi-religiousness as social and cultural prerequisites for the federalization of Russia. *Vestnik MGPU. Seriya: Yuridicheskie nauki*. 2018; (4): 19–24. <https://doi.org/10.25688/2076-9113.2018.32.4.02> <https://elibrary.ru/ypwufw> (in Russian)
 15. The Rubricator of Clinical Recommendations. Clinical guidelines. HIV infection in adults. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/79_1 (in Russian)
 16. Yakubke Kh.D., Eshkait Kh. *Amino acids. Peptides. Proteins [Aminokisloty. Peptidy. Belki]*. Moscow: Mir; 1985. (in Russian)
 17. Shchemelev A.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Naidenova E.V., Zueva E.B., Valutite D.E., et al. Genetic diversity of the human immunodeficiency virus (HIV-1) in the Kaliningrad region. *Voprosy virusologii*. 2022; 67(4): 310–21. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-119> <https://elibrary.ru/bkswno> (in Russian)
 18. Lebedev A., Lebedeva N., Moskalychik F., Pronin A., Kazennova E., Bobkova M. Human immunodeficiency virus-1 diversity in the Moscow Region, Russia: Phylodynamics of the most common subtypes. *Front. Microbiol.* 2019; 10: 320. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00320>
 19. Antonova A.A., Tumanov A.S., Lebedev A.V., Kazennova E.V., Glinkina L.N., Kulagin V.V., et al. Genetic profile and characteristics of HIV-1 drug resistance mutation in the Krasnodar region over the 2014 to 2019. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2022; 14(2): 20–30. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2022-14-2-20-30> <https://elibrary.ru/vzklej> (in Russian)
 20. Kirichenko A., Kireev D., Lapovok I., Shlykova A., Lopatukhin A., Pokrovskaya A., et al. HIV-1 drug resistance among treatment-naïve patients in Russia: analysis of the national database, 2006–2022. *Viruses*. 2023; 15(4): 991. <https://doi.org/10.3390/v15040991>
 21. Kuznetsova A., Kim K., Tumanov A., Munchak I., Antonova A., Lebedev A., et al. Features of Tat protein in HIV-1 sub-subtype A6 variants circulating in the Moscow region, Russia. *Viruses*. 2023; 15(11): 2212. <https://doi.org/10.3390/v15112212>
 22. Kuznetsova A.I., Gromov K.B., Kireev D.E., Shlykova A.V., Lopatukhin A.E., Kazennova E.V., et al. Analysis of tat protein characteristics in human immunodeficiency virus type 1 sub-subtype A6 (Retroviridae: Orthoretrovirinae: lentivirus: human immunodeficiency virus-1). *Voprosy virusologii*. 2021; 66(6): 452–63. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-83> <https://elibrary.ru/cmzgyz> (in Russian)
 23. Lebedev A., Kim K., Ozhmegova E., Antonova A., Kazennova E., Tumanov A., et al. Rev protein diversity in HIV-1 group M clades. *Viruses*. 2024; 16(5): 759. <https://doi.org/10.3390/v16050759>
 24. Antonova A.A., Lebedev A.V., Kazennova E.V., Kim K.V., Ozhmegova E.N., Tumanov A.S., et al. Variability of VPU protein in

HIV-1 sub-subtype A6 in patients with different stages of HIV infection. *VICH-infektsiya i immunosupressii*. 2024; 16(2): 40–50. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2024-16-2-40-50> <https://elibrary.ru/lpjxqk> (in Russian)

25. Lapovok I.A. *Analysis of polymorphism of non-structural regions in the genome of the HIV-1 variant dominant in Russia*: Diss. Moscow; 2009. <https://elibrary.ru/nkranl> (in Russian)

Информация об авторах:

Антонова Анастасия Александровна – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории вирусов лейкозов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: anastaseika95@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9180-9846>

Лебедев Алексей Владимирович – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории вирусов лейкозов института вирусологии им. Д.И. Иванковского, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Москва, Россия. E-mail: lebedevalesha236@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-6787-9345>

Ожмегова Екатерина Никитична – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории вирусов лейкозов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: belokopytova.01@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3110-0843>

Шлыкова Анастасия Вениаминовна – научный сотрудник лаборатории диагностики и молекулярной эпидемиологии ВИЧ-инфекции, Центральный НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: murzakova_a.v@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1390-8021>

Лаповок Илья Андреевич – канд. биол. наук, старший научный сотрудник, Центральный НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: i_lapovok@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6328-1415>

Кузнецова Анна Игоревна ✉ – канд. биол. наук, заведующая лабораторией вирусов лейкозов, ведущий научный сотрудник института вирусологии им. Д.И. Иванковского, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Москва, Россия. E-mail: a-myznikova@list.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5299-3081>

Участие авторов: Антонова А.А. – анализ и интерпретация данных, подготовка текста, одобрение окончательного варианта статьи для публикации; Лебедев А.В. – анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Ожмегова Е.Н. – анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Шлыкова А.В. – проведение экспериментов и подготовка текста; Лаповок И.А. – проведение экспериментов и подготовка текста; Кузнецова А.И. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста, одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

Поступила 30.08.2024
Принята в печать 16.10.2024
Опубликована 31.10.2024

Information about the authors:

Anastasiia A. Antonova – PhD in Biology, Researcher, Laboratory of T-lymphotropic viruses, Ivanovsky Institute of virology, Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. E-mail: anastaseika95@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9180-9846>

Aleksey V. Lebedev – PhD in Biology, Researcher, Laboratory of T-lymphotropic viruses, Ivanovsky Institute of virology, Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. E-mail: lebedevalesha236@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-6787-9345>

Ekaterina N. Ozhmegova – PhD in Biology, Researcher, Laboratory of T-lymphotropic viruses, Ivanovsky Institute of virology, Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. E-mail: belokopytova.01@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3110-0843>

Anastasiia V. Shlykova – Researcher, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia. E-mail: murzakova_a.v@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1390-8021>

Ilya A. Lapavok – PhD in Biology, Senior researcher, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia. E-mail: murzakova_a.v@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1390-8021>

Anna I. Kuznetsova ✉ – PhD in Biology, Leading Researcher, Head of Laboratory of T-lymphotropic viruses, D.I. Ivanovsky Institute of Virology of National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: a-myznikova@list.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5299-3081>

Contribution: Antonova A.A. – analysis and interpretation of the data, preparing of the text, final approval of the article for publication; Lebedev A.V. – analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Ozhmegova E.N. – analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Shlykova A.V. – conducting of the experiments and preparing of the text; Lapavok I.A. – conducting of the experiments and preparing of the text; Kuznetsova A.I. – the study concept and design, analysis and interpretation of the data, preparing of the text, final approval of the article for publication.

Received 30 August 2024
Accepted 16 October 2024
Published 31 October 2024

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-263>

© ЧЕРНЫШЕВ Р.С., ИГОЛКИН А.С., ЗИНЯКОВ Н.Г., ЧВАЛА И.А., 2024



Сравнительный анализ полногеномных последовательностей изолятов вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus*), выделенных на территории левобережья Днепра в 2023 году

Чернышев Р.С.✉, Иголкин А.С., Зиняков Н.Г., Чвала И.А.

ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», 600901, г. Владимир, Россия

Резюме

Введение. Отсутствие данных о полногеномных последовательностях возбудителя африканской чумы свиней (АЧС), циркулирующего на территории левобережья Днепра, ограничивает понимание динамики молекулярной эволюции вируса и характера развития текущего эпизоотического процесса в центральной России и Украине. Определение степени генетической дивергентности и филогенетического родства вируса АЧС во многом может скорректировать стратегию общей и специфической профилактики болезни.

Цель работы – поиск и описание уникальных точечных мутаций (делеций/инсерций/замен) у изолятов, выделенных от домашних свиней на территории Донецкого, Луганского и Запорожского регионов в 2023 г.; установление родства и уровня гомологии с референтными штаммами вируса АЧС генотипа II; субгеномирование на основе маркерных областей генома.

Материалы и методы. В качестве образцов использовали культуральную суспензию костного мозга свиньи, содержащую вирус АЧС. Подготовку геномной ДНК выполняли методом очистки и концентрирования вируса с последующей экстракцией тотальной нуклеиновой кислоты фенол-хлороформным методом. Процесс высокопроизводительного секвенирования осуществляли с помощью технологии MGI. Сборку консенсусных последовательностей проводили методом картирования прочтений на референс-геном штамма Georgia 2007/1.

Результаты. Все изоляты отнесены к генотипу II, имеют монофилетическое происхождение, филогенетически относятся к кластерам «Европа» (4/5) и «Брянск 2021» (1/5), а также являются дивергентными от исходных родительских генетических вариантов, составляющих укрупненные клады. Кроме того, обнаружены многочисленные замены в локусах мультигенного семейства *MGF 110*, *505* и *360*, кодирующих факторы вирулентности.

Заключение. На примере изучения филогении показана достоверная для дифференциации вариабельность вируса АЧС генотипа II, происходящего от референс-штамма Georgia 2007/1. Представленные данные обладают теоретической и практической значимостью при усовершенствовании национального и международного надзора за АЧС.

Ключевые слова: африканская чума свиней; левобережье Днепра; Донецкая, Луганская, Запорожская области; полногеномный анализ; однонуклеотидный полиморфизм; молекулярная эпизоотология

Для цитирования: Чернышев Р.С., Иголкин А.С., Зиняков Н.Г., Чвала И.А. Сравнительный анализ полногеномных последовательностей изолятов вируса африканской чумы свиней (*Asfarviridae: Asfivirus*), выделенных на территории левобережья Днепра в 2023 году. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(5): 481–494. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-263> EDN: <https://elibrary.ru/tsiuzd>

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей 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). Протокол исследования одобрен Комиссией по биоэтике ФГБУ «ВНИИЗЖ» (протокол от 15.05.2024 № Dnieper/2024).

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-263>

Comparative analysis of whole-genome sequences of African swine fever virus (Asfarviridae: *Asfivirus*) isolates collected on the territory of the left bank of the Dnieper River in 2023

Roman S. Chernyshev✉, Alexey S. Igolkin, Nikolay G. Zinyakov, Ilya A. Chvala

Federal Centre for Animal Health (ARRIAH), 600901, Vladimir, Russia

Abstract

Introduction. The lack of data on the whole-genome sequences of African swine fever virus (ASFV) variants circulating on the territory of the left bank of the Dnieper River complicates the understanding of the molecular evolution of the virus and the character of the epidemic process development in Russia and Ukraine. Understanding the genetic divergence and phylogenetic relatedness of isolates can largely adjust the strategy of general and specific prevention of the disease. **The aim** of the study – search and description of unique mutations (deletions/insertions/substitutions) in isolates collected from domestic pigs in Donetsk, Luhansk and Zaporozhye regions in 2023; determination of relatedness and level of homology with reference strains of ASFV genotype II; sub-genotyping and clustering of isolates based on whole-genome analysis.

Materials and methods. The samples used were a culture suspension of porcine bone marrow (PBM) cells containing ASFV isolates obtained from pathologic material from domestic pig carcasses. Genomic DNA was prepared by purification and concentration of virus followed by phenol-chloroform extraction of total nucleic acid. The high-throughput sequencing process was performed using MGI technology. Consensus sequences were assembled by mapping reads to the reference genome of strain Georgia 2007/1.

Results. All isolates are assigned to genotype II, have a monophyletic origin, are phylogenetically close to the clusters «Europe» (4/5) and «Bryansk 2021» (1/5), and are divergent from the original parental genetic variants that make up the enlarged clades. In addition, numerous substitutions in the loci of the multigene family *MGF 110*, *505*, and *360*, encoding virulence proteins, were detected in 4 isolates from Donetsk and Zaporozhye regions.

Conclusion. The phylogeny of the genotype II ASFV, which originated from the reference strain Georgia 2007/1, is shown to be sufficient for isolate differentiation. The presented data are of theoretical and practical importance for domestic and international ASFV surveillance.

Keywords: African swine fever; left bank of the Dnieper River; Donetsk, Lugansk, Zaporozhye region; whole-genome analysis; single nucleotide polymorphism; molecular epidemiology

For citation: Chernyshev R.S., Igolkin A.S., Zinyakov N.G., Chvala I.A. Comparative analysis of whole-genome sequences of African swine fever virus (Asfarviridae: *Asfivirus*) isolates collected on the territory of the left bank of the Dnieper River in 2023. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(5): 481–494. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-263> EDN: <https://elibrary.ru/tsiuzd>

Funding. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

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 Federal Centre for Animal Health (ARRIAH) (Protocol N Dnieper/2024 dated 15 May 2024).

Введение

В XXI веке за относительно короткий период времени африканская чума свиней (АЧС) стала мировой проблемой свиноводства. После интродукции вируса АЧС генотипа II из Африки в Грузию (2007 г.) болезнь была зарегистрирована на территории 46 государств Европы и Азии (2007–2024 гг.), Карибского бассейна (Гаити и Доминиканская Республика, 2021 г.), принимая панзоотический характер и нанося серьезный экономический ущерб свиноводческой отрасли и охотничьему сектору не-

благополучных стран и регионов [1]¹. Стремительное трансграничное распространение АЧС способствовало развитию методологии расследования вспышек, альтернативной эпизоотологическому обследованию.

Развитие методов молекулярной биологии (секвенирование) и биоинформатики (филогенетический и эволюционный анализы) значительно повлияло на формирование нового прикладного направления – молекулярной эпизоотологии, изучающего закономерности возникновения и циркуляции генетических вариантов и групп возбудителей инфекционных болезней живот-

¹Россельхознадзор. Эпизоотическая ситуация по АЧС на территории Российской Федерации, в странах Европы, Азии и Америки. Данные ВОЗЖ с 2007 по 2023 г.; 2023. Available at: https://fsvps.gov.ru/wp-content/uploads/2023/06/05_АЧС_2007_2023_мир.png



Рис. 1. Распространение АЧС на территории Украины (2012–2024 гг.).

Fig. 1. Spread of ASF in Ukraine (2012–2024).

ных [2]. В этом отношении пространственно-временная филогеномика является эффективным инструментом внутреннего и международного надзора за АЧС.

На евроазиатском континенте наблюдался медленный темп ($1,14 \times 10^{-5}$ замен/сайт/год) мутаций вируса АЧС, ограничивающий проведение кластеризации [3]. Так, отмечена генетическая однородность изолятов, выделенных в 2007–2011 гг. на территории Северо-Кавказского, Южного и Северо-Западного федеральных округов Российской Федерации, при исследовании маркерных фрагментов, ранее предложенных для характеристики генотипа I [4]. В связи с этим наиболее предпочтителен полногеномный анализ с высокой разрешающей способностью для обнаружения уникальных единичных изменений и установления филогенетического родства [5]. В работах А. Mazloum и соавт. (2021 г.) продемонстрирована дивергенция между вариантами, циркулирующими в Центральной России и на Кавказе, Восточной Европе и Дальнем Востоке [6].

В результате распространения болезни значительную генетическую сегрегированность друг от друга показали три группы: вирус АЧС, циркулирующий в начале эпизоотии (Грузия, Армения, Азербайджан, Россия до 2019 г., Польша и Литва до 2015 г.); изоля-

ты из стран Балтии, восточной Европы и Германии (Румыния, Польша и Литва с 2016 г., Латвия, Эстония, Киевская область Украины и Калининградская область России); вирус АЧС, выделенный на территории Бельгии, Венгрии, Чехии и Молдовы и восточных стран (Китай, Вьетнам, Республика Корея, Индия, Восточный Тимор, а также Дальневосточный федеральный округ России) [7, 8]. Близкое филогенетическое родство вируса, энзоотичного для европейских и азиатских стран, объясняют предположительным его заносом в Китай (2018 г.) из Западной Европы [9].

С 30.07.2012 территория Украины официально неблагополучна по АЧС. За время эпизоотии (по данным Всемирной организации здравоохранения животных за 21.06.2024) зарегистрировано 620 случаев, из них 487 очагов среди домашних свиней и 133 – среди популяций дикого кабана (рис. 1)². При этом не существует достоверной информации о циркуляции вируса АЧС на Украине и в регионах левобережья Дне-

²Россельхознадзор. Эпизоотическая ситуация по АЧС на территории Украины; 2024. Available at: <https://fsvps.gov.ru/wp-content/uploads/2023/06/АЧС-в-Украине-17.pdf>

Таблица 1. Краткие характеристики образцов, использованных в исследовании**Table 1.** Brief characteristics of samples used in the study

Наименование изолята Isolate name	Дата регистрации вспышки Date of outbreak registration	Место отбора образцов Place of sample collection	Титр вируса в КМС к 3-му пассажу, (Ig ГАдE ₅₀ /см ³ ± SD) Viral load in PBM cells by 3 rd passage (log ₁₀ HAD ₅₀ /ml ± SD)
ASFV/DNR/DP2023/2466-1	22.09.2023	Донецкий регион, г. Волноваха Donetsk region, Volnovakha	8,62 ± 0,21
ASFV/DNR/DP2023/2466-3	21.09.2023	Донецкий регион, Волновашский район, с. Ивановка Donetsk region, Volnovakha district, Ivanovka village	7,95 ± 0,14
ASFV/DNR/DP2023/3343-2	16.10.2023	Донецкий регион, Тельмановский район, п. Андреевка Donetsk region, Telmanovsky district, Andreevka settlement	7,58 ± 0,14
ASFV/Zaporozskaya/DP2023/ 2896-5	01.11.2023	Запорожская область, Бердянский район, с. Чернигово-Токмачанск Zaporozhye region, Berdyansk district, Cher- nigovo-Tokmachansk settlement	8,81 ± 0,21
ASFV/LNR/DP2023/42-1	26.12.2023	Луганский регион, Старобельский район, с. Подгоровка Luhansk region, Starobelsky district, Podgorovka village	7,0 ± 0,14

пра (в Донецкой, Луганской и Запорожской областях). Единственный штамм с установленной нуклеотидной последовательностью генома, выделенный 11.04.2016 (Kyiv/131 2016) в Киевской области Украины, описан Г. Коваленко и соавт. (2019 г.) и причислен к кластеру, характерному для образцов, выявленных на территории Польши [10].

Трудности в понимании молекулярной эволюции вируса АЧС генотипа II в Евразии (2007 г. – наст. время), прежде всего, связаны с недостатком данных секвенирования, что также лимитирует прикладное значение филогенетического и пространственно-временного анализов в ветеринарии. В связи с этим молекулярно-генетические исследования, посвященные поиску новых и подтверждению циркуляции уже охарактеризованных геновариантов вируса во всех административных единицах евроазиатских стран, являются актуальным направлением научных исследований.

Цели исследования – осуществить полногеномное секвенирование и анализ олиго- и однонуклеотидного полиморфизма (ОНП) вируса АЧС, выделенного из биологического материала от домашних свиней, сохранившихся в Донецком, Луганском и Запорожском регионах в 2023 г.; идентифицировать уникальные точечные мутации, позволяющие дифференцировать генетические варианты; установить филогенетическое родство исследуемых изолятов и их принадлежность к субгенотипам.

Материалы и методы

Изоляты вируса АЧС. Образцы патологического материала от павших домашних свиней (мышечная ткань, селезенка, костный мозг) на территории Донецкого, Луганского и Запорожского субъектов

направлялись в референтную лабораторию по АЧС (ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия) с целью подтверждения лабораторного диагноза на АЧС и проведения научно-исследовательской работы (табл. 1). После положительного результата полимеразной цепной реакции в реальном времени из образцов готовили 10% гомогенизированную суспензию, которую использовали для выделения вируса. Идентификацию и накопление изолятов проводили в первичной культуре клеток костного мозга свиньи (КМС) по ранее опубликованному протоколу в титре не менее 6,0 Ig ГАдE₅₀/см³ [11].

Полногеномное ресеквенирование. Пробоподготовку образцов геномной ДНК вируса АЧС (гДНК) и оценку ее качества осуществляли в соответствии с методическими рекомендациями по очистке, концентрированию и выделению генома вируса АЧС и каприпоксвирусов для полногеномного секвенирования³.

Очистку и концентрирование выполняли способом № 1 (среднескоростным центрифугированием при 4 °C и 7000 об/мин в течение 16 ч).

Приготовление библиотеки проводили с использованием набора MGIEasy Universal DNA Library Prep Set (MGI Tech, Китай). Высокопроизводительное секвенирование (HTS) выполняли на платформе DNBSEQ-G400 (MGI Tech) [12].

Сборка и анализ последовательностей. Сборку консенсусной последовательности выполняли методом картирования прочтений на референс-геном штамма

³Мазлум А., Чернышев Р.С., Кротова А.О. и др. Методические рекомендации по очистке, концентрированию и выделению генома вируса африканской чумы свиней и каприпоксвирусов для полногеномного секвенирования. Владимир; 2024.

Georgia 2007/1 (NC_044959.2) с определением контигов в программе Geneious Prime (2024.0.5). Для прогнозирования открытых рамок считывания (ОРС) и аннотации генома использовали утилиту Genome Annotation Transfer Utility (GATU) на платформе Java v. 8 [13]. Множественное выравнивание полученных последовательностей с импортированными из базы данных GenBank (**приложение**) и анализ нуклеотидных изменений (ОНП) проводили с применением алгоритма CLUSTAL W в программе Geneious Prime; трансляцию и выявление аминокислотных изменений – в программе SnapGene v. 5.2.1. Уровень гомологии оценивали на онлайн-платформе NCBI: Nucleotide BLAST. Построение дендрограммы осуществляли в программе Mega X по рекомендованной модели T92 + G + I (BIC = 537644,659; AICc = 535583,3783) методом максимального правдоподобия (Maximum Likelihood) с Bootstrap 100 итерациями начальной загрузки [14].

Субгенотипирование изолятов проводили согласно методическим рекомендациям по молекулярно-эпизоотологической кластеризации вируса АЧС методом субгенотипирования (модификация классификации субгенотипов С. Gallardo и соавт., 2023)⁴ [15].

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 Комиссией по биоэтике ФГБУ «ВНИИЗЖ» (протокол от 15.05.2024 № Dnieper/2024).

Результаты

Оценка качества гДНК и ресеквенирования. Определены спектрофотометрические показатели (отношение поглощений на длинах волн A260/A230 и A260/A280), а также биоинформатические метаданные, представленные на графиках (**рис. 2**).

Как показано на рис. 2, все образцы имели удовлетворительные показатели очистки гДНК от низкомолекулярных соединений, так как A230/A260 \geq 2,0. Однако показатель A260/A280 составлял 1,77–1,80, что меньше рекомендуемого значения (\geq 1,8) и указывает на недостаточную чистоту от белковых примесей. В свою очередь, доля специфичных прочтений находилась в диапазоне от 0,69 до 1,14%, а средняя глубина покрытия – 407–1664 прочтений/нуклеотид, превышая рекомендуемое значение (> 30). Область с низким покрытием у 3 изолятов из Донецкого региона находилась в позициях 187,750 до 189,000 т.п.н. В то время как у ASFV/Zaporozskaya/DP2023/2896-5 – в положении 16,640–18,430 т.п.н. При картировании прочтений на референс-геном штамма Georgia 2007/1 (190,584 т.п.н.) сформировался один длинный контиг в отсутствии скаффолдов для каждого изолята, впо-

следствии составивший консенсусные последовательности длиной от 190,573 до 190,596 т.п.н.

Аналогично штамму Georgia 2007/1 у всех исследуемых геномов идентифицировано 195 ОРС.

По результатам сборки и аннотации генома последовательности депонированы в базу данных VGARus под идентификационными номерами niiz000001-5.

Анализ ОНП. Установлена принадлежность всех изученных изолятов к генотипу II на основании С-терминального фрагмента гена *B646L*.

Множественное полногеномное выравнивание показало наличие одно- и олигонуклеотидного полиморфизма. Отмечены уникальные (вновь выявленные) и охарактеризованные синонимичные и несинонимичные замены, инделы, представленные в **табл. 2**.

Таким образом, у 5 изолятов вируса АЧС выявлено 63 замены (44 транзиции и 19 трансверсий), 14 из которых оказались синонимичными и 38 – несинонимичными, приводящими к изменению аминокислотного состава кодируемого белка; 3 инсерции: 1 – в ОРС, 2 – в межгенных областях; 1 однонуклеотидная делеция в межгенной области.

Десять нуклеотидных замен оказались уникальными для изолятов из Донецкой области, 6 из них содержатся в локусах мультигенных семейств *MGF 110*, *360*, *505*. Несинонимичная транзиция А → Г в гене *EP402R*, кодирующем ответственный за сероиммунотипирование гемадсорбирующий гликопротеин CD2v вируса АЧС, зарегистрирована исключительно у ASFV/DNR/DP2023/3343-2.

У вируса АЧС из Запорожской области отмечались многочисленные ранее неохарактеризованные замены в мультигенном семействе *MGF 360* (6 трансверсий и 16 транзиций), которые значительно изменили аминокислотную последовательность одноименных белков. Две одинаковые несинонимичные транзиции Г → А, повторяемые в гене *R298L*, привели к замене аланина (А) на валин (V).

Вирус АЧС, изолированный на территории Луганского региона (ASFV/LNR/DP2023/42-1), имел 9 уникальных замен и 6 ранее характерных только для двух образцов, выделенных от домашних свиней на крупных предприятиях Брянской области в 2021 г. (ASFV/Bryanskaya 2021/DP-18; ASFV/Bryanskaya 2021/DP-8823).

Все 5 исследуемых образцов принадлежали генетическим вариантам (II) с единичными заменами по маркерам *I267L*, *NP419L*, *MGF 505-9R* и *MGF 110-1L*. Во всех 4 генах на выравнивании наблюдались сочетанные мутации, за исключением штамма Odintsovo/WB/Russia/2014 (**рис. 3**).

Анализ ОНП генов *E199L* и *DP60R* не показал корреляции молекулярной эволюции вируса АЧС и пространственно-временного кластерного распространения в связи с регистрацией отличных от штамма Georgia 2007/1 генетических вариантов в отдаленных друг от друга географических областях. Так, замена С → Т в позиции 167062 локуса *E199L* и инсерция А в положении 190116 гена *DP60R* встречалась у ряда изолятов из Польши, Литвы, Китая, Германии, Чехии,

⁴Чернышев Р.С., Мазлум А., Зиняков Н.Г. и др. Методические рекомендации по молекулярно-эпизоотологической кластеризации изолятов вируса африканской чумы свиней методом субгенотипирования. Владимир; 2024.

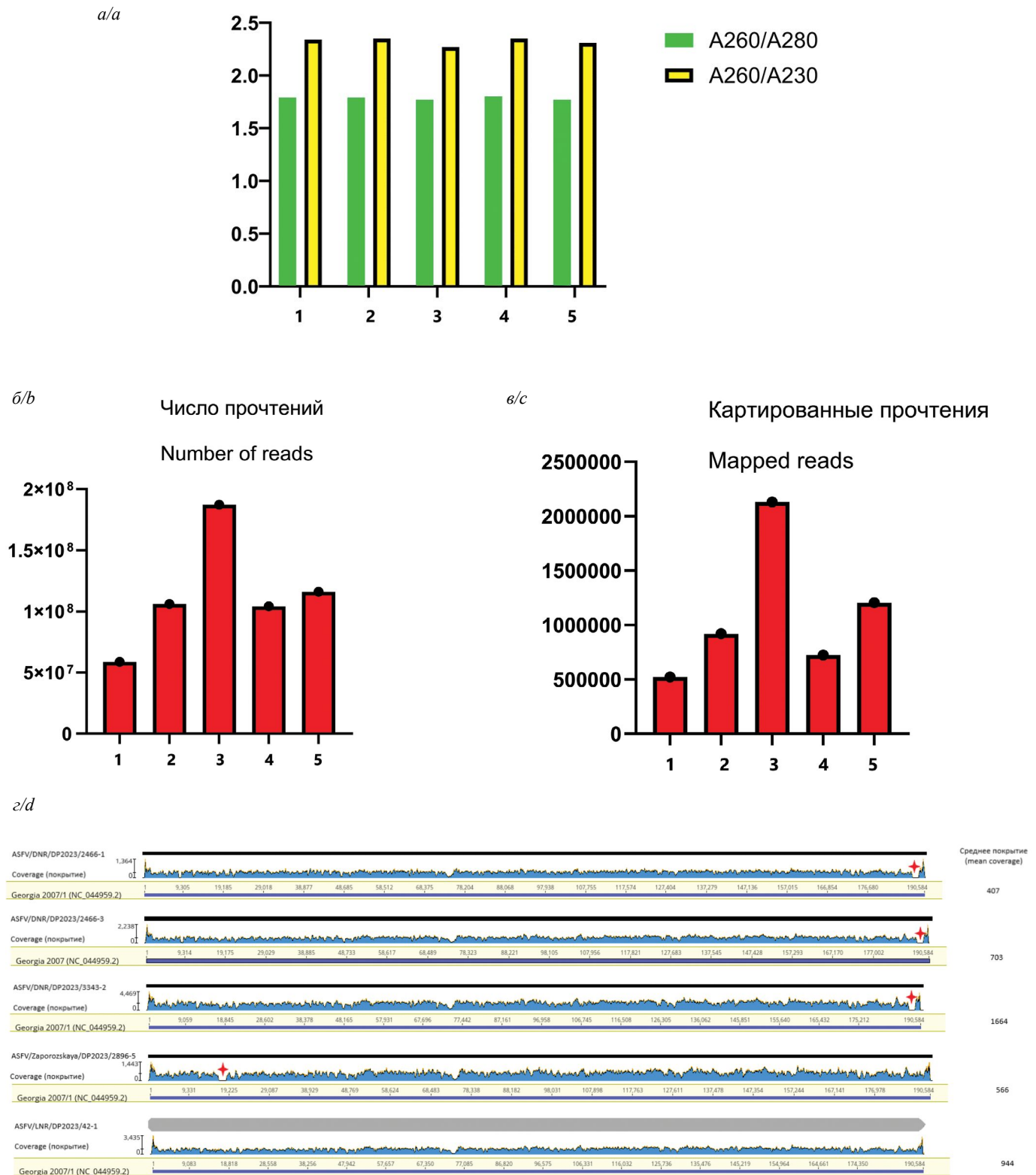


Рис. 2. Спектрофотометрические показатели (а) образцов гДНК и биоинформатические метаданные: число прочтений (б), специфичность прочтений (в), покрытие (г), полученные после ресеквенирования.

Примечание: области с низким покрытием обозначены **+**. 1 – ASFV/DNR/DP2023/2466-1; 2 – ASFV/DNR/DP2023/2466-3; 3 – ASFV/DNR/DP2023/3343-2; 4 – ASFV/Zaporozskaya/DP2023/2896-5; 5 – ASFV/LNR/DP2023/42-1.

Fig. 2. Spectrophotometric indices (a) of gDNA samples and bioinformatic metadata: number of reads (b), specificity of reads (c), coverage (d) obtained after resequencing.

Note: fragments with low coverage are indicated **+**. 1 – ASFV/DNR/DP2023/2466-1; 2 – ASFV/DNR/DP2023/2466-3; 3 – ASFV/DNR/DP2023/3343-2; 4 – ASFV/Zaporozskaya/DP2023/2896-5; 5 – ASFV/LNR/DP2023/42-1.

Таблица 2. Сравнительный анализ точечных мутаций и аминокислотных изменений

Table 2. Comparative analysis of point mutations and amino acid changes

Нуклеотидная позиция Nucleotide position (Georgia 2007/1)	Характер ОНП Type of SNP	Аминокислотная изменчивость Variability of amino acid	Ген/Межгенная область Gene/Intergenic region	Встречаемость Occurrence
1572	T → C	–	Межгенная область Intergenic region	ASFV/DNR/DP2023/2466-1 ASFV/DNR/DP2023/2466-3 ASFV/DNR/DP2023/3343-2
1587	T → C	–	Межгенная область Intergenic region	ASFV/DNR/DP2023/2466-1 ASFV/DNR/DP2023/2466-3 ASFV/DNR/DP2023/3343-2
1611	A → T	–	Межгенная область Intergenic region	ASFV/DNR/DP2023/2466-1 ASFV/DNR/DP2023/2466-3
2817	A → T	L → stop	MGF 360-1Lb	ASFV/Zaporozskaya/DP2023/2896-5
2929	Делеция / Deletion A	–	Межгенная область / Intergenic region 1L/2L	ASFV/LNR/DP2023/42-1 ASFV/Bryanskaya 2021/DP-18 ASFV/Bryanskaya 2021/DP-8823
7059	C → T	W → stop	<i>MGF 110-1L</i>	Все исследуемые изоляты, за исключением All of the isolates tested except Ulyanovsk/19/WB/5699 Kabardino-Balkaria/19/WB/ 964 Pol15/Podlaskie/Poland//2015 LT14/1490/Lithuania/2014
8280	G → A	H → Y	<i>MGF 110-3L</i>	ASFV/DNR/DP2023/2466-1 ASFV/DNR/DP2023/2466-3
8329	T → C	G = G	<i>MGF 110-3L</i>	ASFV/DNR/DP2023/2466-1 ASFV/DNR/DP2023/2466-3
9253	C → A	V → L	<i>MGF 110-4L</i>	ASFV/DNR/DP2023/2466-1 ASFV/DNR/DP2023/2466-3 ASFV/DNR/DP2023/3343-2
16283	A → G	–	PolyC-region	ASFV/LNR/DP2023/42-1
16683	C → T	A = A		
16692	A → G	V → I		
16694	C → T	I → V		
16703	T → C	I → V		
16718	T → C	V → I		
16719	G → A	A = A	<i>MGF 360-4L</i>	ASFV/Zaporozskaya/DP2023/2896-5
16727	G → T	Q → K		
16738	A → T	L → Y		
16739	G → A	L → Y		
16745	A → G	L = L		
16746	A → G	H = H		
17509	A → T	–	Межгенная область Intergenic region	ASFV/LNR/DP2023/42-1
18576	A → G	A = A		
18582	C → A	S → F		
18583	G → A	S → F		
18592	T → A	D → V	<i>MGF 360-6L</i>	ASFV/Zaporozskaya/DP2023/2896-5
18594	A → G	N = N		
18598	G → A	P → L		
18600	A → C	D → G		
18601	T → C	D → G		
24690	G → A	T → M	<i>MGF 360-8L</i>	ASFV/DNR/DP2023/2466-1 ASFV/DNR/DP2023/2466-3 ASFV/DNR/DP2023/3343-2
24967	A → G	S → P	<i>MGF 360-8L</i>	ASFV/Zaporozskaya/DP2023/2896-5
30904	C → T	L = L	<i>MGF 360-12L</i>	ASFV/Zaporozskaya/DP2023/2896-5
44576	A → G	K → E	<i>MGF 505-9R</i>	Все исследуемые изоляты, за исключением All of the isolates tested except Ulyanovsk/19/WB/5699 Kabardino-Balkaria/19/WB/ 964 Pol15/Podlaskie/Poland//2015 LT14/1490/Lithuania/2014
46135	C → A	F → L	<i>MGF 505-10R</i>	ASFV/DNR/DP2023/2466-1 ASFV/DNR/DP2023/2466-3 ASFV/DNR/DP2023/3343-2

Продолжение табл. 2 см. на стр. 488.

ORIGINAL RESEARCHES

Нуклеотидная позиция Nucleotide position (Georgia 2007/1)	Характер ОНП Type of SNP	Аминокислотная изменчивость Variability of amino acid	Ген/Межгенная область Gene/Intergenic region	Встречаемость Occurrence
46557	G → A	R → Q	<i>MGF 505-10R</i>	ASFV/LNR/DP2023/42-1 ASFV/Bryanskaya 2021/DP-18 ASFV/Bryanskaya 2021/DP-8823
48231	Инсерция Insertion CTAGCTATAG	–	Межгенная область Intergenic region	ASFV/Zaporozskaya/DP2023/2896-5
49085	T → A	N → Y	<i>A240L</i>	ASFV/LNR/DP2023/42-1
50655	G → A	A → T	<i>MGF 360-15R</i>	ASFV/LNR/DP2023/42-1 ASFV/Bryanskaya 2021/DP-18 ASFV/Bryanskaya 2021/DP-8823
50667	G → A	E → K	<i>MGF 360-15R</i>	ASFV/LNR/DP2023/42-1 ASFV/Bryanskaya 2021/DP-18 ASFV/Bryanskaya 2021/DP-8823
54369	C → T	S → N	<i>A859L</i>	ASFV/LNR/DP2023/42-1
54758	G → A	–	Межгенная область Intergenic region	ASFV/Zaporozskaya/DP2023/2896-5
57427	G → A	H = H	<i>F334L</i>	ASFV/Zaporozskaya/DP2023/2896-5
74708	A → G	T → A	<i>EP402R</i>	ASFV/DNR/DP2023/3343-2
86659	G → A	A = A	<i>C257L</i>	ASFV/Zaporozskaya/DP2023/2896-5
106942	C → T	V → I	<i>B117L</i>	ASFV/LNR/DP2023/42-1
121744	G → A	I = I	<i>CP2475L</i>	ASFV/LNR/DP2023/42-1
131463	G → C	Q → E	<i>NP1450L</i>	ASFV/LNR/DP2023/42-1 ASFV/Bryanskaya 2021/DP-18 ASFV/Bryanskaya 2021/DP-8823 Все исследуемые изоляты, за исключением All of the isolates tested except
134514	T → C	R → S	<i>NP419L</i>	Ulyanovsk/19/WB/5699 Kabardino-Balkaria/19/WB/ 964 Pol15/Podlaskie/Poland//2015 LT14/1490/Lithuania/2014
157272	G → A	A → V	<i>R298L</i>	ASFV/Zaporozskaya/DP2023/2896-5
157297	G → A	A → V	<i>R298L</i>	ASFV/Zaporozskaya/DP2023/2896-5
158805	C → G	E → Q	<i>Q706L</i>	ASFV/LNR/DP2023/42-1 ASFV/Bryanskaya 2021/DP-18 ASFV/Bryanskaya 2021/DP-8823 ASFV/Zaporozskaya/DP2023/2896-5 ASFV/Kaliningrad 18/WB-9767 ASFV/Kaliningrad 18/WB-12524 ASFV/Kaliningrad 18/WB-9766 Pol15/Podlaskie/Poland//2015 LT14/1490/Lithuania/2014
167062	C → T	G → R	<i>I199L</i>	ASFV/DNR/DP2023/2466-1, ASFV/Zabaykali 2020/WB-5314 ASFV/Zabaykaly 2020/DP-4905
167188	C → G	A → P		ASFV/LNR/DP2023/42-1
167196	G → A	T → I		ASFV/LNR/DP2023/42-1
168627	T → A	F → I	<i>E248R</i>	ASFV/LNR/DP2023/42-1 Все исследуемые изоляты, за исключением All of the isolates tested except
170862	T → A	I → F	<i>I267L</i>	Ulyanovsk/19/WB/5699 Kabardino-Balkaria/19/WB/ 964 Pol15/Podlaskie/Poland//2015 LT14/1490/Lithuania/2014 Odintsovo/WB/Russia/2014
173273	C → T	T = T	<i>I73R</i>	ASFV/LNR/DP2023/42-1
173408	Инсерция Insertion GGAATATATA	–	Межгенная область Intergenic region <i>I73R/I329L</i>	27 из 45 исследуемых изолятов, включая 5 описанных в настоящем исследовании 27 of the 45 isolates investigated, including the 5 described in this study
184404	G → A	A → T	<i>MGF 360-18R</i>	ASFV/DNR/DP2023/2466-1 ASFV/DNR/DP2023/2466-3 ASFV/DNR/DP2023/3343-2
187684	A → C	–		
187700	A → T	–		
187701	G → A	–	Межгенная область Intergenic region	ASFV/DNR/DP2023/2466-1
187702	G → T	–		ASFV/DNR/DP2023/2466-3
187703	G → A	–		ASFV/DNR/DP2023/3343-2
187718	T → C	–		
190116	Инсерция Insertion A	I → N	<i>DP60R</i>	Все исследуемые изоляты, за исключением All of the isolates tested except Ulyanovsk/19/WB/5699 Kabardino-Balkaria/19/WB/ 964 Pol15/Podlaskie/Poland//2015 LT14/1490/Lithuania/2014 Odintsovo/WB/Russia/2014 ASFV CzechRepublic 2017/1 ASFV Germany 2020/1

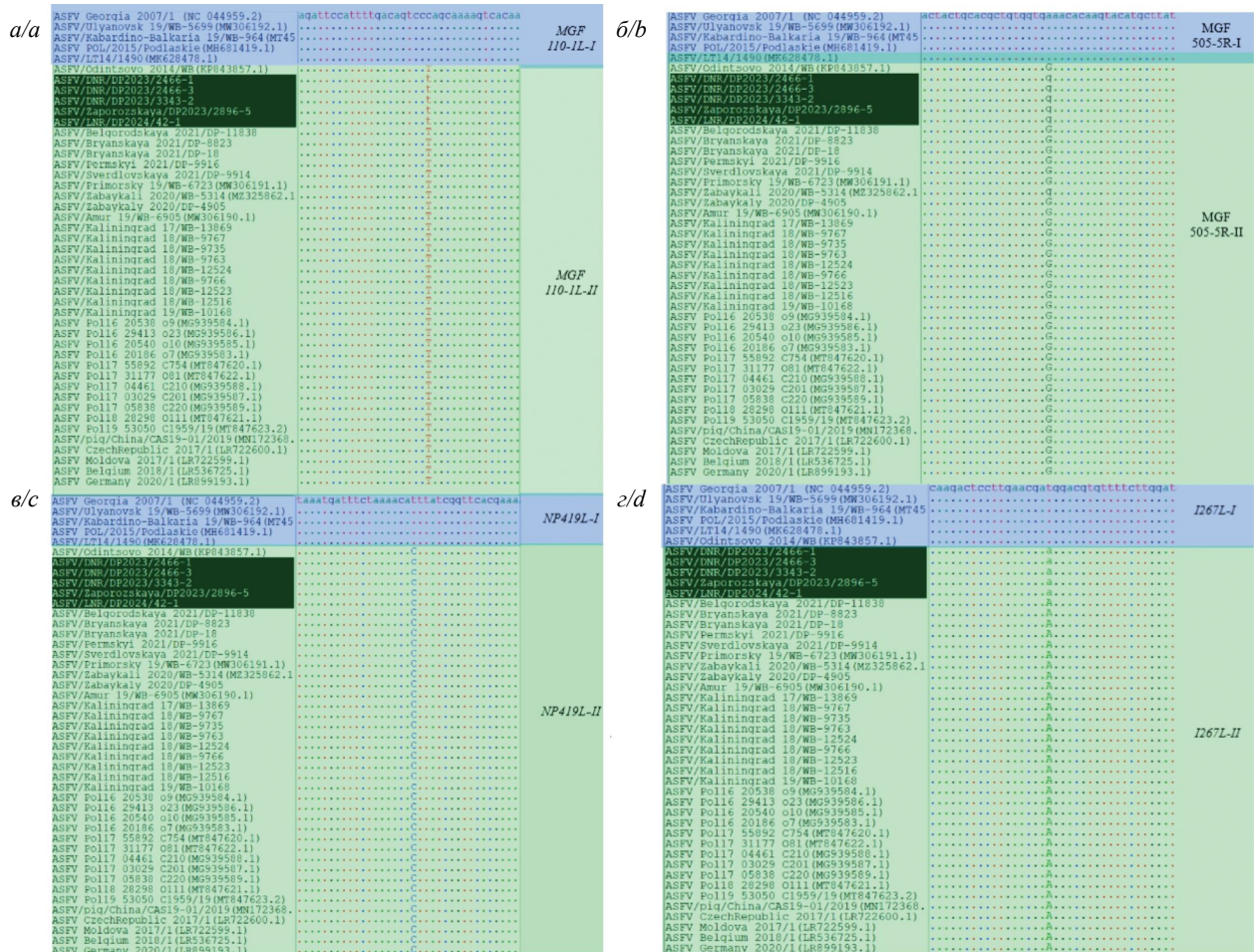


Рис. 3. Выравнивание последовательностей генов *MGF 110-IL* (а), *MGF 505-9R* (б), *NP419L* (в) и *I267L* (г) с указанием несинонимичных замён.

Fig. 3. Multiple alignment of *MGF 110-IL* (a), *MGF 505-9R* (b), *NP419L* (c), and *I267L* (d) genes showing non-synonymous substitutions.

а также из Калининградской области, Дальневосточного федерального округа и центральных регионов России.

Межгенная вирусная область *I73R/I329L* содержала три 10-нуклеотидных инсерций tandemных повторов (TRS) и относилась к IGR-II, превалирующему на территории Евразии.

Уровень гомологии. Установлена гомологичность исследуемых полногеномных последовательностей с наиболее изученными (референсными) штаммами вируса АЧС, принадлежащими генотипу II и выделенными в разных энзоотичных странах Евразии (Россия: Калининградская («Запад»), Ульяновская («Центр») и Амурская («Восток») области; Молдова, Бельгия, Польша: 2 гетерогенных генетических варианта (до 2016 г. и после), Китай), при вычислении процента идентичности (рис. 4).

По данным рис. 4, циркулирующий вирус АЧС в Донецкой, Луганской и Запорожской областях обладает высоким генетическим сродством (99,95–99,99% идентичности) со штаммами II генотипа, выделенными на евроазиатском континенте в течении современной эпизоотии АЧС.

Филогенетический анализ. Определено филогенетическое родство 45 штаммов и изолятов вируса АЧС, импортированных из реестра GenBank, с исследуемыми последовательностями. Результаты анализа представлены на рис. 5.

На укорененной дендрограмме (рис. 5) идентифицируются три крупные группы изолятов, ветви которых имеют один общий внутренний узел. Изученные геноварианты можно разделить на 6 клад (кластеров) ввиду значительной как филогенетической, так и географической обособленности. Так, изоляты исходной (корневой) клады обозначены синим цветом и наименованы как «Грузия 2007», поскольку характеризуются более ранним происхождением и высоким родством с материнским штаммом Georgia 2007/1. Бинарный узел на дереве разделяет вирус АЧС, циркулирующий в европейских странах, на две клады, получивших названия «Восточная Европа» (Калининградская область, Польша, Германия, выделена красным цветом) и «Европа» (Молдова, Чехия, Бельгия, отмечена оранжевым цветом). От второго крупного узла отходят три сестринские клады изолятов: «Азия» (Китай и Дальний Вос-

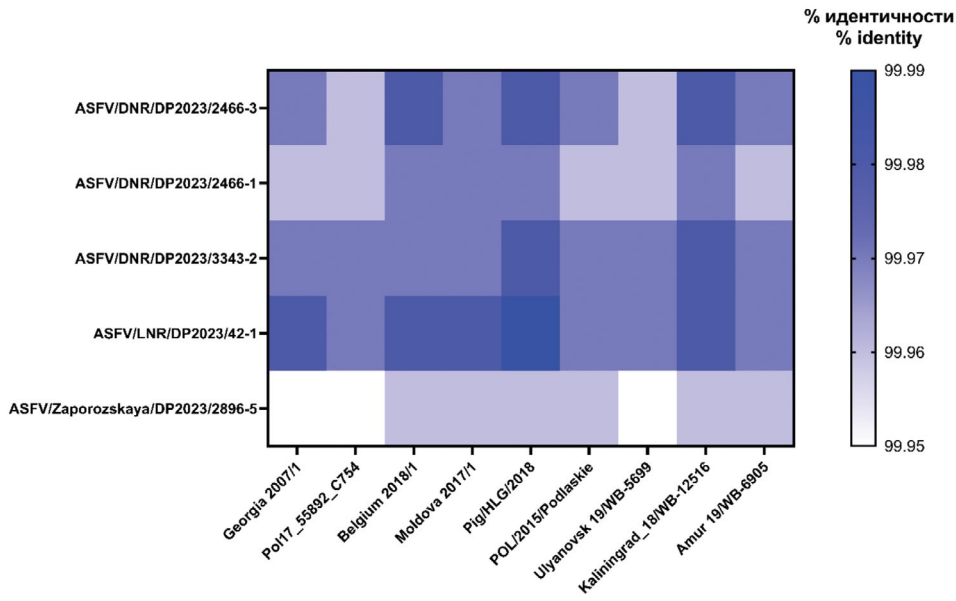


Рис. 4. Гомология изолятов, выделенных на территории левобережья Днепра, со штаммами, охарактеризованными в географически отдаленных друг от друга областях Евразии.
Fig. 4. Homology of isolates collected on the territory of the Dnieper left bank with strains characterized in geographically distant areas of Eurasia.

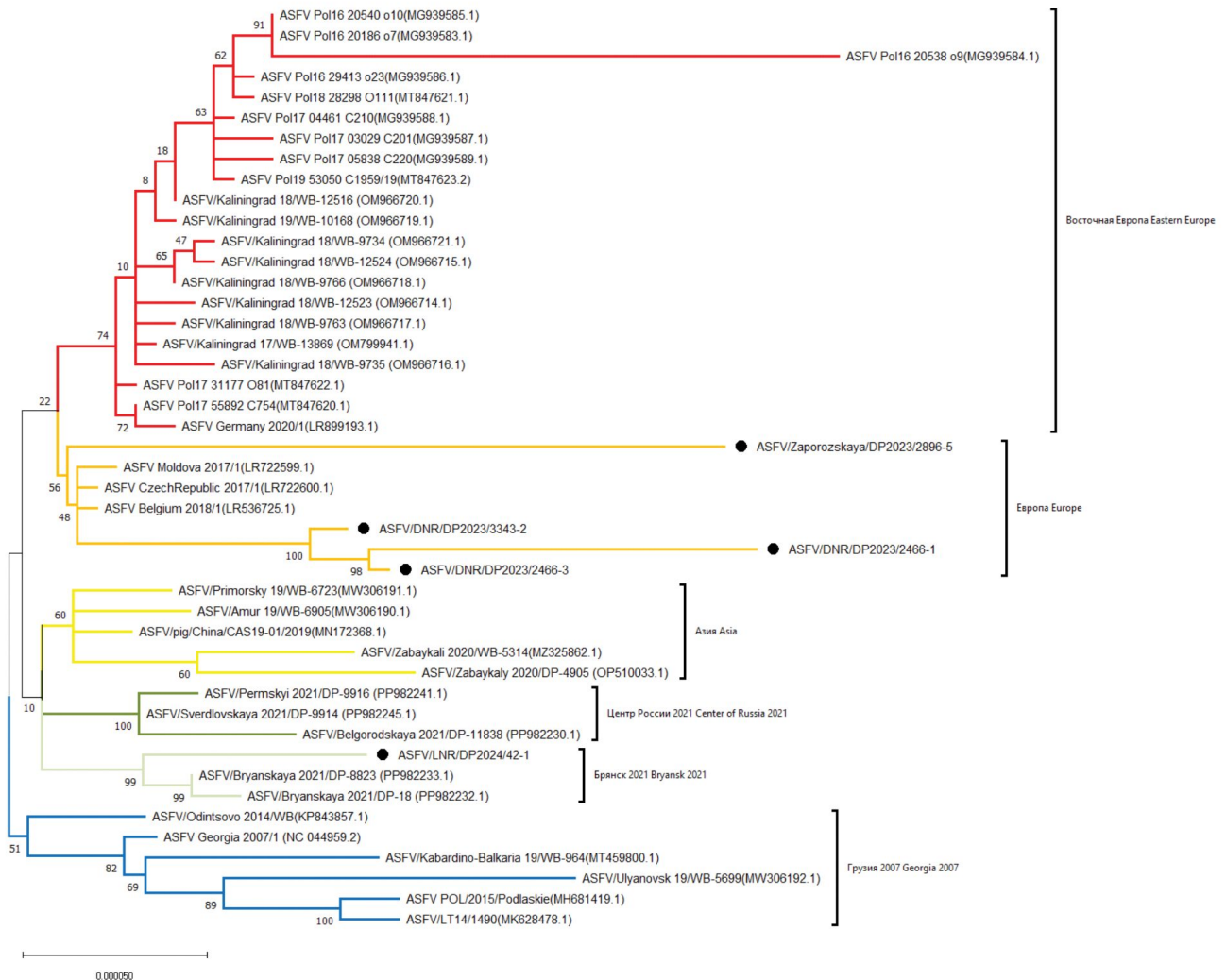


Рис. 5. Филограмма изолятов вируса АЧС, выделенных в Евразии с 2007 по 2023 г.

Примечание: изученные в настоящем исследовании изоляты обозначены ●.

Fig. 5. Phylogenetic tree of ASFV isolates collected in Eurasia from 2007 to 2023.

Note: isolates obtained in this study are labeled ●.

Таблица 3. Данные субгенотипирования изолятов вируса АЧС, исследованных в работе**Table 3.** Subgenotyping data of ASFV isolates studied in this research

Характеристики Features	Изолят Isolate				
	ASFV/DNR/ DP2023/2466-1	ASFV/DNR/ DP2023/2466-3	ASFV/DNR/ DP2023/3343-2	ASFV/Zaporozskaya/ DP2023/2896-5	ASFV/LNR/ DP2023/42-1
<i>CVR</i>	I	I	I	I	I
<i>IGR I73R/I329L</i>	II	II	II	II	II
<i>MGF 505-9R/10R</i>	I	I	I	I	I
<i>K145R</i>	I	I	I	I	I
<i>O174L</i>	I	I	I	I	I
<i>MGF 505-5R</i>	I	I	I	I	I
<i>MGF 360-10L</i>	I	I	I	I	I
<i>I267L</i>	II	II	II	II	II
<i>I215L</i>	I	I	I	I	I
Генотип Genotype	II	II	II	II	II
Субгенотип Subgenotype	3b	3b	3b	3b	3b

ток России показана желтым цветом), «Центр России 2021» (Свердловская и Белгородская области, Пермский край – обозначена темно-зеленым оттенком) и «Брянск 2021» (Брянская область – имеет светло-зеленый оттенок).

ASFV/LNR/DP2023/42-1 проявляет филогенетическое родство и относится к одной группе с вирусом АЧС из Брянской области (20% – 1/5), вызывавшим вспышки АЧС на свиноводческих комплексах в 2021 г.

Последовательности вируса АЧС, изолированного в Донецком и Запорожском регионах (80% – 4/5), группируются в кладе «Европа». При этом все три изолята из Донецкой области формируют собственный внутренний субкластер. Длина ветви ASFV/Zaporozskaya/DP2023/2896-5 гораздо больше остальных последовательностей, что указывает на высокое число добавочных замен.

Все изоляты II генотипа, выделенные в странах Евразии, принадлежат монофилетической группе, т.е. имеют общего предка (вероятно, штамм Georgia 2007/1).

Субгенотипирование. На основании распределения генетических вариантов по 9 маркерным фрагментам генома вируса АЧС идентифицирован субгенотип (геногруппа; **табл. 3**).

Все 5 изученных изолятов относятся к субгенотипу 3b, получившему повсеместное распространение на территории всех регионов страны, за исключением Калининградской области и Дальневосточного федерального округа. В сравнительном анализе 45 изолятов к геногруппе 3b относились 13 (28,9%: исследуемые, Belgorodskaya 2021/DP-11838, Bryanskaya 2021/DP-8823, Bryanskaya 2021/DP-18, Permskiy 2021/DP-9916, Sverdlovskaya 2021/DP-9914, Belgium 2018/1, Moldova 2017/1, Czech Republic 2017/1), характерных для Европы и России в период с 2017 по 2023 г.

Обсуждение

До настоящего момента данные полногеномного анализа вируса АЧС, изолированного на территории левобережья Днепра, в открытой печати отсутствовали. В данном исследовании впервые приведены результаты выявления точечных мутаций и филогении у 5 изолятов, выделенных в Донецкой, Луганской и Запорожской областях в 2023 г.

На примере последовательностей, импортированных из GenBank, показано формирование клад «Грузия 2007» (референс, характерный для начала эпизодии АЧС в период с 2007 по 2015 г. и спорадически регистрируемый до 2019 г.), «Центр России 2021», «Брянск 2021», «Азия», «Европа» и «Восточная Европа» [5–9]. Установлена принадлежность 4 изолятов из Донецкого и Запорожского регионов к кластеру «Европа», что предполагает независимую и непрерывную молекулярную эволюцию этого геноварианта вируса АЧС II генотипа на территории как западно- (Бельгия), так и восточноевропейских (Чехия, Молдова, Украина) стран как минимум с 2017 по 2023 г. (рис. 5).

Подтверждением вхожденности также служит распределение аллелей по маркерным нуклеотидным участкам в субгенотип 3b, наиболее распространенный в странах Европы и Центральных субъектах России с 2016 г. Стоит обратить внимание, что изоляты кластеров «Европа», «Центр России 2021» и «Брянск 2021» относятся к одному субгенотипу (3b), а клады «Азия» – к другим (3d и 3i), несмотря на результаты полногеномного анализа, показывающие близкое родство «центральных» и «азиатских» вариантов [15]. Слабую корреляцию методов можно обосновать различными приоритетами исследования, т.к. филогения полных последовательностей генома определяет главным образом показатели про-

исхождения и степени дивергенции вируса, тогда как фрагментарный («локальный») анализ – циркуляцию возбудителя в определенной физико-географической/административной зоне.

Штамм Kyiv/131 2016 при этом не был включен в сравнительный анализ из-за обнаруженного большого числа ошибок секвенирования/сборки генома, способствующих формированию недостоверных выводов [10]. Однако геноварианты маркерных областей генома Kyiv/131 2016 идентичны изолятам, относящимся к кластеру «Восточная Европа» [16].

Таким образом, вспышки АЧС у домашних свиней, содержащихся на правобережной и левобережной территории Днепра, были вызваны вирусом АЧС, принадлежащим разным субгенотипам (7 и 3b соответственно). В свою очередь, пространственно-временной анализ значительно лимитирован по причине недостаточных молекулярно-эпизоотологических данных о распространении АЧС на Украине в период с мая 2016 по август 2023 г.

Высокий уровень гомологии (99,95–99,99%) охарактеризованных изолятов с другими штаммами II генотипа, выделенными в странах Евразии (Грузии, Китае, Польше, Молдове, Бельгии и России), в очередной раз подтверждают генетическую консервативность вируса АЧС, инфицирующего домашних свиней и диких кабанов (один вид – *Sus scrofa*) и дивергентного от родительского варианта «Грузия 2007» [6]. Следует отметить, что такие заключения применимы исключительно к вирусу АЧС II генотипа и не коррелируют с сообщениями о распространении возбудителя I генотипа или рекомбинантного варианта в Китайской Народной Республике [17, 18].

Большинство замен (6/10) у изолятов, выделенных в Донецком регионе, расположены в мультигенных семействах *MGF 110*, *360*, *505*, которые могут кодировать факторы вирулентности вируса АЧС [19]. ОНП в локусе *EP402R* у изолята ASFV/DNR/DP2023/3343-2 может приводить к изменению сероиммуносpezifичности, что необходимо подтверждать в иммунопробе на животных и в реакции задержки гемадсорбции (РЗГАд) с использованием референс-сывороток [20].

Изолят ASFV/Zaporozskaaya/DP2023/2896-5 обладает выраженным полиморфизмом генов *MGF 360*, проявляющимся в наличии 22 замен, 15 из которых синонимичные и 7 – синонимичные. Выявленный ОНП служит основанием для проведения экспериментальных работ по оценке иммунобиологических свойств на естественно-восприимчивых животных, т.к. мутагенез в генах *MGF* может приводить к снижению вирулентных свойств вируса [21].

Филогенетический анализ полногеномных последовательностей показал родство изолятов, выделенных в Луганском и Брянском субъекте (2021 г., рис. 5). Так, 6/9 замен, выявленных у ASFV/LNR/DP2023/42-1, идентичны ранее уникальным для вируса АЧС из Брянской области, однако 3/9 замен обнаружены впервые, что может указывать на происхождение генетического варианта от исходного, близкого кладе «Брянск 2021».

Следует отметить, что все 5 изученных изолятов на

филогенетической дендрограмме имели длину ветви, значительно превосходящую этот параметр у исходных кладоформирующих штаммов, что указывает на большее число дополнительных ОНП (мутационный темп в заменах/сайт/год) и гипотетически на более позднее происхождение геновариантов при условии корректного секвенирования (рис. 5). В этом отношении результаты филогении подтверждаются известными эпизоотологическими данными о вспышках АЧС, представленными в работе (табл. 1).

Исследование полиморфизма генов *E199L* и *DP60R* у 45 последовательностей генотипа II, включая представленные впервые, выявило отсутствие подтверждающих перспектив использования этих локусов в качестве маркерных фрагментов генома для отслеживания распространения АЧС в Евразии, в отличие от предыдущих данных [7]. Тожественный ОНП у изолятов из географически отдаленных регионов может быть связан с наличием у вируса АЧС точечной репарации генома, обеспечивающегося за счет функционирования Pol X ДНК-полимеразы, поскольку *E199L* кодирует важнейший белок, связанный с активацией аутофагии зараженных клеток [22, 23]. В любом случае, данные анализа генов *E199L* и *DP60R*, опровергающие энзоотичность АЧС, противоречат результатам исследования прочих фрагментов, включая маркерных, подтверждающих территориально-ограниченное развитие эпизоотического процесса.

Кроме того, не обнаружено ни одной точечной мутации, которая была бы исключительна для всех изолятов, выделенных на территории левобережья Днепра в 2023 г., что указывает на независимые пути генетической изменчивости вируса АЧС, инфицирующего восприимчивых животных в этих субъектах. Однако выявлен ряд уникальных ОНП для каждого охарактеризованного изолята, позволяющий в дальнейшем идентифицировать родственные геноварианты с описанными в настоящем исследовании. Разработка праймеров, фланкирующих фрагменты с выявленными специфичными мутациями, поможет ускорить процесс дифференциации в дальнейших работах.

Заключение

Впервые проведен полногеномный анализ вируса АЧС, циркулирующего на территории левобережья Днепра, на примере 5 изолятов, выделенных в Донецкой, Луганской и Запорожской областях от домашних свиней в 2023 г. Все они отнесены к генотипу II, имеют монофилетическое происхождение, филогенетически близки кладам «Европа» (4/5) и «Брянск 2021» (1/5).

В целом на территории данных субъектов не отмечается эмерджентность АЧС, а характерно внутрикластерное распространение. Изученные изоляты относятся к субгенотипу 3b и имеют высокий уровень гомологии (99,95–99,99%) с большинством референтных штаммов, принадлежащих генотипу II и зарегистрированных в Евразии. Однако выявлены ранее не описанные точечные мутации, уникальные для каждого изолята, которые позволят идентифицировать родственные варианты.

Кроме того, обнаружены многочисленные замены в локусах мультигенного семейства *MGF 110*, *505* и *360*, кодирующих факторы вирулентности, у 4 изолятов из Донецкой и Запорожской областей, что может также влиять на изменение иммунобиологических свойств возбудителя АЧС.

На примере изучения филогении показаны достаточные для дифференциации показатели варибельности и гетерогенности вируса АЧС генотипа II, происходящего от референс-штамма Georgia 2007/1. Представленные данные обладают теоретической и практической значимостью при усовершенствовании и разработке мер профилактики, а также могут значительно расширить возможности внутреннего и международного надзора за АЧС.

ЛИТЕРАТУРА

- Beltrán-Alcrudo D., Lubroth J., Depner K., Rocque S. African swine fever in the Caucasus. *EMPRES Watch*. 2008; 1(8): 1–8. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3579.1200>
- Nix R.J., Gallardo C., Hutchings G., Blanco E., Dixon L.K. Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Arch. Virol.* 2006; 151(12): 2475–94. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0794-z>
- Shen Z.J., Jia H., Xie C.D., Shagainar J., Feng Z., Zhang X., et al. Bayesian phylodynamic analysis reveals the dispersal patterns of African swine fever virus. *Viruses*. 2022; 14(5): 889. <https://doi.org/10.3390/v14050889>
- Malogolovkin A., Yelsukova A., Gallardo C., Tsybanov S., Kolbasov D. Molecular characterization of African swine fever virus isolates originating from outbreaks in the Russian Federation between 2007 and 2011. *Vet. Microbiol.* 2012; 158(3-4): 415–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.002>
- Chapman D.A., Darby A.C., Da Silva M., Upton C., Radford A.D., Dixon L.K. Genomic analysis of highly virulent Georgia 2007/1 isolate of African swine fever virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(4): 599–605. <https://doi.org/10.3201/eid1704.101283>
- Mazloum A., van Schalkwyk A., Shotin A., Igolkin A., Shevchenko I., Gruzdev K.N., et al. Comparative analysis of full genome sequences of African swine fever virus isolates taken from wild boars in Russia in 2019. *Pathogens*. 2021; 10(5): 521. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050521>
- Чернышев Р.С., Спрыгин А.В., Шотин А.Р., Иголкин А.С., Мазлум А. Сравнительный анализ полногеномных последовательностей двух изолятов вируса африканской чумы свиней, выделенных в 2020 году от домашних и диких свиней в Забайкальском крае Российской Федерации. *Ветеринария, зоотехния и биотехнология*. 2022; (10): 84–97. <https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202210010> <https://elibrary.ru/qcgsux>
- Zhang Y., Wang Q., Zhu Z., Wang S., Tu S., Zhang Y., et al. Tracing the origin of genotype II African swine fever virus in China by genomic epidemiology analysis. *Transbound. Emerg. Dis.* 2023; (1): 4820809. <https://doi.org/10.1155/2023/4820809>
- Xin G., Kuang Q., Le S., Wu W., Gao Q., Gao H., et al. Origin, genomic diversity and evolution of African swine fever virus in East Asia. *Virus Evol.* 2023; 9(2): vead060. <https://doi.org/10.1093/ve/vead060>
- Kovalenko G., Ducluzeau A.L., Ishchenko L., Sushko M., Sapachova M., Rudova N., et al. Complete genome sequence of a virulent African swine fever virus from a domestic pig in Ukraine. *Microbiol. Resour. Announc.* 2019; 8(42): e00883–19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00883-19>
- Puzankova O., GavriloVA V., Chernyshev R., Kolbin I., Igolkin A., Sprygina A., et al. Novel protocol for the preparation of porcine bone marrow primary cell culture for African swine fever virus isolation. *Methods Protoc.* 2023; 6(5): 73. <https://doi.org/10.3390/mps6050073>
- Sun X., Hu Y.H., Wang J., Fang C., Li J., Han M., et al. Efficient and stable metabarcoding sequencing data using a DNBSEQ-G400 sequencer validated by comprehensive community analyses. *Giga-Byte*. 2021; 2021: gigabyte16. <https://doi.org/10.46471/gigabyte.16>
- Tcherepanov V., Ehlers A., Upton C. Genome Annotation Transfer Utility (GATU): rapid annotation of viral genomes using a closely related reference genome. *BMC Genomics*. 2006; 7: 150. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-150>
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Gallardo C., Casado N., Soler A., Djadjovski I., Krivko L., Madaueño E., et al. A multi gene-approach genotyping method identifies 24 genetic clusters within the genotype II-European African swine fever viruses circulating from 2007 to 2022. *Front. Vet. Sci.* 2023; (10): 1112850. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1112850>
- Чернышев Р.С., Иголкин А.С., Шотин А.Р., Зиняков Н.Г., Колбин И.С., Садчикова А.С. и др. Пространственно-временной кластерный анализ циркуляции вируса африканской чумы свиней (Asfarviridae: Asfivirus) в Калининградской области на основе трех генетических маркеров. *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(3): 241–54. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-231> <https://elibrary.ru/lbevvpz>
- Sun E., Huang L., Zhang X., Zhang J., Shen D., Zhang Z., et al. Genotype I African swine fever viruses emerged in domestic pigs in China and caused chronic infection. *Emerg. Microbes Infect.* 2021; 10(1): 2183–93. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1999779>
- Zhao D., Sun E., Huang L., Ding L., Zhu Y., Zhang J., et al. Highly lethal genotype I and II recombinant African swine fever viruses detected in pigs. *Nat. Commun.* 2023; 14(1): 3096. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38868-w>
- Zhu Z., Chen H., Liu L., Cao Y., Jiang T., Zou Y., et al. Classification and characterization of multigenic family proteins of African swine fever viruses. *Brief. Bioinform.* 2021; 22(4): bbaa380. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa380>
- Бальшев В.М., Болгова М.В., Бальшева В.И., Болгова М.В., Князева М.В., Живодеров С.П. Получение типовых задерживающих гемадсорбцию референс-сывороток к вирусу африканской чумы свиней. *Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии*. 2015; (2): 23–5. <https://elibrary.ru/twnfvf>
- Wu L., Yang B., Yuan X., Hong J., Peng M., Chen J.L., et al. Regulation and evasion of host immune response by African swine fever virus. *Front. Microbiol.* 2021; 12: 698001. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.698001>
- Redrejo-Rodríguez M., Rodríguez J.M., Suárez C., Salas J., Salas M.L. Involvement of the reparative DNA polymerase Pol X of African swine fever virus in the maintenance of viral genome stability in vivo. *J. Virol.* 2013; 87(17): 9780–7. <https://doi.org/10.1128/JVI.01173-13>
- Chen S., Zhang X., Nie Y., Li H., Chen W., Lin W., et al. African swine fever virus protein E199L promotes cell autophagy through the interaction of PYCR2. *Virol. Sin.* 2021; 36(2): 196–206. <https://doi.org/10.1007/s12250-021-00375-x>

REFERENCES

- Beltrán-Alcrudo D., Lubroth J., Depner K., Rocque S. African swine fever in the Caucasus. *EMPRES Watch*. 2008; 1(8): 1–8. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3579.1200>
- Nix R.J., Gallardo C., Hutchings G., Blanco E., Dixon L.K. Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Arch. Virol.* 2006; 151(12): 2475–94. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0794-z>
- Shen Z.J., Jia H., Xie C.D., Shagainar J., Feng Z., Zhang X., et al. Bayesian phylodynamic analysis reveals the dispersal patterns of African swine fever virus. *Viruses*. 2022; 14(5): 889. <https://doi.org/10.3390/v14050889>
- Malogolovkin A., Yelsukova A., Gallardo C., Tsybanov S., Kolbasov D. Molecular characterization of African swine fever virus isolates originating from outbreaks in the Russian Federation between 2007 and 2011. *Vet. Microbiol.* 2012; 158(3-4): 415–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.002>
- Chapman D.A., Darby A.C., Da Silva M., Upton C., Radford A.D., Dixon L.K. Genomic analysis of highly virulent Georgia 2007/1 isolate of African swine fever virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(4): 599–605. <https://doi.org/10.3201/eid1704.101283>
- Mazloum A., van Schalkwyk A., Shotin A., Igolkin A., Shevchenko I., Gruzdev K.N., et al. Comparative analysis of full genome

- sequences of African swine fever virus isolates taken from wild boars in Russia in 2019. *Pathogens*. 2021; 10(5): 521. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050521>
7. Chernyshev R.S., Sprygin A.V., Shotin A.R., Igolkin A.S., Mazlum A. Comparative analysis of full genome sequences of African swine fever virus isolates taken from domestic pigs and wild boar in Zabaykalsky Krai of Russian Federation in 2020. *Veterinariya, zootekhnika i biotekhnologiya*. 2022; (10): 84–97. <https://doi.org/10.36871/vet.zoo.bio.202210010> <https://elibrary.ru/qcgsux> (in Russian)
 8. Zhang Y., Wang Q., Zhu Z., Wang S., Tu S., Zhang Y., et al. Tracing the origin of genotype II African swine fever virus in China by genomic epidemiology analysis. *Transbound. Emerg. Dis.* 2023; (1): 4820809. <https://doi.org/10.1155/2023/4820809>
 9. Xin G., Kuang Q., Le S., Wu W., Gao Q., Gao H., et al. Origin, genomic diversity and evolution of African swine fever virus in East Asia. *Virus Evol.* 2023; 9(2): vead060. <https://doi.org/10.1093/ve/vead060>
 10. Kovalenko G., Ducluzeau A.L., Ishchenko L., Sushko M., Sapachova M., Rudova N., et al. Complete genome sequence of a virulent African swine fever virus from a domestic pig in Ukraine. *Microbiol. Resour. Announc.* 2019; 8(42): e00883–19. <https://doi.org/10.1128/MRA.00883-19>
 11. Puzankova O., Gavrilova V., Chernyshev R., Kolbin I., Igolkin A., Sprygin A., et al. Novel protocol for the preparation of porcine bone marrow primary cell culture for African swine fever virus isolation. *Methods Protoc.* 2023; 6(5): 73. <https://doi.org/10.3390/mps6050073>
 12. Sun X., Hu Y.H., Wang J., Fang C., Li J., Han M., et al. Efficient and stable metabarcoding sequencing data using a DNBSEQ-G400 sequencer validated by comprehensive community analyses. *Giga-Byte*. 2021; 2021: gigabyte16. <https://doi.org/10.46471/gigabyte.16>
 13. Tcherepanov V., Ehlers A., Upton C. Genome Annotation Transfer Utility (GATU): rapid annotation of viral genomes using a closely related reference genome. *BMC Genomics*. 2006; 7: 150. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-150>
 14. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6): 1547–9. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
 15. Gallardo C., Casado N., Soler A., Djadjovski I., Krivko L., Madoño E., et al. A multi gene-approach genotyping method identifies 24 genetic clusters within the genotype II-European African swine fever viruses circulating from 2007 to 2022. *Front. Vet. Sci.* 2023; (10): 1112850. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1112850>
 16. Chernyshev R.S., Igolkin A.S., Shotin A.R., Zinyakov N.G., Kolbin I.S., Sadchikova A.S., et al. Spatio-temporal clustering of African swine fever virus (Asfarviridae: *Asfivirus*) circulating in the Kaliningrad region based on three genome markers. *Voprosy virusologii*. 2024; 69(3): 241–54. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-231> <https://elibrary.ru/lbevvpz> (in Russian)
 17. Sun E., Huang L., Zhang X., Zhang J., Shen D., Zhang Z., et al. Genotype I African swine fever viruses emerged in domestic pigs in China and caused chronic infection. *Emerg. Microbes Infect.* 2021; 10(1): 2183–93. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.199779>
 18. Zhao D., Sun E., Huang L., Ding L., Zhu Y., Zhang J., et al. Highly lethal genotype I and II recombinant African swine fever viruses detected in pigs. *Nat. Commun.* 2023; 14(1): 3096. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38868-w>
 19. Zhu Z., Chen H., Liu L., Cao Y., Jiang T., Zou Y., et al. Classification and characterization of multigene family proteins of African swine fever viruses. *Brief. Bioinform.* 2021; 22(4): bbaa380. <https://doi.org/10.1093/bib/bbaa380>
 20. Balyshev V.M., Bolgova M.V., Balysheva V.I., Bolgova M.V., Knyazeva M.V., Zhivoderov S.P. Preparation of standard Haemadsorption-inhibiting reference sera against African swine fever virus. *Voprosy normativno-pravovogo regulirovaniya v veterinarii*. 2015; (2): 23–5. <https://elibrary.ru/twnfvvt> (in Russian)
 21. Wu L., Yang B., Yuan X., Hong J., Peng M., Chen J.L., et al. Regulation and evasion of host immune response by African swine fever virus. *Front. Microbiol.* 2021; 12: 698001. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.698001>
 22. Redrejo-Rodríguez M., Rodríguez J.M., Suárez C., Salas J., Salas M.L. Involvement of the reparative DNA polymerase Pol X of African swine fever virus in the maintenance of viral genome stability in vivo. *J. Virol.* 2013; 87(17): 9780–7. <https://doi.org/10.1128/JVI.01173-13>
 23. Chen S., Zhang X., Nie Y., Li H., Chen W., Lin W., et al. African swine fever virus protein E199L promotes cell autophagy through the interaction of PYCR2. *Virol. Sin.* 2021; 36(2): 196–206. <https://doi.org/10.1007/s12250-021-00375-x>

Информация об авторах:

Чернышев Роман Сергеевич ✉ – аспирант, ветеринарный врач референтной лаборатории по африканской чуме свиней ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: chernishev_rs@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3604-7161>

Иголкин Алексей Сергеевич – канд. вет. наук, заместитель руководителя центра – заведующий референтной лабораторией по африканской чуме свиней лабораторно-диагностического центра ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: igolkin_as@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>

Зиняков Николай Геннадьевич – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: zinyakov@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3015-5594>

Чвала Илья Александрович – канд. вет. наук, заместитель директора ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Россия. E-mail: chvala@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>

Участие авторов: Чернышев Р.С., Иголкин А.С. – концепция и дизайн исследования; Чернышев Р.С., Зиняков Н.Г. – проведение экспериментов; Чернышев Р.С., Иголкин А.С. – сбор и обработка материала; Чернышев Р.С. – написание текста; Иголкин А.С., Зиняков Н.Г., Чвала И.А. – научное редактирование.

Поступила 04.09.2024
Принята в печать 16.10.2024
Опубликована 31.10.2024

Information about the authors:

Roman S. Chernyshev ✉ – postgraduate student, reference laboratory for ASF FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: chernishev_rs@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3604-7161>

Alexey S. Igolkin – Head of reference laboratory for ASF FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: igolkin_as@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5438-8026>

Nikolay G. Zinyakov – leading researcher, reference laboratory for avian influenza FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: zinyakov@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3015-5594>

Ilya A. Chvala – deputy Director FGBI «ARRIAH», Vladimir, Russia. E-mail: chvala@arriah.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>

Contribution: Chernyshev R.S., Igolkin A.S. – research concept and design; Chernyshev R.S., Zinyakov N.G. – performing of the laboratory research; Chernyshev R.S., Igolkin A.S. – collection and processing of the material; Chernyshev R.S. – writing of the text; Igolkin A.S., Zinyakov N.G., Chvala I.A. – editing of the article.

Received 04 September 2024
Accepted 16 October 2024
Published 31 October 2024

Problems
of Virology

Voprosy
Virusologii