



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

4

Том 70 • 2025

Volume 70 • Issue 4 • 2025

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 международ-
ных базах данных и информаци-
онно-справочных системах: Russian
Science Citation Index, Abstract Jour-
nals, AIDS & Cancer Research, Biocon-
trol 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 En-
tomology, Thomson Reuters Biological
Abstracts, Thomson Reuters BIOSIS Pre-
views, 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 29.08.2025.
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, 2025

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.

4

Том 70 • 2025

Редакционная коллегия

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

Зам. главного редактора: **Малеев В.В.** (д.б.н., проф., акад. РАН)

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

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

Научный редактор перевода: **Кюрегян К.К.** (д.б.н., проф. 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)

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

Попова А.Ю. (д.м.н., проф.)

Свитич О.А. (д.м.н., проф., акад. РАН)

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., член-
корр. РАН; 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., член-корр. РАН;
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)
Малышев Н.А. (д.м.н., проф.; Москва,
Россия)
Мананова Э.Р. (д.м.н.; Казань,
Россия)
Михайлов М.И. (д.м.н., проф.,
акад. 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.,
акад. РАН; Москва, Россия)
Чвала И.А. (к.в.н.; Владимир, Россия)
Чумаков П.М. (д.б.н., проф.,
акад. 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., член-корр.
РАН; 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)
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 August 29, 2025.
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, 2025

**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

4

Volume 70 • 2025

EDITORIAL BOARD

**Editor-in-Chief: LVOV D.K., RAS Full Member,
Professor, Dr. Sci. (Medicine)**

Assistant editor in chief: **Maleev V.V.**, RAS Full Member, Professor, Dr. Sci.
(Medicine)

Executive secretary: **Alkhovskiy S.V.**, RAS Corr. Member, Dr. Sci. (Biology)

Scientific editor: **Zaberezhny A.D.**, RAS Full Member, Professor,
Dr. Sci. (Biology)

Scientific translation editor: **Kyuregyan K.K.**, Professor RAS, 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)

Onishchenko G.G. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Popova A.Yu. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Svitich O.A. – RAS Corr. Member, 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. – RAS Corr. Member, 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. – RAS Corr. Member, Professor, 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 Full 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 Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Chvala I.A. – PhD (Vladimir, Russia)

Chumakov P.M. – RAS Full 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. – RAS Corr. Member, 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)

Webby R. (PhD; Memphis, USA)

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

ОБЗОРЫ

Куц А.А.

Скрытый гепатит В: распространенность и клиническая значимость. Роль в возникновении патологии печени и сочетанных вирусных инфекций* 299

Agbajelola V.I., Oluwadare F.A., Hamman M.M., Lateef A.M.

Вирус Зика в тени: недооцененный фактор в эпидемиологии лихорадочных заболеваний в Нигерии* 317

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кузнецова А.И., Антонова А.А., Макеева Е.А., Ким К.В., Мунчак Я.М., Меженская Е.Н., Орлова-Морозова Е.А., Пронин А.Ю., Прилипов А.Г., Галзитская О.В.Вспомогательный белок Vpr вируса иммунодефицита человека 1-го типа (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1*): особенности генетических вариантов вируса, циркулировавших на территории Московской области в 2019–2020 гг.* 324**Святченко В.А., Протопопова Е.В., Легостаев С.С., Микрюкова Т.П., Агафонов А.П., Локтев В.Б.**Моделирование смешанной инфекции вирусами Зика и Западного Нила (*Flaviviridae: Orthoflavivirus: Orthoflavivirus zikaense, Orthoflavivirus nilense*) *in vitro* и *in vivo** 340**Марченко В.А., Зелинская И.А., Мухаметдинова Д.В., Торопова Я.Г., Галагудза М.М., Жилинская И.Н.**Эндотелиопротективные свойства сакубитрил-валсартана и дротаверина в экспериментальной инфекции, вызванной вирусом гриппа А(H1N1)pdm09 (*Orthomyxoviridae: Alphainfluenzavirus: Influenza A virus*) 349**Чанышев М.Д., Чернышова А.С., Глущенко А.Г., Гришаева А.А., Макашова В.В., Понежева Ж.Б., Хафизов К.Ф., Акимкин В.Г.**Амплификационная панель NGS HCV-seq для таргетного секвенирования РНК вируса гепатита С (*Flaviviridae: Hepacivirus*)* 363

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

Мухачева А.В., Баранова Е.В., Богрянцева М.П., Нечаева Е.А., Смолина М.П., Саркисян К.А., Яндимирова С.С., Шубина Е.А.

Результаты аттестации фармакопейного стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины 374

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Ерш А.В., Полтавченко А.Г., Ушкаленко Н.Д., Филатов П.В., Тимова К.А., Одношевский Д.А., Сергеев Ал.А., Сергеев А.А.Выявление высокопатогенных ортопоксвирусов (*Poxviridae: Chordopoxvirinae, Orthopoxvirus*) методом дот-иммуноанализа в условиях лаборатории с высоким уровнем биологической защиты 388

ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

К 80-летию со дня рождения Олега Ивановича Киселева 393

CONTENTS

REVIEWS

Kushch A.A.

Occult hepatitis B: Prevalence and clinical significance. Role in liver pathology and in viral coinfections* 299

Agbajelola V.I., Oluwadare F.A., Hamman M.M., Lateef A.M.

Zika Virus in the Shadows: An Underrecognized Contributor to Nigeria's Febrile Disease Landscape* 317

ORIGINAL RESEARCHES

Kuznetsova A.I., Antonova A.A., Makeeva E.A., Kim K.V., Munchak I.A., Mezhenkaya E.N., Orlova-Morozova E.A., Pronin A.Yu., Prilipov A.G., Galzitskaya O.V.Vpr, accessory protein of human immunodeficiency virus type 1 (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1*): features of genetic variants of the virus circulating in the Moscow region in 2019–2020* 324**Svyatchenko V.A., Protopopova E.V., Legostaev S.S., Mikryukova T.P., Agafonov A.P., Loktev V.B.**Modeling of mixed infection with Zika and West Nile viruses (*Flaviviridae: Orthoflavivirus: Orthoflavivirus zikaense, Orthoflavivirus nilense*) *in vitro* and *in vivo* * 340**Marchenko V.A., Zelinskaya I.A., Mukhametdinova D.V., Toropova Ya.G., Galagudza M.M., Zhilinskaya I.N.**Endothelial protective properties of sacubitril-valsartan and drotaverine in influenza A(H1N1)pdm09 virus infection (*Orthomyxoviridae: Alphainfluenzavirus: Influenza A virus*) 349**Chanyshv M.D., Chernyshova A.S., Glushchenko A.G., Grishaeva A.A., Makashova V.V., Ponezheva Zh.B., Khafizov K.F., Akimkin V.G.**NGS Amplification Panel HCV-seq for Sequencing Hepatitis C Virus RNA (*Flaviviridae: Hepacivirus*)* 363

TO HELP THE VIROLOGIST

Muhacheva A.V., Baranova E.V., Bogyantseva M.P., Nechaeva E.A., Smolina M.P., Sarkisyan K.A., Jandimirova S.S., Shubina E.A.

The results of certification of Pharmacopoeial standard for smallpox vaccine 374

SHORT COMMUNICATION

Ersh A.V., Poltavchenko A.G., Ushkalenko N.D., Filatov P.V., Titova K.A., Odnoshevsky D.A., Sergeev A.I.A., Sergeev A.A.Detection of highly pathogenic orthopoxviruses (*Poxviridae: Chordopoxvirinae, Orthopoxvirus*) by dot immunoassay in a high-containment biological safety laboratory 388

ANNIVERSARY DATES

On the 80th anniversary of the birth of Oleg Ivanovich Kiselyov. 393

ОБЗОРЫ

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-291>

© КУЩ А.А., 2025



Скрытый гепатит В: распространенность и клиническая значимость. Роль в возникновении патологии печени и сочетанных вирусных инфекций

Кущ А.А.✉

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

Резюме

В обзоре рассмотрены вопросы, связанные со скрытым гепатитом В (СГВ), который возникает на поздней стадии хронического гепатита В (ХГВ) после клиренса HBsAg. В клинической практике СГВ обнаруживают по отсутствию HBsAg и по присутствию антител к HBsAg в сыворотке крови и часто называют «прошедшим» или «перенесенным» гепатитом В. Однако ДНК вируса гепатита В (ВГВ) остается в клетках печени, плохо выявляется рутинными методами диагностики и не может быть удалена с помощью имеющихся методов терапии. Данные о распространенности СГВ различаются, в то же время СГВ регистрируют во всех регионах мира, значительно чаще – в регионах с высокой распространенностью ВГВ. Получены данные об ассоциации СГВ с фиброзом, циррозом печени и гепатоклеточной карциномой (ГКК), свидетельствующие о повышенном риске неблагоприятного исхода ХГВ у пациентов с СГВ. СГВ ассоциируется не только с ГКК, но также со злокачественными опухолями других органов. Установлено, что СГВ связан с повышенным риском реактивации ВГВ у пациентов с коинфекциями другими вирусами, а также у онкологических больных, лечение которых включает иммуносупрессивную терапию. Реактивация ВГВ приводит к тяжелым последствиям и в отсутствие лечения – к смерти пациентов. Можно заключить, что для достижения цели, поставленной ВОЗ, по искоренению вирусного гепатита к 2030 г. необходимо решить проблему СГВ. Для этого следует создать новые, более чувствительные и информативные диагностические тесты, эффективные методы элиминации ДНК ВГВ, а также более глубоко изучить механизмы развития СГВ.

Ключевые слова: обзор; гепатит В; вирус гепатита В; скрытый гепатит В; цирроз печени; гепатоклеточная карцинома; сочетанные вирусные инфекции; реактивация вируса гепатита В

Для цитирования: Кущ А.А. Скрытый гепатит В: распространенность и клиническая значимость. Роль в возникновении патологии печени и сочетанных вирусных инфекций. *Вопросы вирусологии*. 2025; 70(4): 299–316. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-291> EDN: <https://elibrary.ru/gmsjsl>

Финансирование. Автор заявляет об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Благодарности. Автор выражает признательность И.Н. Хабичевой-Трагира за интерес к теме исследования, помощь в подборе литературы и анализ работы; О.В. Масаловой – за ценные экспертные замечания; К.И. Юрлову – за помощь в оформлении и подготовке рисунков.

Конфликт интересов. Автор декларирует отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

REVIEW

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-291>

Occult hepatitis B: Prevalence and clinical significance. Role in liver pathology and in viral coinfections

Alla A. Kushch✉

N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia

Abstract

The review examines issues related to occult hepatitis B virus infection (OBI), which occurs at a late stage of chronic hepatitis B (CHB) after HBsAg clearance. In clinical practice, OBI is detected by the absence of HBsAg and the presence of antibodies to HBcAg in the blood serum and is often referred to as «past» or «resolved» hepatitis B. However, hepatitis B virus (HBV) DNA remains in liver cells, is poorly detected by routine diagnostic methods, and cannot be removed by existing therapies. Data on the prevalence of OBI vary, but it is found in all regions of the world, much more often in regions with a high prevalence of HBV. Data on the association of OBI with fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC) have been obtained. It has been established that OBI is associated with an increased risk of HBV reactivation in patients with infections with other viruses, as well as in cancer patients whose treatment includes immunosuppressive therapy. HBV reactivation leads to severe consequences and, in the absence of treatment, death of patients. It can be concluded that to achieve the goal set by WHO for the eradication of viral hepatitis by 2030, it is necessary to solve the problem of OBI. In order to make this possible, it is essential to create new, more sensitive and informative diagnostic tests, effective methods of HBV DNA elimination, and to investigate the mechanisms of OBI development in more depth.

Keywords: review; hepatitis B; hepatitis B virus; occult hepatitis B; cirrhosis of the liver; hepatocellular carcinoma; viral coinfection; hepatitis B virus reactivation

For citation: Kushch A.A. Occult hepatitis B: Prevalence and clinical significance. Role in liver pathology and in viral coinfections. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2025; 70(4): 299–316.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-291> EDN: <https://elibrary.ru/gmsjsl>

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

Acknowledgement. The author expresses gratitude to I.N. Khabicheva-Tragira for her interest in the research topic, help in selecting literature and analysis of the study; O.V. Masalova for discussion and valuable expert comments; K.I. Yurlov for help in the design and preparation of illustrations.

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

Введение

Вирус гепатита В (ВГВ) может вызывать острые и хронические заболевания печени, которые представляют потенциальную угрозу для жизни. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), опубликованным в 2024 г., 254 млн человек хронически инфицированы ВГВ, ежегодно отмечается 1,2 млн новых случаев инфицирования и 1,1 млн смертей, в основном от цирроза печени и первичного рака печени¹, и эти показатели к 2030 г. могут увеличиться [1]. Против гепатита В более четырех десятилетий применяется безопасная и эффективная вакцина, однако концентрация противовирусных антител после вакцинации постепенно снижается до уровня ниже протективного, часть людей не отвечает на вакцинацию, что способствует появлению новых случаев заражения ВГВ и хронизации инфекции. Для выяснения причин этого явления необходимо более глубокое изучение вируса, его жизненного цикла и развития вызываемых им заболеваний.

Вирион ВГВ (частица Дейна) состоит из липидной оболочки, содержащей большой (L), средний (M) и малый (S) поверхностные белки, представляющие поверхностный антиген ВГВ – HBsAg. Внутри вириона расположен нуклеокапсид, состоящий из 120 димеров основного белка С (core) – НВс (HBcAg), содержащий вирусную ДНК и ковалентно прикрепленную полимеразу (Р) ВГВ (рис. 1 а) [2, 3]. Кроме того, геном ВГВ кодирует неструктурный регуляторный белок Х, который обнаруживают как в ядре, так и в цитоплазме инфицированных клеток [4, 5]. Геном ВГВ (около 3,2 кб) представлен частично двухцепочечной кольцевой расслабленной (релаксированной) ДНК, содержит четыре частично перекрывающиеся открытые рамки считывания (ORF): PreS1/PreS2/S, PreC/C, Р и Х, которые являются матрицами для образования четырех белков ВГВ – S, С, Р и Х (рис. 1 б).

Жизненный цикл ВГВ схематично представлен на рис. 2. Вирус, проникший в организм, достигает печени и прикрепляется к мембране гепатоцита, для чего преS1-домен взаимодействует с гепаран сульфатом – неспецифическим рецептором на поверхности гепатоцитов. Затем вирус с высокой аффинностью свя-

¹WHO. Hepatitis B; 2024. Доступно по: <https://who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>

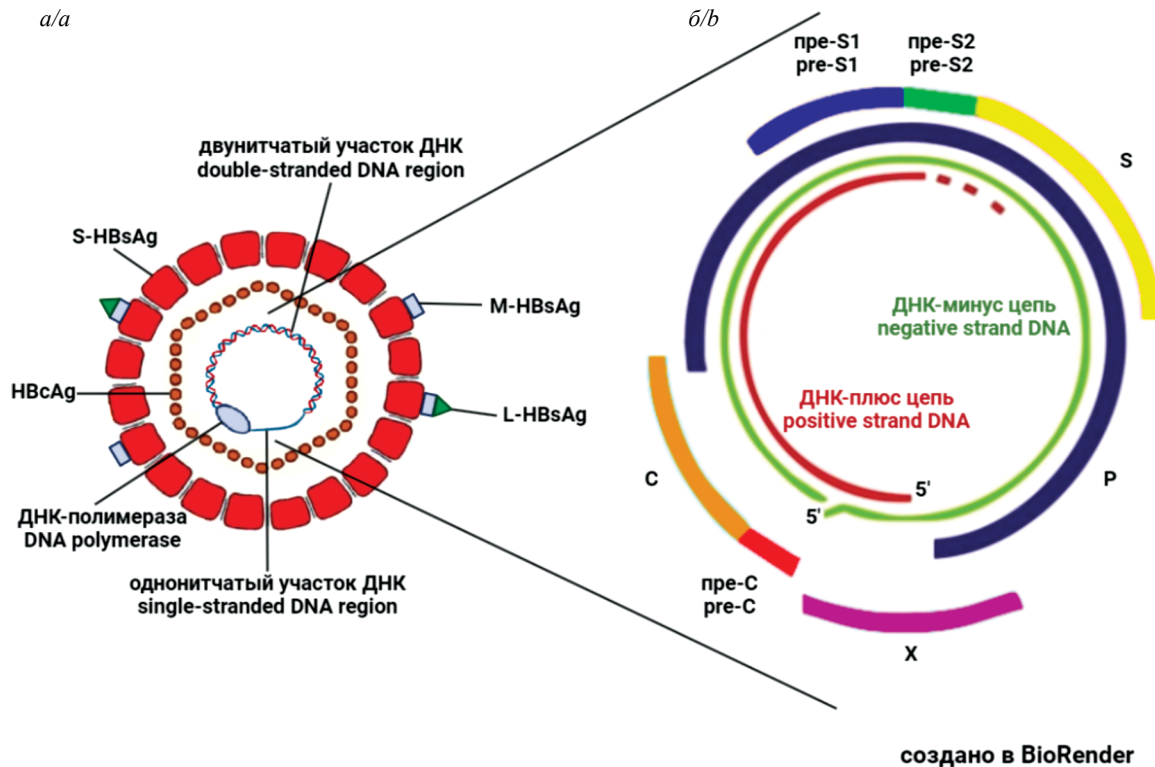


Рис. 1. Схематическое изображение структуры вируса гепатита В.
а – частица Дейна – вирион ВГВ; б – вирусный геном.

Fig. 1. Schematic representation of the hepatitis B virus structure.
a – the Dane particle – the HBV virion; b – the viral genome.

зывается с клеточным рецептором для ВГВ – NTCP (sodium taurocholate cotransporting polypeptide) [6]. Недавно было показано, что в проникновении вириона ВГВ в клетку важную роль играет также рецептор эпидермального фактора роста [7]. После интернализации путем эндоцитоза вирус теряет оболочку (uncoating) и частицы нуклеокапсида (core), содержащие релаксированную кольцевую ДНК (гсДНК) и вирусную полимеразу, транспортируются в ядро. В нуклеоплазме клеточные ферменты репарируют гсДНК и конвертируют ее в ковалентно замкнутую кольцевую ДНК (кзкДНК). кзкДНК ассоциируется с гистонами и негистоновыми белками с образованием мини-хромосомы [8]. кзкДНК транскрибируется клеточной РНК-полимеразой II с образованием набора вирусных матричных РНК, включая прегеномную РНК (pgРНК). Вирусные транскрипты затем транспортируются в цитоплазму и транслируются в 7 белков ВГВ: е-антиген (HBeAg), core (HBc), полимеразу (Pol), 3 поверхностных белка (большой – L-HBs, средний – М-HBs, малый – S-HBs), а также белок Х (HBx). Core-белки олигомеризуются вокруг вирусной полимеразы и pgРНК, и в результате реакции инкапсидации формируется капсид. В капсиде с участием Pol происходит обратная транскрипция pgРНК в гсДНК, вначале синтезируется комплементарная отрицательная одноцепочечная ДНК, затем – вторая положительная нить ДНК. Зрелые капсиды, содержащие гсДНК,

затем транспортируются в эндоплазматический ретикулум (ЭПР), где приобретают поверхностные белки. Сформированные таким образом вирионы выходят из инфицированной клетки путем экзоцитоза и могут заражать новые клетки. Некоторые из капсидов, содержащих гсДНК, могут транспортироваться обратно в ядро для поддержания пула кзкДНК (рис. 2) [9, 10].

Наряду с образованием и поддержанием в ядре эписомальной кзкДНК, необходимой для репликации вируса, уже на ранней стадии инфекции часто происходит интеграция ДНК ВГВ в геном хозяина [11, 12]. Интегрированный геном не способен к репликации, в то же время часть генов находятся в активном состоянии и накапливаются данные о роли интегрированной ДНК в развитии рака печени [13, 14].

Перинатальная инфекция ВГВ является серьезным заболеванием, при этом у 90% инфицированных младенцев острая инфекция переходит в хроническую форму [15]. Острая инфекция ВГВ у взрослых пациентов в большинстве случаев характеризуется спонтанным разрешением [16], при котором из периферической крови (ПК) исчезает HBeAg, снижается концентрация вирусной ДНК, отсутствуют серологические, биохимические и клинические признаки гепатита. В таких случаях говорят о «перенесенной» инфекции.

Т.И. Michalak и соавт. впервые показали, что после выздоровления от острого гепатита В в сыворотке

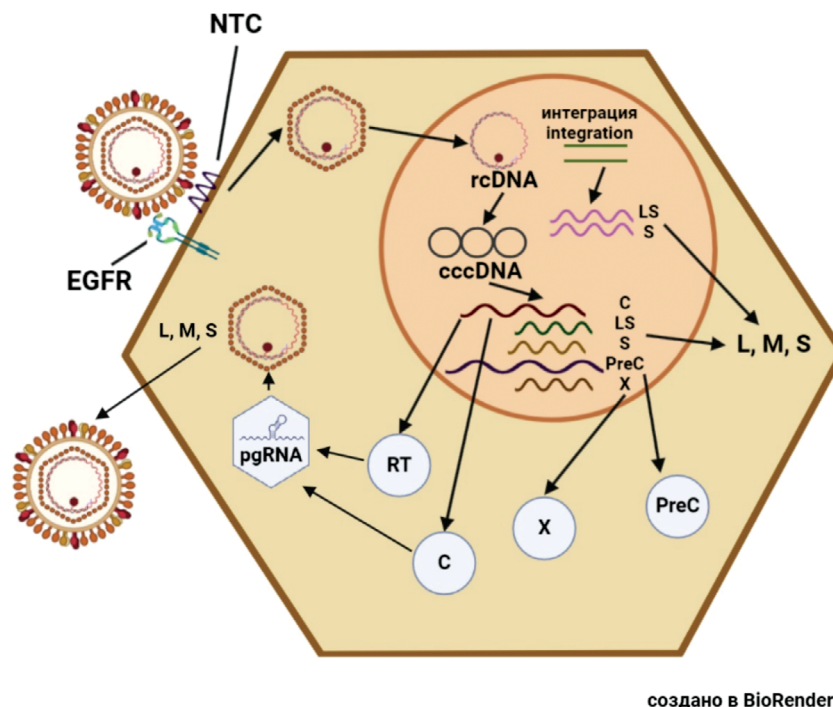


Рис. 2. Схематическое представление жизненного цикла вируса гепатита В в инфицированной клетке.

Пояснения в тексте.

Fig. 2. Schematic diagram of the hepatitis B virus life cycle in an infected cell.

Explanations in the text.

крови и мононуклеарных клетках ПК может длительно (до 70 мес) выявляться ДНК ВГВ. Авторы заключили, что исчезновение HBsAg из сыворотки крови, выработка анти-HBs-антител и даже нормализация функции печени могут не отражать полного выздоровления от инфекции, вызванной ВГВ [17]. Это заключение было подтверждено многочисленными дальнейшими исследованиями, которые показали, что современные методы лечения гепатита В не обеспечивают полную эрадикацию вируса [18, 19]. Это связано с особенностями жизненного цикла вируса и динамикой инфекционного процесса.

Сразу после заражения ВГВ ДНК вируса и HBsAg могут не определяться в сыворотке/плазме крови, но передаваться реципиентам. Пример описан в работе [20], авторы которой обследовали двух доноров крови и не обнаружили ни HBsAg, ни ДНК ВГВ. Однако у реципиентов крови от этих доноров выявили ВГВ. У обоих доноров впоследствии появился HBsAg и развился острый гепатит. По данным других авторов [21], период «диагностического окна» может составлять от 19 до 35 сут. В подтверждение авторы привели данные о том, что через 35 сут после получения материала от донора в нем не определились ни HBsAg, ни ДНК ВГВ, однако у реципиента развилась инфекция ВГВ штаммом вируса, идентичным штамму, который был детектирован позже у донора. Сходные данные приводят И.Ф. Голубева и соавт., которые заключили, что HBsAg в большинстве случаев обнаруживается в инкубационном периоде

через 3–5 нед от момента инфицирования [22]. Считается, что в «периоде окна» – до того, как ДНК ВГВ появится в крови, наиболее сложно определить инфекцию.

Скрытый период, не обнаруживаемый рутинным тестированием, может возникнуть как на ранней стадии, так и на более поздней стадии инфекции (рис. 3).

HBsAg – ранний серологический маркер ВГВ-инфекции, уровень которого значительно повышается при вступлении в активную фазу, характеризующуюся также высоким уровнем репликации ДНК ВГВ, синтезом и появлением в плазме крови HBcAg и HBeAg (рис. 3). Обнаружение HBsAg в крови через 6 мес и более после заражения означает переход инфекции в хроническую стадию, при которой происходит сероконверсия с появлением в крови противовирусных антител: анти-HBs, анти-HBc, анти-HBe [23]. Хронический гепатит В (ХГВ) может длиться годами.

С появлением методов детекции ДНК ВГВ (в 1980-х гг.) накопились данные, показавшие, что HBsAg-отрицательные [HBsAg(-)] гепатиты встречаются как в эндемичных регионах, где ХГВ регистрируют с высокой частотой (> 8%), так и в регионах с относительно низким уровнем ХГВ (< 2%) [24]. Хронические гепатиты у пациентов с HBsAg(-), но с ДНК ВГВ(+) стали называть скрытыми, или оккультными (occult).

К 2017 г. многочисленные данные по HBsAg(-)-гепатитам привели Европейскую ассоциацию по изучению печени (EASL) к пересмотру классификации хро-

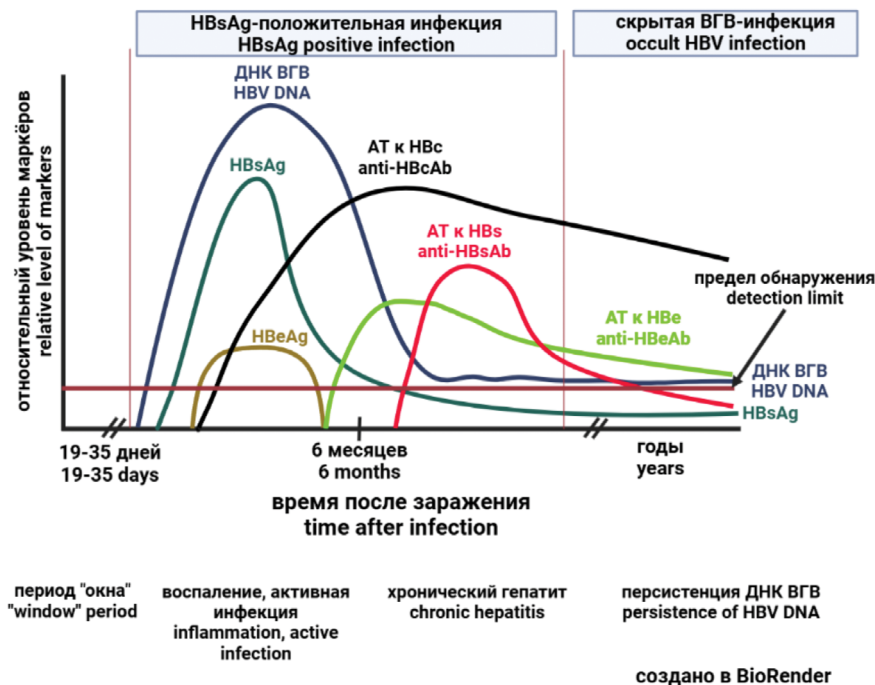


Рис. 3. Изменения уровней серологических маркеров гепатита В в динамике ВГВ-инфекции.

Пояснения в тексте.

Fig. 3. Changes in the levels of hepatitis B serological markers in the dynamics of HBV infection.

Explanations in the text.

создано в BioRender

нических гепатитов, которая ранее включала 4 стадии инфекции. Стадии/фазы ХГВ стали обозначать следующим образом: I – HBeAg-положительная хроническая инфекция, II – HBeAg-положительный хронический гепатит, III – HBeAg-отрицательная хроническая инфекция, IV – HBeAg-отрицательный хронический гепатит, V – HBsAg-отрицательная фаза [25]. Во время фазы V HBsAg не определяется в ПК, но вирусный геном остается в клетках печени и может реплицироваться на низком уровне либо находиться в виде интегрированной ДНК ВГВ в хромосомах человека. Это состояние определяется как оккультный гепатит В [25, 26].

В Руководстве EASL дано определение скрытого (occult) гепатита В (СГВ) по следующим параметрам [24]: отрицательный HBsAg в сыворотке крови; присутствие антител к соге-антигену ВГВ (анти-HBc); нормальные показатели аланинаминотрансферазы; присутствие или отсутствие ДНК ВГВ в сыворотке крови, но обязательное присутствие кзкДНК ВГВ, способной к репликации, в печени пациентов. В случаях, когда HBsAg присутствует, но не определяется с помощью доступных коммерческих тестов, например, из-за мутаций в гене S, ХГВ не может быть отнесен к V форме ХГВ – СГВ [27].

В конце декабря 2024 г. Минздрав России одобрил обновленные Клинические рекомендации по хроническому вирусному гепатиту В, разработанные Национальной ассоциацией специалистов по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского и Российским обществом по изучению печени. Клас-

сификация ХГВ по фазам инфекционного процесса совпадает с той, которая приведена выше [24]. Пятая фаза инфекции обозначена как «HBsAg-негативная фаза (скрытая HBV-инфекция)»².

Цель обзора - обобщить имеющиеся данные о СГВ, обратить внимание на значимость СКВ и реактивации вируса при заболеваниях печени и других органов, обозначить проблемы, требующие дальнейшего изучения, а также указать на перспективы их решения.

Распространенность скрытого гепатита В

Оценка распространенности СГВ значительно варьирует в работах разных авторов и, как отмечается, зависит от распространенности вируса в разных регионах мира. Определение СГВ проводят среди разных групп населения, в том числе в общей популяции, среди практических здоровых людей, среди пациентов с ХГВ и другими заболеваниями печени, а также в группах повышенного риска по реактивации ВГВ и неблагоприятному исходу заболевания. В таблице представлены данные, полученные при изучении двух популяций в разных странах и регионах мира: общей популяции, а также популяции доноров – наиболее часто и тщательно обследуемой популяции. Приведены результаты отдельных исследований, а также данные метаанализа СГВ.

Данные, представленные в таблице, показали, что распространенность СГВ в общей популяции при

²Рубрикатор клинических рекомендаций. Доступно по: <https://cl.minzdrav.gov.ru>

Таблица. Распространенность скрытого гепатита В в общей популяции и в популяции доноров крови среди населения в разных регионах и странах мира

Table. Prevalence of occult hepatitis B in the general population and in the blood donor population in different regions and countries of the world

Регион/Страна Region/Country		Обследованный контингент Surveyed contingent	Распространенность СГВ ¹ (%) Prevalence of OBI ¹ (%)	Тест на ДНК ВГВ, предел определения HBV DNA test, detection limit	Ссылка Reference
Китай China		Общая популяция General population	6/52 (11,5)	Гнездовая ПЦР Nested PCR	[28]
		Доноры крови Blood donors	31/44 256 (0,070)	Гнездовая ПЦР, ≤ 6 МЕ/мл Nested PCR, ≤ 6 IU/ml	[29]
Западная Европа и Северная Америка Western Europe and North Amer- ica		Общая популяция General population	92/329 (28) ²	ПЦР, разные тесты и пределы определения в разных стра- нах: 1,69–154 МЕ/мл	[30]
	34 страны ⁴ 34 countries ⁴	Общая популяция General population	1159/3 667 171 (0,82)	PCR, various tests and detection limits in different countries:	[31]
	25 стран ⁵ 25 countries ⁵	Доноры ³ Donors ³	> 10 000 000 (0,05)	1.69–154 IU/ml	[32]
Вьетнам Vietnam		Общая популяция General population	7/58 (12)	Гнездовая ПЦР, ≤ 10 МЕ/мл Nested PCR, ≤ 10 IU/ml	[33]
		Доноры крови Blood donors	2/623 (0,3)	Гнездовая ПЦР, 30–40 копий/ мл Nested PCR, 30–40 copies/ml	[34]
Африка Africa	Гамбия Gambia	Общая популяция General population	31/330 (9,4)	Гнездовая ПЦР, < 5 МЕ/мл Nested PCR, < 5 IU/ml	[35]
	Камерун Cameroon	Доноры крови Blood donors	11/240 (4,5)	ПЦР _{рв} , 25 МЕ/мл qPCR, 25 IU/mL	[36]
	6 стран Африки ⁶ 6 African countries ⁶	Общая популяция General population	> 1 000 000 (13,3) (0–35,6)	ПЦР, разные тесты и пределы определения в разных странах PCR, different tests and detec- tion limits in different countries	[31]
	Разные регионы Африки Various regions of Africa	Доноры крови ³ Blood donors ³	(3,18) ⁷	ПЦР, разные тесты и пределы определения в разных странах PCR, different tests and detec- tion limits in different countries	[37]
		Общая популяция General population	0/544 (0)	ПЦР _{рв} , 100 МЕ/мл qPCR, 100 IU/mL	[38]
Россия Russia		Доноры крови Blood donors	76/2788 (2,85)	Гнездовой ПЦР _{рв} Nest PCR	[39]
		Доноры крови Blood donors	7/2492 (0,28)	ПЦР, 100 копий/мл PCR, 100 copies/ml	[40]

Примечание. 1 – отсутствие HBsAg, присутствие анти-НВс и ДНК ВГВ в сыворотке/плазме крови; 2 – образцы биопсии печени; 3 – мета-анализ данных; 4 – страны Европы, Африки, Северной и Южной Америки, Азии; 5 – страны Европы, Азии, Африки, Северной и Южной Америки, Океании; 6 – Ботсвана, Буркина-Фасо, Египет, Нигерия, Южная Африка, Уганда; 7 – в 86 публикациях представлены результаты обследования 4 074 603 доноров крови, количество доноров с СГВ изучено в 14 публикациях, общее количество доноров с СГВ указано только в процентах. ПЦР – полимеразная цепная реакция; ПЦР_{рв} – количественная ПЦР в реальном времени.

Note. 1 – absence of HBsAg, presence of anti-HBc and HBV DNA in serum/plasma; 2 – liver biopsy samples; 3 – meta-analysis of data; 4 – countries of Europe, Africa, North and South America, Asia; 5 – countries of Europe, Asia, Africa, North and South America, Oceania; 6 – Botswana, Burkina Faso, Egypt, Nigeria, South Africa, Uganda; 7 – 86 publications present the results of a survey of 4074,603 blood donors, the number of donors with OBI was studied in 14 publications, the total number of donors with OBI is indicated only as a percentage. qPCR – quantitative real-time PCR.

изучении сывороток крови значительно варьирует: от 0% (среди 540 здоровых жителей России в г. Москве) и 0,82% (среди более 3 млн обследованных людей в 34 странах мира) до 11,5% в Китае, 12% во Вьетнаме и 9,4–13,3% в странах Африки. Эти данные подтверждают связь распространенности СГВ с уровнем эндемичности ВГВ. Самая высокая распространен-

ность ВГВ наблюдается в Азиатско-Тихоокеанском и Африканском регионах, где проживает более ½ населения Земного шара. По данным ВОЗ, в 2022 г. на

³WHO. Global Hepatitis Report 2024. Action for access in low- and middle-income countries; 2024. Доступно по: <https://who.int/publications/b/68511>

эти регионы приходилось не менее 63% новых случаев инфицирования ВГВ во всем мире и приблизительно 1,08 млн смертей³. Это отражается на высокой распространенности СГВ: например, в Китае, по оценке R. Xia (2022), проживают 21 млн человек с СГВ [41]. Следует особо отметить, что при изучении образцов печени СГВ определяется значительно чаще, чем в сыворотках крови. Так, в результате изучения образцов печени в Западной Европе и Северной Америке СГВ выявили в общей популяции в 28% случаев, тогда как при анализе сывороток крови из 34 стран – в 34 раза реже – в 0,82% случаев (таблица). Принципиально сходные данные получены Y.R. Im и соавт. (2022) в результате метаанализа: распространенность маркеров СГВ в 140 518 289 образцах сыворотки или плазмы крови составила в среднем 0,09%, а в 2598 образцах печени – 34,8% [42]. По оценке авторов [43], данные об определении ДНК ВГВ в печени представлены лишь в 10% от всех опубликованных работ по СГВ. Можно предположить, что распространенность СГВ значительно шире, чем известно в настоящее время на основании анализа только сыворотки или плазмы крови.

Сравнительный анализ данных таблицы показал, что среди доноров крови практически во всех регионах и странах мира частота определения СГВ была значительно ниже, чем в общей популяции (от 2–4 до 100 раз и более), однако и в этой популяции наблюдалась значительная вариабельность данных. По данным метаанализа G.R. Takuissu и соавт. (2022), распространенность СГВ среди доноров крови варьировала от 0,7% (в Европе) до 16,7% (в Юго-Восточной Азии с высокой эндемичностью ВГВ) и в целом составила 6,2% [44]. Эксперты признают, что переливание крови от доноров с СГВ создает риск передачи ВГВ, остаточный риск передачи оценивается в 3–14% [45]. Для предотвращения передачи вируса рекомендуют проводить скрининг доноров крови с использованием высокочувствительных серологических и молекулярных тестов [32].

Следует отметить, что имеющиеся в настоящее время данные не позволяют судить о глобальной распространенности СГВ в общей популяции, поскольку размер обследованных групп относительно невелик, особенно для больших стран. Кроме того, в исследованиях используют тесты с разной чувствительностью, стандарты пока не введены, что затрудняет сравнительную оценку полученных результатов.

Наибольшее количество работ посвящено анализу популяций высокого риска развития гепатита В. К ним относятся: пациенты с ХГВ и другими заболеваниями печени; пациенты, находящиеся на гемодиализе; онкологические больные; пациенты, коинфицированные ВГВ и другими вирусами, а также лица со сниженным иммунитетом. Результаты анализа СГВ в группах высокого риска обобщены в нескольких работах последних лет. Анализ СГВ в западных странах с относительно низким уровнем ХГВ показал очень большую вариабельность данных: у пациентов с криптогенным циррозом или прогрессирующим

фиброзом печени распространенность СГВ колебалась от 4 до 38%; среди ВИЧ-инфицированных пациентов – от 0 до 45%; у пациентов на гемодиализе – от 0 до 54%; у пациентов, коинфицированных ВГС, – около 52%, и даже среди доноров крови, которые представляют группу низкого риска, распространенность СГВ составляла от 0 до 22,7% [46].

Оценка встречаемости СГВ в 34 странах и регионах показала [31], что распространенность СГВ значительно отличается в группах повышенного риска от таковой в общей популяции. Так, в общей популяции метаанализ определил частоту встречаемости СГВ в среднем в 0,82%, тогда как среди пациентов с заболеваниями печени – в 13,99%, среди людей с ВИЧ-инфекцией – в 16,26%, среди пациентов на гемодиализе – в 4,25%. Y.R. Im и соавт. (2022) сравнивали распространенность СГВ в странах с различной эндемичностью ВГВ. Метаанализ показал, что в странах с низким уровнем эндемичности в популяции доноров крови распространенность СГВ составила в среднем 0,06%, в странах с высокой эндемичностью – 0,98% [42]. Оценка распространенности СГВ в группах высокого риска, проведенная этими авторами, выявила более высокие значения: в странах с низким уровнем эндемичности она составила 5,5%, в странах с высоким уровнем эндемичности – 12,0% [42].

Метаанализ СГВ в группах высокого риска в Египте показал высокую частоту встречаемости СГВ: если в общей популяции она составляла от 1,26 до 4,16% [47], то у пациентов, находящихся на гемодиализе, – 17%, у пациентов с множественными трансфузиями – 41%, у пациентов с хроническим гепатитом С – 15%, у пациентов с раком печени – 31% и у пациентов с циррозом печени – 13% [48]. Среди пациентов, инфицированных ВИЧ, в разных регионах Африки СГВ определили в среднем в 11,2% случаев [49]. Отметим, что в Мексике СГВ встречался среди ВИЧ-инфицированных пациентов гораздо чаще – у 18/50 (36%) [50], чем в среднем среди доноров крови – в 6,4% случаев [51].

В России, так же как и в других странах, распространенность СГВ была неодинаковой в разных группах населения. Например, среди 544 здоровых жителей Москвы СГВ не определили ни у одного человека (таблица), тогда как среди гематологических больных эти же авторы обнаружили СГВ у 5 из 129 (3,9%) пациентов [38]. Значительно чаще – в 7/35 (20%) случаях, выявили СГВ у пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта [52]. Оценка распространенности СГВ среди доноров крови одними авторами показала присутствие маркеров СГВ у 76/2788 доноров (2,85%) [39]; тогда как другие авторы определяли СГВ среди доноров крови в 10 раз реже – в 7/2492 (0,28%) случаев [40]. В то же время среди лиц, принимающих психоактивные вещества (ПАВ), эти же авторы обнаруживали СГВ почти в 18 раз чаще – в 3/62 (4,94%) случаев.

Важные данные были получены на основании 76 исследований СГВ в когортах лиц, вакцинированных против гепатита В. СГВ был определен у 1–37% пол-

ностью вакцинированных лиц, в том числе у детей, родившихся от вакцинированных матерей [53]. Это означает что, несмотря на значительный успех всеобщей программы вакцинации против ВГВ, нельзя исключить реактивацию вируса при СГВ, и для исчезновения вируса и СГВ в человеческой популяции необходимо внедрять в клиническую практику более эффективные вакцины против ВГВ.

Суммируя данные, приведенные выше, можно констатировать значительную вариабельность результатов по распространенности СГВ. Эти расхождения могут объясняться целым рядом обстоятельств, среди которых:

- небольшие размеры выборки во многих, если не в большинстве работ; обследование населения из стран и географических регионов с различной эндемичностью по гепатиту В;
- анализ гетерогенных популяций, различающихся по полу, возрасту и степени риска развития неблагоприятного течения гепатита В;
- обследование пациентов с различными заболеваниями печени и на разных стадиях патологического процесса, в том числе с криптогенным циррозом и прогрессирующим фиброзом печени;
- присутствие других заболеваний, в том числе парентеральных вирусных инфекций ВГС- и ВИЧ-этиологии;
- использование методик и тест-систем с разной чувствительностью и специфичностью определения HBsAg и ДНК ВГВ в печени и/или в сыворотке крови, что не исключает получения ложноположительных и ложноотрицательных результатов;
- различная природа биологического материала: сыворотка/плазма крови, клетки крови (РВМС), биоптаты печени, парафиновые срезы печени;
- использование неодинакового (часто – недостаточно полного) набора маркеров при определении СГВ.

Клиническая значимость скрытого гепатита В

Мнения исследователей относительно клинической значимости СГВ неоднозначны. Отсутствие HBsAg в сыворотке/плазме крови у больных ХГВ нередко рассматривается как завершение заболевания, в том числе после лечения [54–56].

В то же время во многих работах приводятся данные о негативном влиянии СГВ на клиническое состояние пациентов с ХГВ и об ассоциации СГВ с неблагоприятными исходами ХГВ [57, 58]. Отмечают, что люди со скрытой ВГВ-инфекцией могут заражать других людей и что эта форма инфекции может быть связана с серьезными осложнениями, такими как цирроз печени и гепатоклеточная карцинома (ГКК) [59].

Скрытый гепатит В при фиброзе и циррозе печени

У пациентов с СГВ, как правило, подавлена репликация ВГВ и определяется низкая вирусная нагрузка, обычно менее 200 международных единиц (МЕ) в 1 мл плазмы/сыворотки крови [47]. Тем не менее обследование пациентов с ХГВ показало, что присутствие

ДНК ВГВ при отсутствии HBsAg может ассоциироваться с тяжелым течением гепатита В, развитием фиброза и цирроза печени. Так, при обследовании 83 пациентов с СГВ у 52 (62,6%) был обнаружен фиброз печени [60]. X. Tang и соавт. (2023) [61] обследовали 1772 пациентов с фиброзом печени и определили, что у 148 из них (8,4%) имелся СГВ. Сравнительный анализ показал, что у пациентов с СГВ уровни всех показателей фиброза (гиалуриновой кислоты (НА), ламинина, проколлагенового пептида III типа (PCIII), коллагена IV типа (CIV) и индекса патологической гистологической активности (НАИ)) были значительно выше, чем у 1624 пациентов с фиброзом, но без СГВ ($p < 0,05$). Кроме того, ДНК ВГВ значительно чаще обнаруживалась в клетках биопсии печени методом гибридизации *in situ* у пациентов с СГВ, чем у пациентов без СГВ (80,6% против 37,5%). Авторы заключили, что СГВ ассоциируется с тяжелой формой фиброза печени.

Обследование пациентов показывает, что по крайней мере у 10% людей этиология хронических заболеваний печени остается неустановленной [62]. В таких случаях заболевания печени, в том числе цирроз, называют «криптогенными» [63]. Описаны попытки определить присутствие СГВ у пациентов с криптогенными хроническими заболеваниями печени. В Иране определили СГВ у 2/104 (1,9%) пациентов с криптогенным хроническим гепатитом [64]. Отметим, что для анализа ДНК ВГВ использовали вариант метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с низкой чувствительностью – 150×10^3 копий/мл. Другие авторы из Ирана обнаружили СГВ у 11 из 29 (38%) пациентов с криптогенным циррозом печени. ДНК ВГВ определяли методами ПЦР в реальном времени и гнездовой ПЦР, концентрация ДНК у пациентов с СГВ варьировала от 22 до 7138 копий/мл [65]. Еще в одной работе из Ирана у 7 из 50 (14%) пациентов с криптогенным циррозом печени в сыворотке крови выявили ДНК ВГВ и значительно повышенный уровень трансаминаз. В контрольной группе ни у одного из 80 здоровых волонтеров ДНК ВГВ в сыворотке не обнаружили. Использовали гнездовую ПЦР с чувствительностью обнаружения ДНК ВГВ в сыворотке крови 19 МЕ/мл [66]. Одним из возможных объяснений значительной вариабельности результатов из одной по эндемичности страны может быть разный состав групп пациентов, а также разные по чувствительности методы определения вирусной ДНК.

Анализ причин цирроза печени у 111 пациентов [67] показал присутствие у 66 пациентов в сыворотке крови маркеров гепатита В – HBsAg и анти-HBs, у 18 пациентов серологические маркеры вирусных гепатитов не обнаружили и обозначили их как больных с криптогенным циррозом. Изучение ДНК ВГВ показало ее присутствие в сыворотке крови у 7/18 (38,9%) пациентов, что позволило установить диагноз у этих больных. Для установления причин цирроза печени у 68 пациентов, перенесших трансплантацию печени, анализировали замороженные образцы печени, и у 3 (4,4%) пациентов определили СГВ, при этом у 2/3 пациен-

тов с циррозом предварительно причина заболевания не была установлена [68]. Позже эти же авторы изучали образцы биопсии печени от 104 HBsAg-негативных пациентов с различными заболеваниями печени неустановленной этиологии и у 7/104 пациентов (6,7%) определили ДНК ВГВ. Авторы заключили, что для установления диагноза при криптогенных заболеваниях печени необходимо использовать тесты, позволяющие определять низкие концентрации вирусной ДНК, характерные для СГВ [69].

Цирроз печени приблизительно в 42% случаев коррелирует с ВГВ-инфекцией [42] и является наиболее важным фактором, способствующим развитию рака печени [70]. Согласно данным крупномасштабных ретроспективных исследований, у пациентов с циррозом, несмотря на клиренс HBsAg, риск развития ГМК в 2–10 раз выше, чем у пациентов без цирроза [71–74]. Это показывает, что цирроз печени, ассоциированный со СГВ, может быть предраковым состоянием [75].

Скрытый гепатит В и гепатокарцинома

ГМК являлась одним из 6 наиболее распространенных видов рака и 3-й по значимости причиной смертности от рака во всем мире в 2020 г. [76]. В Китае первичный рак печени является 5-м по распространенности видом рака и занимает 2-е место по уровню смертности [77].

Как уже упоминалось в разделе «Введение», интеграция ДНК ВГВ часто происходит на ранней стадии инфекции, но может происходить и на более поздних этапах, в том числе у пациентов с клиренсом HBsAg [11]. Интегрированные последовательности ВГВ, обнаруженные в большинстве (70–90%) ГМК, связанных с ХГВ [78], могут вызывать инсерционный мутагенез и геномные перестройки, однако регуляторные механизмы этих процессов пока недостаточно изучены [79, 80].

Представляют интерес данные о развитии ГМК у пациентов с СГВ. Китайские исследователи отметили спонтанный клиренс HBsAg у 55 из 1355 пациентов с ХГВ. За 23 мес наблюдения у 18/55 (32,7%) развились серьезные осложнения, в том числе у 11 (20%) – ГМК. Авторы заключили, что отсутствие HBsAg не исключает риск развития ГМК [81]. В другой работе определили сероклиренс HBsAg у 298 пациентов с ХГВ, и у всех была обнаружена ДНК ВГВ в печени. В сыворотке крови ДНК ВГВ была выявлена у 13,4% в течение 1 года, у 6,1% – через 5–10 лет и у 3,7% пациентов – более чем через 10 лет после исчезновения HBsAg; у 7 пациентов (2,4%) наблюдали развитие ГМК. Определили, что риск развития фиброза печени и ГМК был выше у пациентов с СГВ в возрасте старше 50 лет ($p = 0,004$) [82]. Т.С. Yip и соавт. (2017) [83] наблюдали сероклиренс HBsAg у 4568 пациентов после лечения аналогами нуклеозидов или интерфероном. Через 1–5 лет у 54 пациентов (1,2%) диагностировали ГМК. Результаты исследования показали, что после исчезновения HBsAg риск развития ГМК выше у женщин старше 50 лет и у мужчин в любом возрасте.

Длительная терапия, подавляющая активность ДНК ВГВ, может снизить частоту возникновения ГМК и смертность, однако полное излечение ХГВ в настоящее время практически невозможно, поскольку на сегодняшний день нет способов надежно элиминировать интегрированную вирусную ДНК из генома человека [84, 85]. В этой связи в Руководстве Американской ассоциации по изучению заболеваний печени (AASLD) и EASL используется термин «функциональное излечение», которое определяется как устойчивое отсутствие HBsAg и количество ДНК ВГВ в сыворотке крови ниже предела количественного определения через 24 нед после начала лечения [86]. Сходное определение – «функциональный ответ» на лечение, приведено в клинических рекомендациях, утвержденных в России в 2024 г.²

В то же время опубликованы данные, которые показывают, что после лечения пациентов с ХГВ и подавления активности вируса риск ГМК остается. Следует отметить, что частота развития ГМК у пациентов после сероклиренса HBsAg в сообщениях разных авторов сильно различается и составляет от 0 до 20% [85, 87, 88].

Во многих работах последних лет указывается, что у пациентов с СГВ наблюдается повышенный риск ГМК [89, 90]. Результаты исследования D.K.H. Wong и соавт. показали, что большинство (69%) HBsAg-негативных пациентов с ГМК имели СГВ, из них у 29 пациентов выявили кзкДНК в клетках печени и у 43 пациентов – ДНК ВГВ, интегрированную в ДНК гепатоцитов вблизи онкогенов [90]. В другой работе у 90/251 (35,8%) пациентов с СГВ диагностировали ГМК и очаговое поражение печени [91]. Важно, что среди пациентов с криптогенной ГМК у 73% определили СГВ, причем ДНК ВГВ чаще обнаруживали в тканях, прилегающих к опухоли [92].

Можно заключить, что при отсутствии HBsAg и определении ДНК ВГВ сохраняется риск развития ГМК, и это требует наблюдения пациентов с СГВ для раннего выявления опухоли. Кроме того, исследователи отмечают, что изучение СГВ при заболеваниях печени имеет решающее значение для достижения цели ВОЗ по искоренению вирусного гепатита к 2030 г. [56].

Накапливаются данные о роли СГВ не только в опухолях печени, но также в злокачественных опухолях других органов [93]. В одной из работ у 4 из 5 пациентов с раком поджелудочной железы, в сыворотках крови которых HBsAg отсутствовал, но присутствовали анти-HBc, в опухолевой ткани выявили экспрессию гена Х ВГВ. У 3 пациентов в клетках поджелудочной железы определили кзкДНК ВГВ, у одного – интегрированную ДНК ВГВ [94]. Авторы полагают, что основой канцерогенеза могли послужить фрагменты интегрированной вирусной ДНК и экспрессия HBx.

Указывают на связь ВГВ с высоким риском развития В-клеточных лимфом, особенно в странах, где ВГВ является эндемичным [95]. Обследование пациентов с ВГВ и В-клеточной лимфомой показало, что химиотерапия и иммунотерапия ритуксимабом

излечивают 60–65% пациентов, однако пациенты, которые не отвечают на терапию, имеют неблагоприятный прогноз [96, 97]. Метаанализ работ из разных регионов мира показал, что вероятность развития неходжкинских лимфом у ВГВ-инфицированных людей в 2–3 раза выше, чем у неинфицированных [98, 99].

Это означает, что пациентов со злокачественными лимфопролиферативными заболеваниями, в том числе с лимфомами, следует обследовать на присутствие маркеров ВГВ-инфекции до начала терапии, а также проводить мониторинг реактивации ВГВ, часто наблюдаемой в результате комплексной терапии лимфом.

Реактивация вируса гепатита В при сочетанных инфекциях и в ходе иммуносупрессивной терапии

Реактивация ВГВ происходит в большинстве случаев у лиц с ХГВ или СГВ при снижении иммунитета, которое наблюдается: 1) в пожилом возрасте (старше 60 лет), причем чаще у мужчин, и с тяжелыми последствиями гепатита (цирроз); 2) у пациентов, коинфицированных другими патогенами; 3) у пациентов с онкологическими и другими заболеваниями, получающих иммуносупрессивную терапию. Ниже рассмотрены работы, которые подтверждают эти наблюдения.

Коинфекция ВГВ и вируса гепатита С (ВГС). По данным Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA), в 2013–2016 гг. в 29 случаях регистрировали реактивацию ВГВ у пациентов с гепатитом С, получавших препараты прямого противовирусного действия (ПППД). Один пациент скончался, другому потребовалась пересадка печени [100]. Позже у пациентов с СГВ, инфицированных ВГС, реактивацию ВГВ после лечения ПППД выявляли в среднем в 3% случаев [101]. Сходные данные получены в другой работе [102]: через 3 мес после лечения гепатита С софосбувиром и даклатасвиром у 4/140 пациентов (2,8%) наблюдали реактивацию ВГВ. Значительно чаще – у 81/111 (73%) пациентов с гепатитом С и СГВ – регистрировали реактивацию ВГВ после лечения ледипасвиром и софосбувиром. Клинические проявления гепатита наблюдали у 10 из 111 (9%) пациентов [103]. Реактивацию ВГВ наблюдали у пациентки с СГВ, получавшей ибрутиниб [104]. После лечения гепатита С ПППД реактивация ВГВ чаще происходила у пациентов с текущей коинфекцией ВГВ – у 10/29 (34,5%) пациентов, но также, хотя и значительно реже, у пациентов с прошедшей ВГВ-инфекцией (СГВ) – у 3/228 (1,3%) [105]. Напротив, S. Meschi и соавт. [106] сообщили о том, что среди 137 пациентов с коинфекцией ВГВ/ВГС реактивация ВГВ возникла у 10% пациентов с активным гепатитом В и у 90% – с перенесенной (СГВ) инфекцией. Авторы использовали высокочувствительные тесты и считают, что для анализа риска реактивации ВГВ необходимо определять не только HBsAg, но и ДНК ВГВ. С этим не согласны Q. Maqsood и соавт. (2023), которые показали, что для прогнозирования реактивации ВГВ такие маркеры, как ДНК ВГВ и прегеномная РНК ВГВ, не эффектив-

ны, а в качестве биомаркера реактивации ВГВ может быть использован только титр HBsAg [107]. Все авторы считают, что риск реактивации ВГВ при коинфекции с ВГС высок, и это объясняется тем, что ВГС ингибирует репликацию ВГВ, тогда как подавление ВГС в результате лечения ПППД может приводить к реактивации ВГВ [106, 108]. Эти предположения соответствуют действующим рекомендациям, согласно которым все пациенты с ВГС, которым планируется лечение ПППД, должны пройти скрининг на HBsAg и ДНК ВГВ [109].

Новая коронавирусная инфекция. COVID-19 был признан еще одной причиной реактивации ВГВ, поскольку его лечение включает введение высоких доз кортикостероидов и/или некоторых иммуносупрессивных препаратов. Так, при обследовании пациентов с тяжелым COVID-19 и маркерами СГВ, которые получали иммуносупрессивный препарат тоцилизумаб, у 2/23 пациентов (9,7%) обнаружили реактивацию ВГВ. Авторы сделали вывод, что в таких случаях следует проводить профилактику энтекавиром [110]. С этими результатами согласуются данные о реактивации ВГВ у 4/23 (17,4%) пациентов с COVID-19, получавших иммунодепрессанты: у 1/8 (12,5%) HBsAg-позитивных пациентов и у 3/15 (20%) с СГВ [111]. Авторы рекомендуют у всех пациентов с COVID-19, получающих иммуносупрессивную терапию, тестировать 3 маркера ВГВ-инфекции – HBsAg, анти-HBs, анти-HBc, и по показаниям проводить профилактику реактивации ВГВ.

ВИЧ-инфекция. Реактивации ВГВ при СГВ способствует снижение иммунитета при ВИЧ-инфекции. Обобщение результатов 50 исследований показало, что глобальная распространенность СГВ у детей и подростков составила 7,5%, тогда как среди ВИЧ-инфицированных оказалась в 3 раза больше – 24,2% [112]. Реактивацию ВГВ наблюдали в большой группе ВИЧ-инфицированных женщин до проведения антиретровирусной терапии. У 8/400 (2%) пациенток обнаружили СГВ. Результаты исследования показали, что у ВИЧ-инфицированных пациенток с СГВ чаще развивалась иммуносупрессия (количество CD4-клеток < 200 клеток/мм³) и наблюдался более высокий уровень РНК ВИЧ [113].

Онкологические заболевания. Группой высокого риска по реактивации ВГВ являются онкологические больные. Согласно имеющимся данным, у онкологических больных с ХГВ частота реактивации ВГВ вследствие противоопухолевой терапии может составлять от 30 до 80% в зависимости от используемых препаратов, режима химиотерапии и серологического статуса пациента [114]. Реактивация ВГВ может привести к тяжелому гепатиту, печеночной недостаточности или смерти [115]. Ранее сообщалось, что риск реактивации прошедшего гепатита В у пациентов с лимфомой, получавших химиотерапию, составляет 11% [116]. Недавно проведенный метаанализ, включающий 328 онкологических больных с СГВ, находившихся на химиотерапии, показал, что у 3% из них (10 случаев) произошла реактивация ВГВ. Имеются исследования, сообща-

ющие о том, что анти-ВГВ-профилактика до начала противоопухолевой терапии может значительно снизить реактивацию ВГВ у больных с онкологическими заболеваниями [117]. Авторы указали на важность скрининга всех пациентов перед химиотерапией опухолей на наличие не только HBsAg, но и анти-HBc, и отметили, что центры по контролю и профилактике заболеваний и AASLD также рекомендовали проводить тестирование на маркеры ВГВ лиц, получающих иммуносупрессивную терапию.

Было установлено [118], что риск реактивации ВГВ зависит от конкретного иммуносупрессивного препарата и от того, был ли у пациента текущий ХГВ (HBsAg+) или перенесенный СГВ (HBsAg–, анти-HBc+, ДНК ВГВ+). Так, у пациентов с ХГВ самый высокий риск реактивации (> 10%) был связан с приемом анти-CD20-препаратов после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), тогда как у пациентов с СГВ – с приемом ингибиторов янус-киназы (JAK). Известны также многочисленные иммуносупрессивные препараты, которые представляют умеренный (1–10%) и низкий риск (< 1%) реактивации ВГВ у пациентов с опухолями. Было установлено, что частота реактивации ВГВ у онкологических больных с ХГВ в анамнезе после химиотерапии составляет в среднем 25% (4–68%). У большинства (65%) этих пациентов наблюдалось прогрессирование заболевания, что требовало проведения трансплантации печени, а в противном случае приводило к смерти [119]. Эксперты рекомендуют всем пациентам с положительным HBsAg до начала иммуносупрессивной терапии проводить профилактику гепатита В. Что касается пациентов с СГВ, то риск реактивации сильно варьирует, зависит от применения различных иммуносупрессивных препаратов, поэтому рекомендуют назначать специфическую профилактику гепатита В в каждом конкретном случае. Отмечают, что у пациентов без HBsAg, но с анти-HBc, которые находились на иммуносупрессивной терапии без профилактики, реактивация ВГВ может достигать более 10% [120, 121].

В реактивации ВГВ ключевую роль играют иммунные механизмы. Нарушения иммунных реакций хозяина против инфицированных клеток, а также нарушения в передаче сигналов системы интерферона позволяют вирусу обходить иммунную защиту хозяина и способствуют реактивации. Одно из приоритетных направлений борьбы с реактивацией ВГВ состоит в выборе противовирусных препаратов в каждом конкретном случае. Показано, что на предотвращение реактивации ВГВ может существенно повлиять внедрение персонализированной медицины – подходов к лечению, ориентированных на конкретного пациента [122]. Авторы подчеркивают важность комплексного лечения реактивации вируса гепатита В, сочетающего методы иммуномодуляции с противовирусным лечением.

Заключение

СГВ привлекает все большее внимание специалистов разного профиля, о чем свидетельствует растущее количество работ, посвященных этой проблеме.

Показана связь СГВ с такими серьезными последствиями ХГВ, как цирроз печени и ГКК, а также со злокачественными опухолями других органов. Анализ маркеров СГВ позволяет установить диагноз в случаях криптогенных заболеваний печени. Установлено, что СГВ является фактором риска реактивации ВГВ, особенно при снижении иммунитета. Реактивация вируса приводит к более тяжелому течению гепатита и к неблагоприятному исходу заболевания. К группе высокого риска относятся пациенты с СГВ, коинфицированные другими вирусами: ВГС, SARS-CoV-2, ВИЧ. Высокий риск реактивации ВГВ установлен у онкологических больных с СГВ, проходящих курс химиотерапии. Показана возможность реактивации ВГВ у пациентов после гемотрансфузии от доноров крови с СГВ, а также передача ВГВ реципиентам органов при пересадках органов от доноров трансплантата с СГВ.

Для решения проблемы СГВ необходимо принять ряд мер. К ним относится масштабное обследование общей популяции населения, а также групп повышенного риска реактивации вируса и развития гепатита В. В связи с низкими концентрациями ДНК ВГВ в сыворотке/плазме крови, а также невозможностью в большинстве случаев получения образцов печени, необходимо усовершенствовать диагностику СГВ путем повышения чувствительности тестов, используемых в клинической практике. Рассматривается перспективность использования новых маркеров ВГВ: РНК ВГВ и HBcrAg (Hepatitis B core-related antigen). HBcrAg – новый суррогатный биомаркер, уровень которого коррелирует с уровнем кзкДНК ВГВ и позволяет судить о присутствии и уровне ДНК ВГВ в печени без использования инвазивных процедур. Отсутствие способов воздействия на кзкДНК ВГВ в настоящее время не позволяет удалить вирус из организма. Для подавления активности или разрушения кзкДНК разрабатываются подходы на основе низкомолекулярных ингибиторов и технологии редактирования генома CRISPR/Cas. Решение вопросов СГВ будет способствовать достижению цели, поставленной ВОЗ, – ликвидации вирусных гепатитов к 2030 г.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ou T.Y., Huy L.D., Mayne J., Shih C.L., Mai Xuan H., Thi Hong Nguyen N., et al. Global mortality of chronic liver diseases attributable to Hepatitis B virus and Hepatitis C virus infections from 1990 to 2019 and projections to 2030. *J. Infect. Public Health.* 2024; 17(7): 102443. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2024.04.027>.
2. Tsukuda S., Watashi K. Hepatitis B virus biology and life cycle. *Antiviral Res.* 2020; 182: 104925. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104925>
3. Mouzannar K., Schauer A., Liang T.J. The post-transcriptional regulatory element of hepatitis B virus: from discovery to therapy. *Viruses.* 2024; 16(4): 528. <https://doi.org/10.3390/v16040528>
4. Панасюк Я.В., Власенко Н.В., Чурилова Н.С., Клушнина В.В., Дубоделов Д.В., Кудрявцева Е.Н. и др. Современные представления о роли гена Х вируса гепатита В (Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus) в патогенезе инфекции, вызванной вирусом гепатита В. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(1): 7–17. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-84> <https://elibrary.ru/tvufhi>
5. Li D., Hamadani Y., Tu T. Hepatitis B viral protein HBx: Roles in viral replication and hepatocarcinogenesis. *Viruses.* 2024; 16(9): 1361. <https://doi.org/10.3390/v16091361>.

6. Asami J., Park J.H., Nomura Y., Kobayashi C., Mifune J., Ishimoto N., et al. Structural basis of hepatitis B virus receptor binding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2024; 31(3): 447–54. <https://doi.org/10.1038/s41594-023-01191-5>
7. Iwamoto M., Saso W., Sugiyama R., Ishii K., Ohki M., Nagamori S., et al. Epidermal growth factor receptor is a host-entry cofactor triggering hepatitis B virus internalization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2019; 116(17): 8487–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811064116>
8. Gómez-Moreno A., Ploss A. Mechanisms of hepatitis B virus cccDNA and minichromosome formation and HBV gene transcription. *Viruses.* 2024; 16(4): 609. <https://doi.org/10.3390/v16040609>
9. Gopalakrishna H., Ghany M.G. Perspective on emerging therapies to achieve functional cure of chronic hepatitis B. *Curr. Hepatol. Rep.* 2024; 23(2): 241–52. <https://doi.org/10.1007/s11901-024-00652-9>
10. Sinha P., Thio C.L., Balagopal A. Intracellular host restriction of hepatitis B virus replication. *Viruses.* 2024; 16(5): 764. <https://doi.org/10.3390/v16050764>
11. Yu X., Gong Q., Yu D., Chen Y., Jing Y., Zoulim F., et al. Spatial transcriptomics reveals a low extent of transcriptionally active hepatitis B virus integration in patients with HBsAg loss. *Gut.* 2024; 73(5): 797–809. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2023-330577>
12. Zoulim F., Chen P.J., Dandri M., Kennedy P.T., Seeger C. Hepatitis B virus DNA integration: Implications for diagnostics, therapy, and outcome. *J. Hepatol.* 2024; 81(6): 1087–99. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2024.06.037>
13. Yeh S.H., Li C.L., Lin Y.Y., Ho M.C., Wang Y.C., Tseng S.T., et al. Hepatitis B virus DNA integration drives carcinogenesis and provides a new biomarker for HBV-related HCC. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2023; 15(4): 921–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2023.01.001>
14. Gu Z., Jiang Q., Abulaiti A., Chen X., Li M., Gao N., et al. Hepatitis B virus enhancer 1 activates preS1 and preS2 promoters of integrated HBV DNA impairing HBsAg secretion. *JHEP Rep.* 2024; 6(9): 101144. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2024.101144>
15. Maiorella R., Rodriguez V.A. Hepatitis B vaccine refusal in the newborn period. *Pediatr. Ann.* 2021; 50(8): e343–7. <https://doi.org/10.3928/19382359-20210712-01>
16. Rajbhandari R., Chung R.T. Treatment of hepatitis B: A concise review. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 2016; 7(9): e190. <https://doi.org/10.1038/ctg.2016.46>
17. Michalak T.I., Pasquinelli C., Guilhot S., Chisari F.V. Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis. *J. Clin. Invest.* 1994; 93(1): 230–9. <https://doi.org/10.1172/JCI116950>
18. Hirode G., Choi H.S.J., Chen C.H., Su T.H., Seto W.K., Van Hees S., et al. Off-therapy response after nucleos(t)ide analogue withdrawal in patients with chronic hepatitis B: An international, multicenter, multiethnic cohort (RETRACT-B Study). *Gastroenterology.* 2022; 162(3): 757–71.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.11.002>
19. Di Dato F., Iorio R. Expanding indications for chronic hepatitis B treatment: Is it really desirable to treat everyone? *World J. Gastroenterol.* 2024; 30(17): 2294–7. <https://doi.org/10.3748/wjg.v30.i17.2294>
20. Gerlich W.H., Bremer C., Saniewski M., Schüttler C.G., Wend U.C., Willems W.R., et al. Occult hepatitis B virus infection: detection and significance. *Dig. Dis.* 2010; 28(1): 116–25. <https://doi.org/10.1159/000282074>
21. Kleinman S.H., Busch M.P. Assessing the impact of HBV NAT on window period reduction and residual risk. *J. Clin. Virol.* 2006; 36(Suppl. 1): S23–9. [https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(06\)80005-3](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(06)80005-3)
22. Голубева И.Ф., Шальнова Е.Е., Бочкова Г.Б. Инфекционные риски и обеспечение безопасности донорской крови и ее компонентов. *Лабораторная диагностика инфекционных заболеваний.* 2019; (1): 6–21.
23. Heim K., Sagar, Sogukpinar Ö., Llewellyn-Lacey S., Price D.A., Emmerich F., et al. Attenuated effector T cells are linked to control of chronic HBV infection. *Nat. Immunol.* 2024; 25(9): 1650–62. <https://doi.org/10.1038/s41590-024-01928-4>
24. European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2017; 67(2): 370–98. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.021>
25. Budzinska M.A., Shackel N.A., Urban S., Tu T. Cellular genomic sites of hepatitis B virus DNA integration. *Genes (Basel).* 2018; 9(7): 365. <https://doi.org/10.3390/genes9070365>
26. Raimondo G., Locarnini S., Pollicino T., Levrero M., Zoulim F., Lok A.S., et al. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2019; 71(2): 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.03.034>
27. Wang C., Xue R., Wang X., Xiao L., Xian J. High-sensitivity HBV DNA test for the diagnosis of occult HBV infection: commonly used but not reliable. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2023; 13: 1186877. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1186877>
28. Fang Z.L., Zhuang H., Wang X.Y., Ge X.M., Harrison T.J. Hepatitis B virus genotypes, phylogeny and occult infection in a region with a high incidence of hepatocellular carcinoma in China. *World J. Gastroenterol.* 2004; 10(22): 3264–8. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i22.3264>
29. Mo Y., Jin F., Li D., Zou W., Zhong J., Tong Z., et al. Prevalence and molecular characteristics of occult hepatitis B virus infection among blood donors in Huzhou City, eastern China. *Gene.* 2024; 927: 148718. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2024.148718>
30. Pisaturo M., Onorato L., Russo A., Chiodini P., Coppola N. An estimation of the prevalence of occult HBV infection in Western Europe and in Northern America: A meta-analysis. *J. Viral Hepat.* 2020; 27(4): 415–27. <https://doi.org/10.1111/jvh.13248>
31. Ji D.Z., Pang X.Y., Shen D.T., Liu S.N., Goyal H., Xu H.G. Global prevalence of occult hepatitis B: A systematic review and meta-analysis. *J. Viral Hepat.* 2022; 29(5): 317–29. <https://doi.org/10.1111/jvh.13660>
32. Fu M.X., Faddy H.M., Candotti D., Groves J., Saa P., Styles C., et al. International review of blood donation screening for anti-HBc and occult hepatitis B virus infection. *Transfusion.* 2024; 64(11): 2144–56. <https://doi.org/10.1111/trf.18018>
33. Серикова Е.Н., Семенов А.В., Останкова Ю.В., Тотолян А.А. Метод выявления вируса гепатита В в плазме крови при низкой вирусной нагрузке с использованием ПЦР в режиме реального времени. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2021; 65(1): 59–64. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-59-64> <https://elibrary.ru/fagbfm>
34. Tung T.T., Schmid J., Nghia V.X., Cao L.C., Linh L.T.K., Rungsung I., et al. Low risk of occult hepatitis B infection among Vietnamese blood donors. *Pathogens.* 2022; 11(12): 1524. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121524>
35. Ndow G., Cessay A., Cohen D., Shimakawa Y., Gore M.L., Tamba S., et al. Prevalence and clinical significance of occult hepatitis B infection in the Gambia, West Africa. *J. Infect. Dis.* 2022; 226(5): 862–70. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab327>
36. Mbencho M.N., Hafza N., Cao L.C., Mingo V.N., Achidi E.A., Ghogomu S.M., et al. Incidence of Occult Hepatitis B Infection (OBI) and hepatitis B genotype characterization among blood donors in Cameroon. *PLoS One.* 2024; 19(10): e0312126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0312126>
37. Simpore A., Bazie B.V.E.J.T., Yooda P.A., Zoure A.A., Sawadogo S., Sawadogo A.G., et al. Seroprevalence of viral hepatitis B and occult hepatitis B among blood donors in Africa: a systematic review and meta-analysis. *Rev. Med. Virol.* 2024; 34(6): e70006. <https://doi.org/10.1002/rmv.70006>
38. Семененко Т.А., Ярош Л.В., Баженов А.И., Никитина Г.Ю., Клейменов Д.А., Эльгорт Д.А. и др. Эпидемиологическая оценка распространенности «скрытых» форм и HBsAg-мутантов вируса гепатита В у гематологических больных. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2012; (6): 9–14. <https://elibrary.ru/pukkf>
39. Останкова Ю.В., Серикова Е.Н., Ширинова Н.Ю., Кусевичкая М.Б., Горская О.А., Басина В.В. и др. Распространенность скрытой формы хронического гепатита В у доноров крови в Санкт-Петербурге. *Инфекция и иммунитет.* 2023; 13(6): 1129–40. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-POO-14480> <https://elibrary.ru/xhpybw>
40. Ганина А.А., Кюрегян К.К., Исаева О.В., Дмитриев П.Н., Марданлы С.Г., Михайлов М.И. Частота выявления «скрытого» гепатита В среди лиц с наркотической зависимостью и доноров крови. *Наркология.* 2008; 7(9): 70–4. <https://elibrary.ru/kaybtf>
41. Xia R., Peng J., He J., Jiang P., Yuan C., Liu X., et al. The serious challenge of occult hepatitis B virus infection-related hepatocellular carcinoma in China. *Front. Microbiol.* 2022; 13: 840825. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.840825>
42. Im Y.R., Jagdish R., Leith D., Kim J.U., Yoshida K., Majid A., et al. Prevalence of occult hepatitis B virus infection in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2022; 7(10): 932–42. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(22\)00201-1](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(22)00201-1)

43. Bucio-Ortiz L., Enriquez-Navarro K., Maldonado-Rodríguez A., Torres-Flores J.M., Cevallos A.M., Salcedo M., et al. Occult hepatitis B virus infection in hepatic diseases and its significance for the WHO's elimination plan of viral hepatitis. *Pathogens*. 2024; 13(8): 662. <https://doi.org/10.3390/pathogens13080662>
44. Takuissu G.R., Kenmoe S., Amougou Atsama M., Atenguena Okobalemba E., Mbaga 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>
45. Candotti D., Boizeau L., Laperche S. Occult hepatitis B infection and transfusion-transmission risk. *Transfus. Clin. Biol.* 2017; 24(3): 189–95. <https://doi.org/10.1016/j.traci.2017.06.014>
46. Pisaturo M., Onorato L., Russo A., Coppola N. Prevalence of occult HBV infection in Western countries. *J. Med. Virol.* 2020; 92(12): 2917–29. <https://doi.org/10.1002/jmv.25867>
47. Elbahrawy A., Alaboudy A., El Moghazy W., Elwassief A., Alashker A., Abdallah A.M. Occult hepatitis B virus infection in Egypt. *World J. Hepatol.* 2015; 7(12): 1671–8. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i12.1671>
48. Azzam A., Khaled H., El-Kayal E.S., Gad F.A., Omar S. Prevalence of occult hepatitis B virus infection in Egypt: a systematic review with meta-analysis. *J. Egypt. Public Health Assoc.* 2023; 98(1): 13. <https://doi.org/10.1186/s42506-023-00138-4>
49. Kajogoo V.D., Swai S.S., Gurung S. Prevalence of occult hepatitis B among HIV-positive individuals in Africa: A systematic review and meta-analysis. *SAGE Open Med.* 2022; 10: 20503121211072748. <https://doi.org/10.1177/20503121211072748>
50. Enriquez-Navarro K., Maldonado-Rodríguez A., Rojas-Montes O., Torres-Ibarra R., Bucio-Ortiz L., De la Cruz M.A., et al. Identification of mutations in the S gene of hepatitis B virus in HIV positive Mexican patients with occult hepatitis B virus infection. *Ann. Hepatol.* 2020; 19(5): 507–15. <https://doi.org/10.1016/j.aohp.2020.06.002>
51. García-Montalvo B.M., Ventura-Zapata L.P. Molecular and serological characterization of occult hepatitis B infection in blood donors from Mexico. *Ann. Hepatol.* 2011; 10(2): 133–41.
52. Морозов И.А., Ильченко Л.Ю., Громова Н.И., Федоров И.Г., Гордейчук И.В., Княженцева А.К. и др. Проблемы скрытой инфекции, вызванной вирусом гепатита В. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2012; 22(4): 58–65. <https://elibrary.ru/piwdpl>
53. Delghandi S., Raoufinia R., Shahtahmasbi S., Meshkat Z., Goukani H., Gholoobi A. An overview of occult hepatitis B infection (OBI) with emphasis on HBV vaccination. *Heliyon*. 2024; 10(17): e37097. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e37097>
54. Yip T.C., Wong G.L., Wong V.W., Tse Y.K., Lui G.C., Lam K.L., et al. Durability of hepatitis B surface antigen seroclearance in untreated and nucleos(t)ide analogue-treated patients. *J. Hepatol.* 2017; 68(1): 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.09.018>
55. Liu W.J., Wu W.J., Lin C.L., Liu C.J., Huang Y.W., Hu J.T., et al. Impact of age at HBsAg seroclearance on hepatic outcomes and life expectancy in men with chronic HBV infection based on multi-state modeling of the natural history. *J. Gastroenterol.* 2025; 60(1): 107–17. <https://doi.org/10.1007/s00535-024-02162-3>
56. Leowattana W., Leowattana P., Leowattana T. Quantitative hepatitis B core antibody and quantitative hepatitis B surface antigen: Novel viral biomarkers for chronic hepatitis B management. *World J. Hepatol.* 2024; 16(4): 550–65. <https://doi.org/10.4254/wjh.v16.i4.550>
57. El Jamaly H., Eslick G.D., Weltman M. Meta-analysis: hepatitis B reactivation in patients receiving biological therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2022; 56(7): 1104–8. <https://doi.org/10.1111/apt.17155>
58. Morrone A., Fiorilli V., Cinti L., Roberto P., Ferri A.L., Visentini M., et al. Surface antigen serocleared hepatitis B virus infection increases the risk of mixed cryoglobulinemia vasculitis in male patients with chronic hepatitis C. *Front. Immunol.* 2024; 15: 1411146. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1411146>
59. Saravanan S., Shankar E.M., Vignesh R., Ganesh P.S., Sankar S., Velu V., et al. Occult hepatitis B virus infection and current perspectives on global WHO 2030 eradication. *J. Viral Hepat.* 2024; 31(7): 423–31. <https://doi.org/10.1111/jvh.13928>
60. Peng J., Yao X., Yuan C., Liu X., Xia R., He J., et al. The investigation of hepatitis B vaccine immune responses in occult hepatitis B virus-infected patients. *Front. Immunol.* 2022; 13: 903685. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.903685>
61. Tang X., Yang L., Zhang P., Wang C., Luo S., Liu B., et al. Occult hepatitis B virus infection and liver fibrosis in Chinese patients. *J. Infect. Dis.* 2023; 228(10): 1375–84. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiad140>
62. Yurlov K.I., Masalova O.V., Kisteneva L.B., Khlopova I.N., Samokhvalov E.I., Malinovskaya V.V. et al. Human herpesviruses increase the severity of hepatitis. *Biology (Basel)*. 2021; 10(6): 483. <https://doi.org/10.3390/biology10060483>
63. Berasain C., Betés M., Panizo A., Ruiz J., Herrero J.I., Civeira M.P., et al. Pathological and virological findings in patients with persistent hypertransaminasaemia of unknown aetiology. *Gut*. 2000; 47(3): 429–35. <https://doi.org/10.1136/gut.47.3.429>
64. Kaviani M.J., Behbahani B., Mosallai M.J., Sari-Aslani F., Taghavi S.A. Occult hepatitis B virus infection and cryptogenic chronic hepatitis in an area with intermediate prevalence of HBV infection. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12(31): 5048–50. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i31.5048>
65. Anvari F.A., Alavian S.M., Norouzi M., Mahabadi M., Jazayeri S.M. Prevalence and molecular analysis of occult hepatitis B virus infection isolated in a sample of cryptogenic cirrhosis patients in Iran. *Oman Med. J.* 2014; 29(2): 92–6. <https://doi.org/10.5001/omj.2014.23>
66. Hashemi S.J., Hajiani E., Masjedizadeh A., Makvandi M., Shayesteh A.A., Alavinejad S.P., et al. Occult hepatitis B infection in patients with cryptogenic liver cirrhosis in southwest of Iran. *Jundishapur J. Microbiol.* 2015; 8(3): e16873. <https://doi.org/10.5812/jjm.16873>
67. Agarwal N., Naik S., Aggarwal R., Singh H., Somani S.K., Kini D., et al. Occult hepatitis B virus infection as a cause of cirrhosis of liver in a region with intermediate endemicity. *Indian J. Gastroenterol.* 2003; 22(4): 127–31.
68. Ferrari T.C., Xavier M.A., Vidigal P.V., Amaral N.S., Diniz P.A., Resende A.P., et al. Occult hepatitis B virus infection in liver transplant patients in a Brazilian referral center. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2014; 47(11): 990–4. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20143782>
69. Faria A.C., Correa B.H.M., Faria L.C., Vidigal P.V.T., Xavier M.A.P., Ferrari T.C.A. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic liver disease of different etiology in a Brazilian referral center: comparison of two different hepatitis B virus deoxyribonucleic acid amplification protocols: a cross-sectional study. *Sao Paulo Med. J.* 2022; 141(3): e2022147. <https://doi.org/10.1590/1516-3180.2022.0147.R1.12072022>
70. Daher D., Seif El Dahan K., Cano A., Gonzales M., Ransom C., Jaurez E., et al. Hepatocellular carcinoma surveillance patterns and outcomes in patients with cirrhosis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2024; 22(2): 295–304.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2023.08.003>
71. Kim G.A., Lee H.C., Kim M.J., Ha Y., Park E.J., An J., et al. Incidence of hepatocellular carcinoma after HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B patients: a need for surveillance. *J. Hepatol.* 2015; 62(5): 1092–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.11.031>
72. Yip T.C., Wong G.L., Chan H.L., Tse Y.K., Lam K.L., Lui G.C., et al. HBsAg seroclearance further reduces hepatocellular carcinoma risk after complete viral suppression with nucleos(t)ide analogues. *J. Hepatol.* 2019; 70(3): 361–70. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.10.014>
73. Yang H., Bae S.H., Nam H., Lee H.L., Lee S.W., Yoo S.H., et al. A risk prediction model for hepatocellular carcinoma after hepatitis B surface antigen seroclearance. *J. Hepatol.* 2022; 77(3): 632–41. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.03.032>
74. Yip T.C., Wong V.W., Lai M.S., Lai J.C., Hui V.W., Liang L.Y., et al. Risk of hepatic decompensation but not hepatocellular carcinoma decreases over time in patients with hepatitis B surface antigen loss. *J. Hepatol.* 2023; 78(3): 524–33. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.11.020>
75. Varghese N., Majeed A., Nyalakonda S., Boortalary T., Halegoua-DeMarzio D., Hann H.W. Review of related factors for persistent risk of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2024; 16(4): 777. <https://doi.org/10.3390/cancers16040777>
76. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2021; 71(3): 209–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
77. Zhou M., Wang H., Zeng X., Yin P., Zhu J., Chen W., et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990–

- 2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*. 2019; 394(10204): 1145–58. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30427-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30427-1)
78. Péneau C., Imbeaud S., La Bella T., Hirsch T.Z., Caruso S., Calde-raro J., et al. Hepatitis B virus integrations promote local and distant oncogenic driver alterations in hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2022; 71(3): 616–26. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323153>
 79. Dias J.D., Sarica N., Cournac A., Koszul R., Neuveut C. Crosstalk between hepatitis B virus and the 3d genome structure. *Viruses*. 2022; 14(2): 445. <https://doi.org/10.3390/v14020445>
 80. Zhang M., Chen H., Liu H., Tang H. The impact of integrated hep-atitis B virus DNA on oncogenesis and antiviral therapy. *Biomark. Res.* 2024; 12(1): 84. <https://doi.org/10.1186/s40364-024-00611-y>
 81. Huo T.I., Wu J.C., Lee P.C., Chau G.Y., Lui W.Y., Tsay S.H., et al. Sero-clearance of hepatitis B surface antigen in chronic carriers does not necessarily imply a good prognosis. *Hepatology*. 1998; 28(1): 231–6. <https://doi.org/10.1002/hep.510280130>
 82. Yuen M.F., Wong D.K., Fung J., Ip P., But D., Hung I., et al. HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in Asian patients: replicative level and risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2008; 135(4): 1192–9. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.07.008>
 83. Yip T.C., Chan H.L., Wong V.W., Tse Y.K., Lam K.L., Wong G.L. Impact of age and gender on risk of hepatocellular carcinoma after hepatitis B surface antigen seroclearance. *J. Hepatol.* 2017; 67(5): 902–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.06.019>
 84. Ji M., Hu K. Recent advances in the study of hepatitis B virus covalently closed circular DNA. *Virol. Sin.* 2017; 32(6): 454–64. <https://doi.org/10.1007/s12250-017-4009-4>
 85. Kaur S.P., Talat A., Karimi-Sari H., Grees A., Chen H.W., Lau D.T.Y., et al. Hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus-infected patients and the role of hepatitis B surface antigen (HBsAg). *J. Clin. Med.* 2022; 11(4): 1126. <https://doi.org/10.3390/jcm11041126>
 86. Ghany M.G., Buti M., Lampertico P., Lee H.M.; 2022 AASLD-EASL HBV-HDV Treatment Endpoints Conference Faculty. Guidance on treatment endpoints and study design for clinical trials aiming to achieve cure in chronic hepatitis B and D: Report from the 2022 AASLD-EASL HBV-HDV Treatment Endpoints Confer-ence. *J. Hepatol.* 2023; 79(5): 1254–69. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.06.002>
 87. Gounder P.P., Bulkow L.R., Snowball M., Negus S., Spradling P.R., Simons B.C., et al. Nested case-control study: hepatocellular carcinoma risk after hepatitis B surface antigen seroclearance. *Aliment. Pharma-col. Ther.* 2016; 43(11): 1197–207. <https://doi.org/10.1111/apt.13621>
 88. Kuang X.J., Jia R.R., Huo R.R., Yu J.J., Wang J.J., Xiang B.D., et al. Systematic review of risk factors of hepatocellular carcinoma after hepatitis B surface antigen seroclearance. *J. Viral Hepat.* 2018; 25(9): 1026–37. <https://doi.org/10.1111/jvh.12905>
 89. Mak L.Y., Wong D.K., Pollicino T., Raimondo G., Hollinger F.B., Yuen M.F. Occult hepatitis B infection and hepatocellular carci-noma: Epidemiology, virology, hepatocarcinogenesis and clinical significance. *J. Hepatol.* 2020; 73(4): 952–64. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.05.042>
 90. Wong D.K., Cheng S.C.Y., Mak L.L., To E.W., Lo R.C., Cheung T.T., et al. Among patients with undetectable hepatitis B surface antigen and hepatocellular carcinoma, a high proportion has integration of HBV DNA into hepatocyte DNA and no cirrhosis. *Clin. Gastro-enterol. Hepatol.* 2002; 18(2): 449–56. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2019.06.029>
 91. Huang Y., Li W., Hu H.T., Ruan S.M., Xian M.F., Xie X.Y., et al. Contrast-enhanced US diagnostic algorithm of hepatocellular carcinoma in patients with occult hepatitis B. *Abdom. Radiol. (NY)*. 2022; 47(2): 608–17. <https://doi.org/10.1007/s00261-021-03343-x>
 92. Wong D.K., Huang F.Y., Lai C.L., Poon R.T., Seto W.K., Fung J., et al. Occult hepatitis B infection and HBV replicative activity in patients with cryptogenic cause of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2011; 54(3): 829–36. <https://doi.org/10.1002/hep.24551>
 93. Morozov S., Batskikh S. Commentary: Hepatitis B virus infection: an insight into the clinical connection and molecular interaction between hepatitis B virus and host extrahepatic cancer risk. *Front Immunol.* 2023; 14: 1200405. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1200405>
 94. Batskikh S., Morozov S., Dorofeev A., Borunova Z., Kostyushev D., Brezgin S., et al. Previous hepatitis B viral infection-an underestimated cause of pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* 2022; 28(33): 4812–22. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i33.4812>
 95. Rosenberg M., Poluch M., Thomas C., Sindaco P., Khoo A., Porcu P. Hepatitis B virus and B-cell lymphoma: evidence, unmet need, clinical impact, and opportunities. *Front. Oncol.* 2023; 13: 1275800. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1275800>
 96. Dunleavy K. Double-hit lymphoma: optimizing therapy. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2021; 2021(1): 157–63. <https://doi.org/10.1182/hematology.2021000247>
 97. Barraclough A., Hawkes E., Sehn L.H., Smith S.M. Diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol. Oncol.* 2024; 42(6): e3202. <https://doi.org/10.1002/hon.3202>
 98. Li M., Gan Y., Fan C., Yuan H., Zhang X., Shen Y., et al. Hepatitis B virus and risk of non-Hodgkin lymphoma: an updated meta-analysis of 58 studies. *J. Viral. Hepat.* 2018; 25(8): 894–903. <https://doi.org/10.1111/jvh.12892>
 99. Spradling P.R., Xing J., Zhong Y., Rupp L.B., Moorman A.C., Lu M., et al. Incidence of malignancies among patients with chronic hepatitis B in US Health Care Organizations, 2006–2018. *J. Infect. Dis.* 2022; 226(5): 896–900. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac011>
 100. Bersoff-Matcha S.J., Cao K., Jason M., Ajao A., Jones S.C., Meyer T., et al. Hepatitis B virus reactivation associated with direct-acting antiviral therapy for chronic hepatitis C virus: a review of cases reported to the U.S. Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System. *Ann. Intern. Med.* 2017; 166(11): 792–8. Doi: <https://doi.org/10.7326/m17-0377>
 101. Pisaturo M., Macera M., Alessio L., Calò F., Coppola N. Hepatitis B virus (HBV) reactivation following pharmacological eradication of hepatitis C virus (HCV). *Viruses*. 2019; 11(9): 850. <https://doi.org/10.3390/v11090850>
 102. Osman H.A., Ghweil A.A., Sabry A.M., Mahdy R.E., Khodeary A. Management of patients with hepatitis B virus reactivation post-DAA treatment of chronic hepatitis C virus infection In HCV-HBV coinfectd patients with pretreatment HBeAg seroconversion and early degree of hepatic fibrosis. *Infect. Drug Resist.* 2019; 12: 3067–73. <https://doi.org/10.2147/IDR.S215974>
 103. Liu C.J., Sheen I.S., Chen C.Y., Chuang W.L., Wang H.Y., Tseng K.C., et al. Ledipasvir/Sofosbuvir for patients coinfectd with chronic hepatitis C and hepatitis B in Taiwan: follow-up at 108 weeks posttreatment. *Clin. Infect. Dis.* 2022; 75(3): 453–9. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab971>
 104. Lam L.K., Chan T.S.Y., Hwang Y.Y., Mak L.Y., Seto W.K., Kwong Y.L., et al. Hepatitis B virus reactivation in seronegative occult hepatitis B patient receiving ibrutinib therapy. *Virol. J.* 2023; 20(1): 168. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02140-w>
 105. Toka B., Köksal A.Ş., Dertli R., Şirin G., Fidan S., Ülger Y., et al. Hepatitis B reactivation in patients treated with direct-acting antivirals for hepatitis C. *Dig. Dis.* 2022; 40(5): 635–43. <https://doi.org/10.1159/000521298>
 106. Meschi S., Mizzone K., Leoni B.D., Galli C., Garbuglia A.R., Belladonna S., et al. Occult HBV infection in patients infected by HIV or HCV: Comparison between HBV-DNA and two assays for HBsAg. *Viruses*. 2024; 16(3): 412. <https://doi.org/10.3390/v16030412>
 107. Maqsood Q., Sumrin A., Iqbal M., Younas S., Hussain N., Mahnoor M., et al. Hepatitis C virus/hepatitis B virus coinfection: Current perspectives. *Antivir. Ther.* 2023; 28(4): 13596535231189643. <https://doi.org/10.1177/13596535231189643>
 108. Colombatto P., Palmisano E., Ricco G., Cavallone D., Oliveri F., Coco B., et al. Different kinetics of HBV-DNA and HBsAg in HCV coinfectd patients during DAAs therapy. *J. Clin. Med.* 2022; 11(5): 1406. <https://doi.org/10.3390/jcm11051406>
 109. Conners E.E., Panagiotakopoulos L., Hofmeister M.G., Spradling P.R., Hagan L.M., Harris A.M., et al. Screening and testing for hepatitis B virus infection: CDC recommendations – United States, 2023. *MMWR Recomm. Rep.* 2023; 72(1): 1–25. <https://doi.org/10.15585/mmwr.rr7201a1>
 110. Rodríguez-Tajes S., Miralpeix A., Costa J., López-Suñé E., Laguno M., Pocurull A., et al. Low risk of hepatitis B reactivation in patients with severe COVID-19 who receive immunosuppressive therapy. *J. Viral Hepat.* 2021; 28(1): 89–94. <https://doi.org/10.1111/jvh.13410>
 111. Mihai N., Olariu M.C., Ganea O.A., Adamescu A.I., Molagie V., Aramă Ş.S., et al. Risk of hepatitis B virus reactivation in COVID-19 patients receiving immunosuppressive treatment: a prospective study. *J. Clin. Med.* 2024; 13(20): 6032. <https://doi.org/10.3390/jcm13206032>
 112. Wu J., He J., Xu H. Global prevalence of occult HBV infection in children and adolescents: A systematic review and meta-analy-

- sis. *Ann. Hepatol.* 2024; 29(1): 101158. <https://doi.org/10.1016/j.aohp.2023.101158>
 113. Tsui J.I., French A.L., Seaberg E.C., Augenbraun M., Nowicki M., Peters M., et al. Prevalence and long-term effects of occult hepatitis B virus infection in HIV-infected women. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 45(6): 736–40. <https://doi.org/10.1086/520989>
 114. Hwang J.P., Vierling J.M., Zelenetz A.D., Lackey S.C., Loomba R. Hepatitis B virus management to prevent reactivation after chemotherapy: a review. *Support Care Cancer.* 2012; 20(11): 2999–3008. <https://doi.org/10.1007/s00520-012-1576-7>
 115. Shouval D., Shibolet O. Immunosuppression and HBV reactivation. *Semin. Liver Dis.* 2013; 33(2): 167–77. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1345722>
 116. Chen K.L., Chen J., Rao H.L., Guo Y., Huang H.Q., Zhang L., et al. Hepatitis B virus reactivation and hepatitis in diffuse large B-cell lymphoma patients with resolved hepatitis B receiving rituximab-containing chemotherapy: risk factors and survival. *Chin. J. Cancer.* 2015; 34(5): 225–34. <https://doi.org/10.1186/s40880-015-0015-9>
 117. Mezzacappa C., Lim J.K. Management of HBV reactivation: challenges and opportunities. *Clin. Liver Dis. (Hoboken).* 2024; 23(1): e0143. <https://doi.org/10.1097/CLD.0000000000000143>
 118. Anvari S., Tsoi K. Hepatitis B virus reactivation with immunosuppression: a hidden threat? *J. Clin. Med.* 2024; 13(2): 393. <https://doi.org/10.3390/jcm13020393>
 119. Zhu Y., Li H., Wang X., Zheng X., Huang Y., Chen J., et al. Hepatitis B virus reactivation increased the risk of developing hepatic failure and mortality in cirrhosis with acute exacerbation. *Front. Microbiol.* 2022; 13: 910549. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.910549>
 120. Papatheodoridis G.V., Lekakis V., Voulgaris T., Lampertico P., Berg T., Chan H.L.Y., et al. Hepatitis B virus reactivation associated with new classes of immunosuppressants and immunomodulators: A systematic review, meta-analysis, and expert opinion. *J. Hepatol.* 2022; 77(6): 1670–89. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.07.003>
 121. Savaliya B.P., Shekouhi R., Mubarak F., Manaise H.K., Jimenez P.B., Kowkabany G., et al. Risk of hepatitis B virus reactivation in cancer patients undergoing treatment with tyrosine kinase-inhibitors. *World J. Gastroenterol.* 2024; 30(24): 3052–8. <https://doi.org/10.3748/wjg.v30.i24.3052>
 122. Ma H., Yan Q.Z., Ma J.R., Li D.F., Yang J.L. Overview of the immunological mechanisms in hepatitis B virus reactivation: Implications for disease progression and management strategies. *World J. Gastroenterol.* 2024; 30(10): 1295–312. <https://doi.org/10.3748/wjg.v30.i10.1295>
- ## REFERENCES
1. Ou T.Y., Huy L.D., Mayne J., Shih C.L., Mai Xuan H., Thi Hong Nguyen N., et al. Global mortality of chronic liver diseases attributable to Hepatitis B virus and Hepatitis C virus infections from 1990 to 2019 and projections to 2030. *J. Infect. Public Health.* 2024; 17(7): 102443. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2024.04.027>
 2. Tsukuda S., Watashi K. Hepatitis B virus biology and life cycle. *Antiviral Res.* 2020; 182: 104925. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104925>
 3. Mouzannar K., Schauer A., Liang T.J. The post-transcriptional regulatory element of hepatitis B virus: from discovery to therapy. *Viruses.* 2024; 16(4): 528. <https://doi.org/10.3390/v16040528>
 4. Panasiuk Ya.V., Vlasenko N.V., Churilova N.S., Klushkina V.V., Dubodelov D.V., Kudryavtseva E.N., et al. Modern views on the role of X gene of the hepatitis B virus (Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus) in the pathogenesis of the infection it causes. *Voprosy virusologii.* 2022; 67(1): 7–17. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-84> <https://elibrary.ru/tvufhi> (in Russian)
 5. Li D., Hamadani Y., Tu T. Hepatitis B viral protein HBx: Roles in viral replication and hepatocarcinogenesis. *Viruses.* 2024; 16(9): 1361. <https://doi.org/10.3390/v16091361>
 6. Asami J., Park J.H., Nomura Y., Kobayashi C., Mifune J., Ishimoto N., et al. Structural basis of hepatitis B virus receptor binding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2024; 31(3): 447–54. <https://doi.org/10.1038/s41594-023-01191-5>
 7. Iwamoto M., Saso W., Sugiyama R., Ishii K., Ohki M., Nagamori S., et al. Epidermal growth factor receptor is a host-entry cofactor triggering hepatitis B virus internalization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2019; 116(17): 8487–92. <https://doi.org/10.1073/pnas.1811064116>
 8. Gómez-Moreno A., Ploss A. Mechanisms of hepatitis B virus cccDNA and minichromosome formation and HBV gene transcription. *Viruses.* 2024; 16(4): 609. <https://doi.org/10.3390/v16040609>
 9. Gopalakrishna H., Ghany M.G. Perspective on emerging therapies to achieve functional cure of chronic hepatitis B. *Curr. Hepatol. Rep.* 2024; 23(2): 241–52. <https://doi.org/10.1007/s11901-024-00652-9>
 10. Sinha P., Thio C.L., Balagopal A. Intracellular host restriction of hepatitis B virus replication. *Viruses.* 2024; 16(5): 764. <https://doi.org/10.3390/v16050764>
 11. Yu X., Gong Q., Yu D., Chen Y., Jing Y., Zoulim F., et al. Spatial transcriptomics reveals a low extent of transcriptionally active hepatitis B virus integration in patients with HBsAg loss. *Gut.* 2024; 73(5): 797–809. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2023-330577>
 12. Zoulim F., Chen P.J., Dandri M., Kennedy P.T., Seeger C. Hepatitis B virus DNA integration: Implications for diagnostics, therapy, and outcome. *J. Hepatol.* 2024; 81(6): 1087–99. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2024.06.037>
 13. Yeh S.H., Li C.L., Lin Y.Y., Ho M.C., Wang Y.C., Tseng S.T., et al. Hepatitis B virus DNA integration drives carcinogenesis and provides a new biomarker for HBV-related HCC. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 2023; 15(4): 921–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2023.01.001>
 14. Gu Z., Jiang Q., Abulaiti A., Chen X., Li M., Gao N., et al. Hepatitis B virus enhancer 1 activates preS1 and preS2 promoters of integrated HBV DNA impairing HBsAg secretion. *JHEP Rep.* 2024; 6(9): 101144. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2024.101144>
 15. Maiorella R., Rodriguez V.A. Hepatitis B vaccine refusal in the newborn period. *Pediatr. Ann.* 2021; 50(8): e343–7. <https://doi.org/10.3928/19382359-20210712-01>
 16. Rajbhandari R., Chung R.T. Treatment of hepatitis B: A concise review. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 2016; 7(9): e190. <https://doi.org/10.1038/ctg.2016.46>
 17. Michalak T.I., Pasquinelli C., Guilhot S., Chisari F.V. Hepatitis B virus persistence after recovery from acute viral hepatitis. *J. Clin. Invest.* 1994; 93(1): 230–9. <https://doi.org/10.1172/JCI116950>
 18. Hirode G., Choi H.S.J., Chen C.H., Su T.H., Seto W.K., Van Hees S., et al. Off-therapy response after nucleos(t)ide analogue withdrawal in patients with chronic hepatitis B: An international, multicenter, multiethnic cohort (RETRACT-B Study). *Gastroenterology.* 2022; 162(3): 757–71.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.11.002>
 19. Di Dato F., Iorio R. Expanding indications for chronic hepatitis B treatment: Is it really desirable to treat everyone? *World J. Gastroenterol.* 2024; 30(17): 2294–7. <https://doi.org/10.3748/wjg.v30.i17.2294>
 20. Gerlich W.H., Bremer C., Saniewski M., Schüttler C.G., Wend U.C., Willems W.R., et al. Occult hepatitis B virus infection: detection and significance. *Dig. Dis.* 2010; 28(1): 116–25. <https://doi.org/10.1159/000282074>
 21. Kleinman S.H., Busch M.P. Assessing the impact of HBV NAT on window period reduction and residual risk. *J. Clin. Virol.* 2006; 36(Suppl. 1): S23–9. [https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(06\)80005-3](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(06)80005-3)
 22. Golubeva I.F., Shal'nova E.E., Bochkova G.B. Infection risks and ensuring the safety of donated blood and its components. *Laboratornaya diagnostika infektsionnykh zabolevaniy.* 2019; (1): 6–21. (in Russian)
 23. Heim K., Sagar, Sogukpinar Ö., Llewellyn-Lacey S., Price D.A., Emmerich F., et al. Attenuated effector T cells are linked to control of chronic HBV infection. *Nat. Immunol.* 2024; 25(9): 1650–62. <https://doi.org/10.1038/s41590-024-01928-4>
 24. European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2017; 67(2): 370–98. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.021>
 25. Budzinska M.A., Shackel N.A., Urban S., Tu T. Cellular genomic sites of hepatitis B virus DNA integration. *Genes (Basel).* 2018; 9(7): 365. <https://doi.org/10.3390/genes9070365>
 26. Raimondo G., Locarnini S., Pollicino T., Levrero M., Zoulim F., Lok A.S., et al. Update of the statements on biology and clinical impact of occult hepatitis B virus infection. *J. Hepatol.* 2019; 71(2): 397–408. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.03.034>
 27. Wang C., Xue R., Wang X., Xiao L., Xian J. High-sensitivity HBV DNA test for the diagnosis of occult HBV infection: commonly used but not reliable. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2023; 13: 1186877. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1186877>
 28. Fang Z.L., Zhuang H., Wang X.Y., Ge X.M., Harrison T.J. Hepatitis B virus genotypes, phylogeny and occult infection in a region with a high incidence of hepatocellular carcinoma in China. *World J. Gastroenterol.* 2004; 10(22): 3264–8. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i22.3264>

29. Mo Y., Jin F., Li D., Zou W., Zhong J., Tong Z., et al. Prevalence and molecular characteristics of occult hepatitis B virus infection among blood donors in Huzhou City, eastern China. *Gene*. 2024; 927: 148718. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2024.148718>
30. Pisaturo M., Onorato L., Russo A., Chiodini P., Coppola N. An estimation of the prevalence of occult HBV infection in Western Europe and in Northern America: A meta-analysis. *J. Viral Hepat.* 2020; 27(4): 415–27. <https://doi.org/10.1111/jvh.13248>
31. Ji D.Z., Pang X.Y., Shen D.T., Liu S.N., Goyal H., Xu H.G. Global prevalence of occult hepatitis B: A systematic review and meta-analysis. *J. Viral Hepat.* 2022; 29(5): 317–29. <https://doi.org/10.1111/jvh.13660>
32. Fu M.X., Faddy H.M., Candotti D., Groves J., Saa P., Styles C., et al. International review of blood donation screening for anti-HBc and occult hepatitis B virus infection. *Transfusion*. 2024; 64(11): 2144–56. <https://doi.org/10.1111/trf.18018>
33. Serikova E.N., Semenov A.V., Ostankova Yu.V., Totolian A.A. A method for detecting hepatitis B virus in blood plasma at low viral load using real-time PCR. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2021; 65(1): 59–64. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2021-66-1-59-64> <https://elibrary.ru/fagbfm> (in Russian)
34. Tung T.T., Schmid J., Nghia V.X., Cao L.C., Linh L.T.K., Rungtung I., et al. Low risk of occult hepatitis B infection among Vietnamese blood donors. *Pathogens*. 2022; 11(12): 1524. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121524>
35. Ndow G., Cessay A., Cohen D., Shimakawa Y., Gore M.L., Tamba S., et al. Prevalence and clinical significance of occult hepatitis B infection in the Gambia, West Africa. *J. Infect. Dis.* 2022; 226(5): 862–70. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab327>
36. Mbencho M.N., Hafza N., Cao L.C., Mingo V.N., Achidi E.A., Ghogomu S.M., et al. Incidence of Occult Hepatitis B Infection (OBI) and hepatitis B genotype characterization among blood donors in Cameroon. *PLoS One*. 2024; 19(10): e0312126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0312126>
37. Simpore A., Bazie B.V.E.J.T., Yooda P.A., Zoure A.A., Sawadogo S., Sawadogo A.G., et al. Seroprevalence of viral hepatitis B and occult hepatitis B among blood donors in Africa: a systematic review and meta-analysis. *Rev. Med. Virol.* 2024; 34(6): e70006. <https://doi.org/10.1002/rmv.70006>
38. Semenenko T.A., Yarosh L.V., Bazhenov A.I., Nikitina G.Yu., Kleimenov D.A., Elgort D.A., et al. Epidemiological assessment of the prevalence of “occult” forms and HBsAg mutants of hepatitis B virus in hematological patients. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2012; (6): 9–14. (in Russian)
39. Ostankova Yu.V., Serikova E.N., Shirshova N.Yu., Kusevichkaya M.B., Gorskaya O.A., Basina V.V., et al. Prevalence of latent form of chronic hepatitis B among blood donors in St. Petersburg. *Infektsiya i immunitet*. 2023; 13(6): 1129–40. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-POO-14480> <https://elibrary.ru/xhpybw> (in Russian)
40. Ganina A.A., Kyuregyan K.K., Isaeva O.V., Dmitriev P.N., Mardany S.G., Michailov M.I. The frequency of detection of “occult” hepatitis B among people with drug addiction and blood donors. *Narkologiya*. 2008; 7(9): 70–4. <https://elibrary.ru/kaybtj> (in Russian)
41. Xia R., Peng J., He J., Jiang P., Yuan C., Liu X., et al. The serious challenge of occult hepatitis B virus infection-related hepatocellular carcinoma in China. *Front. Microbiol.* 2022; 13: 840825. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.840825>
42. Im Y.R., Jagdish R., Leith D., Kim J.U., Yoshida K., Majid A., et al. Prevalence of occult hepatitis B virus infection in adults: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* 2022; 7(10): 932–42. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(22\)00201-1](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(22)00201-1)
43. Bucio-Ortiz L., Enriquez-Navarro K., Maldonado-Rodríguez A., Torres-Flores J.M., Cevallos A.M., Salcedo M., et al. Occult hepatitis B virus infection in hepatic diseases and its significance for the WHO’s elimination plan of viral hepatitis. *Pathogens*. 2024; 13(8): 662. <https://doi.org/10.3390/pathogens13080662>
44. Takuisu G.R., Kenmoe S., Amougou Atsama M., Atenguena Okobalemba E., Mbagu 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>
45. Candotti D., Boizeau L., Laperche S. Occult hepatitis B infection and transfusion-transmission risk. *Transfus. Clin. Biol.* 2017; 24(3): 189–95. <https://doi.org/10.1016/j.tracbi.2017.06.014>
46. Pisaturo M., Onorato L., Russo A., Coppola N. Prevalence of occult HBV infection in Western countries. *J. Med. Virol.* 2020; 92(12): 2917–29. <https://doi.org/10.1002/jmv.25867>
47. Elbahrawy A., Alaboudy A., El Moghazy W., Elwassief A., Alashker A., Abdallah A.M. Occult hepatitis B virus infection in Egypt. *World J. Hepatol.* 2015; 7(12): 1671–8. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i12.1671>
48. Azzam A., Khaled H., El-Kayal E.S., Gad F.A., Omar S. Prevalence of occult hepatitis B virus infection in Egypt: a systematic review with meta-analysis. *J. Egypt. Public Health Assoc.* 2023; 98(1): 13. <https://doi.org/10.1186/s42506-023-00138-4>
49. Kajogoo V.D., Swai S.S., Gurung S. Prevalence of occult hepatitis B among HIV-positive individuals in Africa: A systematic review and meta-analysis. *SAGE Open Med.* 2022; 10: 20503121211072748. <https://doi.org/10.1177/20503121211072748>
50. Enriquez-Navarro K., Maldonado-Rodríguez A., Rojas-Montes O., Torres-Ibarra R., Bucio-Ortiz L., De la Cruz M.A., et al. Identification of mutations in the S gene of hepatitis B virus in HIV positive Mexican patients with occult hepatitis B virus infection. *Ann. Hepatol.* 2020; 19(5): 507–15. <https://doi.org/10.1016/j.aohp.2020.06.002>
51. García-Montalvo B.M., Ventura-Zapata L.P. Molecular and serological characterization of occult hepatitis B infection in blood donors from Mexico. *Ann. Hepatol.* 2011; 10(2): 133–41.
52. Morozov I.A., Il’chenko L.Yu., Gromova N.I., Fyodorov I.G., Gordeychuk I.V., Knyazhentsseva A.K., et al. Problems of latent infection caused by the hepatitis B virus. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2012; 22(4): 58–65. <https://elibrary.ru/piwdpl> (in Russian)
53. Delghandi S., Raoufinia R., Shahtahmasbi S., Meshkat Z., Gouklani H., Gholoobi A. An overview of occult hepatitis B infection (OBI) with emphasis on HBV vaccination. *Heliyon*. 2024; 10(17): e37097. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e37097>
54. Yip T.C., Wong G.L., Wong V.W., Tse Y.K., Lui G.C., Lam K.L., et al. Durability of hepatitis B surface antigen seroclearance in untreated and nucleos(t)ide analogue-treated patients. *J. Hepatol.* 2017; 68(1): 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.09.018>
55. Liu W.J., Wu W.J., Lin C.L., Liu C.J., Huang Y.W., Hu J.T., et al. Impact of age at HBsAg seroclearance on hepatic outcomes and life expectancy in men with chronic HBV infection based on multi-state modeling of the natural history. *J. Gastroenterol.* 2025; 60(1): 107–17. <https://doi.org/10.1007/s00535-024-02162-3>
56. Leowattana W., Leowattana P., Leowattana T. Quantitative hepatitis B core antibody and quantitative hepatitis B surface antigen: Novel viral biomarkers for chronic hepatitis B management. *World J. Hepatol.* 2024; 16(4): 550–65. <https://doi.org/10.4254/wjh.v16.i4.550>
57. El Jamaly H., Eslick G.D., Weltman M. Meta-analysis: hepatitis B reactivation in patients receiving biological therapy. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2022; 56(7): 1104–8. <https://doi.org/10.1111/apt.17155>
58. Morrone A., Fiorilli V., Cinti L., Roberto P., Ferri A.L., Visentini M., et al. Surface antigen serocleared hepatitis B virus infection increases the risk of mixed cryoglobulinemia vasculitis in male patients with chronic hepatitis C. *Front. Immunol.* 2024; 15: 1411146. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1411146>
59. Saravanan S., Shankar E.M., Vignesh R., Ganesh P.S., Sankar S., Velu V., et al. Occult hepatitis B virus infection and current perspectives on global WHO 2030 eradication. *J. Viral Hepat.* 2024; 31(7): 423–31. <https://doi.org/10.1111/jvh.13928>
60. Peng J., Yao X., Yuan C., Liu X., Xia R., He J., et al. The investigation of hepatitis B vaccine immune responses in occult hepatitis B virus-infected patients. *Front. Immunol.* 2022; 13: 903685. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.903685>
61. Tang X., Yang L., Zhang P., Wang C., Luo S., Liu B., et al. Occult hepatitis B virus infection and liver fibrosis in Chinese patients. *J. Infect. Dis.* 2023; 228(10): 1375–84. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiad140>
62. Yurlov K.I., Masalova O.V., Kisteneva L.B., Khlopova I.N., Samokhvalov E.I., Malinovskaya V.V. et al. Human herpesviruses increase the severity of hepatitis. *Biology (Basel)*. 2021; 10(6): 483. <https://doi.org/10.3390/biology10060483>
63. Berasain C., Betés M., Panizo A., Ruiz J., Herrero J.I., Civeira M.P., et al. Pathological and virological findings in patients with persistent hypertransaminasaemia of unknown aetiology. *Gut*. 2000; 47(3): 429–35. <https://doi.org/10.1136/gut.47.3.429>

64. Kaviani M.J., Behbahani B., Mosallai M.J., Sari-Aslani F., Taghavi S.A. Occult hepatitis B virus infection and cryptogenic chronic hepatitis in an area with intermediate prevalence of HBV infection. *World J. Gastroenterol.* 2006; 12(31): 5048–50. <https://doi.org/10.3748/wjg.v12.i31.5048>
65. Anvari F.A., Alavian S.M., Norouzi M., Mahabadi M., Jazayeri S.M. Prevalence and molecular analysis of occult hepatitis B virus infection isolated in a sample of cryptogenic cirrhosis patients in Iran. *Oman Med. J.* 2014; 29(2): 92–6. <https://doi.org/10.5001/omj.2014.23>
66. Hashemi S.J., Hajiani E., Masjedizadeh A., Makvandi M., Shayesteh A.A., Alavinejad S.P., et al. Occult hepatitis B infection in patients with cryptogenic liver cirrhosis in southwest of Iran. *Jundishapur J. Microbiol.* 2015; 8(3): e16873. <https://doi.org/10.5812/jjm.16873>
67. Agarwal N., Naik S., Aggarwal R., Singh H., Somani S.K., Kini D., et al. Occult hepatitis B virus infection as a cause of cirrhosis of liver in a region with intermediate endemicity. *Indian J. Gastroenterol.* 2003; 22(4): 127–31.
68. Ferrari T.C., Xavier M.A., Vidigal P.V., Amaral N.S., Diniz P.A., Resende A.P., et al. Occult hepatitis B virus infection in liver transplant patients in a Brazilian referral center. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2014; 47(11): 990–4. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20143782>
69. Faria A.C., Correa B.H.M., Faria L.C., Vidigal P.V.T., Xavier M.A.P., Ferrari T.C.A. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic liver disease of different etiology in a Brazilian referral center: comparison of two different hepatitis B virus deoxyribonucleic acid amplification protocols: a cross-sectional study. *Sao Paulo Med. J.* 2022; 141(3): e2022147. <https://doi.org/10.1590/1516-3180.2022.0147.R1.12072022>
70. Daher D., Seif El Dahan K., Cano A., Gonzales M., Ransom C., Jaurez E., et al. Hepatocellular carcinoma surveillance patterns and outcomes in patients with cirrhosis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2024; 22(2): 295–304.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2023.08.003>
71. Kim G.A., Lee H.C., Kim M.J., Ha Y., Park E.J., An J., et al. Incidence of hepatocellular carcinoma after HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B patients: a need for surveillance. *J. Hepatol.* 2015; 62(5): 1092–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.11.031>
72. Yip T.C., Wong G.L., Chan H.L., Tse Y.K., Lam K.L., Lui G.C., et al. HBsAg seroclearance further reduces hepatocellular carcinoma risk after complete viral suppression with nucleos(t)ide analogues. *J. Hepatol.* 2019; 70(3): 361–70. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.10.014>
73. Yang H., Bae S.H., Nam H., Lee H.L., Lee S.W., Yoo S.H., et al. A risk prediction model for hepatocellular carcinoma after hepatitis B surface antigen seroclearance. *J. Hepatol.* 2022; 77(3): 632–41. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.03.032>
74. Yip T.C., Wong V.W., Lai M.S., Lai J.C., Hui V.W., Liang L.Y., et al. Risk of hepatic decompensation but not hepatocellular carcinoma decreases over time in patients with hepatitis B surface antigen loss. *J. Hepatol.* 2023; 78(3): 524–33. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.11.020>
75. Varghese N., Majeed A., Nyalakonda S., Boortalary T., Halegoua-DeMarzio D., Hann H.W. Review of related factors for persistent risk of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Cancers (Basel).* 2024; 16(4): 777. <https://doi.org/10.3390/cancers16040777>
76. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* 2021; 71(3): 209–49. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
77. Zhou M., Wang H., Zeng X., Yin P., Zhu J., Chen W., et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet.* 2019; 394(10204): 1145–58. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)30427-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)30427-1)
78. Péneau C., Imbeaud S., La Bella T., Hirsch T.Z., Caruso S., Calderaro J., et al. Hepatitis B virus integrations promote local and distant oncogenic driver alterations in hepatocellular carcinoma. *Gut.* 2022; 71(3): 616–26. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-323153>
79. Dias J.D., Sarica N., Courmac A., Koszul R., Neuveut C. Crosstalk between hepatitis B virus and the 3d genome structure. *Viruses.* 2022; 14(2): 445. <https://doi.org/10.3390/v14020445>
80. Zhang M., Chen H., Liu H., Tang H. The impact of integrated hepatitis B virus DNA on oncogenesis and antiviral therapy. *Biomark. Res.* 2024; 12(1): 84. <https://doi.org/10.1186/s40364-024-00611-y>
81. Huo T.I., Wu J.C., Lee P.C., Chau G.Y., Lui W.Y., Tsay S.H., et al. Sero-clearance of hepatitis B surface antigen in chronic carriers does not necessarily imply a good prognosis. *Hepatology.* 1998; 28(1): 231–6. <https://doi.org/10.1002/hep.510280130>
82. Yuen M.F., Wong D.K., Fung J., Ip P., But D., Hung I., et al. HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B in Asian patients: replicative level and risk of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2008; 135(4): 1192–9. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.07.008>
83. Yip T.C., Chan H.L., Wong V.W., Tse Y.K., Lam K.L., Wong G.L. Impact of age and gender on risk of hepatocellular carcinoma after hepatitis B surface antigen seroclearance. *J. Hepatol.* 2017; 67(5): 902–8. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.06.019>
84. Ji M., Hu K. Recent advances in the study of hepatitis B virus covalently closed circular DNA. *Viral. Sin.* 2017; 32(6): 454–64. <https://doi.org/10.1007/s12250-017-4009-4>
85. Kaur S.P., Talat A., Karimi-Sari H., Grees A., Chen H.W., Lau D.T.Y., et al. Hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus-infected patients and the role of hepatitis B surface antigen (HBsAg). *J. Clin. Med.* 2022; 11(4): 1126. <https://doi.org/10.3390/jcm11041126>
86. Ghany M.G., Buti M., Lampertico P., Lee H.M.; 2022 AASLD-EASL HBV-HDV Treatment Endpoints Conference Faculty. Guidance on treatment endpoints and study design for clinical trials aiming to achieve cure in chronic hepatitis B and D: Report from the 2022 AASLD-EASL HBV-HDV Treatment Endpoints Conference. *J. Hepatol.* 2023; 79(5): 1254–69. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.06.002>
87. Gounder P.P., Bulkow L.R., Snowball M., Negus S., Spradling P.R., Simons B.C., et al. Nested case-control study: hepatocellular carcinoma risk after hepatitis B surface antigen seroclearance. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2016; 43(11): 1197–207. <https://doi.org/10.1111/apt.13621>
88. Kuang X.J., Jia R.R., Huo R.R., Yu J.J., Wang J.J., Xiang B.D., et al. Systematic review of risk factors of hepatocellular carcinoma after hepatitis B surface antigen seroclearance. *J. Viral Hepat.* 2018; 25(9): 1026–37. <https://doi.org/10.1111/jvh.12905>
89. Mak L.Y., Wong D.K., Pollicino T., Raimondo G., Hollinger F.B., Yuen M.F. Occult hepatitis B infection and hepatocellular carcinoma: Epidemiology, virology, hepatocarcinogenesis and clinical significance. *J. Hepatol.* 2020; 73(4): 952–64. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.05.042>
90. Wong D.K., Cheng S.C.Y., Mak L.L., To E.W., Lo R.C., Cheung T.T., et al. Among patients with undetectable hepatitis B surface antigen and hepatocellular carcinoma, a high proportion has integration of HBV DNA into hepatocyte DNA and no cirrhosis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 2020; 18(2): 449–56. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2019.06.029>
91. Huang Y., Li W., Hu H.T., Ruan S.M., Xian M.F., Xie X.Y., et al. Contrast-enhanced US diagnostic algorithm of hepatocellular carcinoma in patients with occult hepatitis B. *Abdom. Radiol. (NY).* 2022; 47(2): 608–17. <https://doi.org/10.1007/s00261-021-03343-x>
92. Wong D.K., Huang F.Y., Lai C.L., Poon R.T., Seto W.K., Fung J., et al. Occult hepatitis B infection and HBV replicative activity in patients with cryptogenic cause of hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2011; 54(3): 829–36. <https://doi.org/10.1002/hep.24551>
93. Morozov S., Batsikh S. Commentary: Hepatitis B virus infection: an insight into the clinical connection and molecular interaction between hepatitis B virus and host extrahepatic cancer risk. *Front. Immunol.* 2023; 14: 1200405. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1200405>
94. Batsikh S., Morozov S., Dorofeev A., Borunova Z., Kostyushev D., Brezgin S., et al. Previous hepatitis B viral infection—an underestimated cause of pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* 2022; 28(33): 4812–22. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i33.4812>
95. Rosenberg M., Poluch M., Thomas C., Sindaco P., Khoo A., Porcu P. Hepatitis B virus and B-cell lymphoma: evidence, unmet need, clinical impact, and opportunities. *Front. Oncol.* 2023; 13: 1275800. <https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1275800>
96. Dunleavy K. Double-hit lymphoma: optimizing therapy. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 2021; 2021(1): 157–63. <https://doi.org/10.1182/hematology.2021000247>
97. Barraclough A., Hawkes E., Sehn L.H., Smith S.M. Diffuse large B-cell lymphoma. *Hematol. Oncol.* 2024; 42(6): e3202. <https://doi.org/10.1002/hon.3202>
98. Li M., Gan Y., Fan C., Yuan H., Zhang X., Shen Y., et al. Hepatitis B virus and risk of non-Hodgkin lymphoma: an updated meta-analysis

- of 58 studies. *J. Viral. Hepat.* 2018; 25(8): 894–903. <https://doi.org/10.1111/jvh.12892>
99. Spradling P.R., Xing J., Zhong Y., Rupp L.B., Moorman A.C., Lu M., et al. Incidence of malignancies among patients with chronic hepatitis B in US Health Care Organizations, 2006–2018. *J. Infect. Dis.* 2022; 226(5): 896–900. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac011>
 100. Bersoff-Matcha S.J., Cao K., Jason M., Ajao A., Jones S.C., Meyer T., et al. Hepatitis B virus reactivation associated with direct-acting antiviral therapy for chronic hepatitis C virus: a review of cases reported to the U.S. Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System. *Ann. Intern. Med.* 2017; 166(11): 792–8. Doi: <https://doi.org/10.7326/m17-0377>
 101. Pisaturo M., Macera M., Alessio L., Calò F., Coppola N. Hepatitis B virus (HBV) reactivation following pharmacological eradication of hepatitis C virus (HCV). *Viruses.* 2019; 11(9): 850. <https://doi.org/10.3390/v11090850>
 102. Osman H.A., Ghweil A.A., Sabry A.M., Mahdy R.E., Khodeary A. Management of patients with hepatitis B virus reactivation post-DAA treatment of chronic hepatitis C virus infection In HCV-HBV coinfectd patients with pretreatment HBeAg seroconversion and early degree of hepatic fibrosis. *Infect. Drug Resist.* 2019; 12: 3067–73. <https://doi.org/10.2147/IDR.S215974>
 103. Liu C.J., Sheen I.S., Chen C.Y., Chuang W.L., Wang H.Y., Tseng K.C., et al. Ledipasvir/Sofosbuvir for patients coinfectd with chronic hepatitis C and hepatitis B in Taiwan: follow-up at 108 weeks posttreatment. *Clin. Infect. Dis.* 2022; 75(3): 453–9. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab971>
 104. Lam L.K., Chan T.S.Y., Hwang Y.Y., Mak L.Y., Seto W.K., Kwong Y.L., et al. Hepatitis B virus reactivation in seronegative occult hepatitis B patient receiving ibritinib therapy. *Virol. J.* 2023; 20(1): 168. <https://doi.org/10.1186/s12985-023-02140-w>
 105. Toka B., Köksal A.Ş., Dertli R., Şirin G., Fidan S., Ülger Y., et al. Hepatitis B reactivation in patients treated with direct-acting antivirals for hepatitis C. *Dig. Dis.* 2022; 40(5): 635–43. <https://doi.org/10.1159/000521298>
 106. Meschi S., Mizzoni K., Leoni B.D., Galli C., Garbuglia A.R., Belladonna S., et al. Occult HBV infection in patients infected by HIV or HCV: Comparison between HBV-DNA and two assays for HBsAg. *Viruses.* 2024; 16(3): 412. <https://doi.org/10.3390/v16030412>
 107. Maqsood Q., Sumrin A., Iqbal M., Younas S., Hussain N., Mahnoor M., et al. Hepatitis C virus/hepatitis B virus coinfection: Current prospectives. *Antivir. Ther.* 2023; 28(4): 13596535231189643. <https://doi.org/10.1177/13596535231189643>
 108. Colombatto P., Palmisano E., Ricco G., Cavallone D., Oliveri F., Coco B., et al. Different kinetics of HBV-DNA and HBsAg in HCV coinfectd patients during DAAs therapy. *J. Clin. Med.* 2022; 11(5): 1406. <https://doi.org/10.3390/jcm11051406>
 109. Connors E.E., Panagiotakopoulos L., Hofmeister M.G., Spradling P.R., Hagan L.M., Harris A.M., et al. Screening and testing for hepatitis B virus infection: CDC recommendations – United States, 2023. *MMWR Recomm. Rep.* 2023; 72(1): 1–25. <https://doi.org/10.15585/mmwr.r7201a1>
 110. Rodríguez-Tajes S., Miralpeix A., Costa J., López-Suñé E., Laguno M., Pocurull A., et al. Low risk of hepatitis B reactivation in patients with severe COVID-19 who receive immunosuppressive therapy. *J. Viral Hepat.* 2021; 28(1): 89–94. <https://doi.org/10.1111/jvh.13410>
 111. Mihai N., Olariu M.C., Ganea O.A., Adamescu A.I., Molagic V., Aramă Ş.S., et al. Risk of hepatitis B virus reactivation in COVID-19 patients receiving immunosuppressive treatment: a prospective study. *J. Clin. Med.* 2024; 13(20): 6032. <https://doi.org/10.3390/jcm13206032>
 112. Wu J., He J., Xu H. Global prevalence of occult HBV infection in children and adolescents: A systematic review and meta-analysis. *Ann. Hepatol.* 2024; 29(1): 101158. <https://doi.org/10.1016/j.aohp.2023.101158>
 113. Tsui J.L., French A.L., Seaberg E.C., Augenbraun M., Nowicki M., Peters M., et al. Prevalence and long-term effects of occult hepatitis B virus infection in HIV-infected women. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 45(6): 736–40. <https://doi.org/10.1086/520989>
 114. Hwang J.P., Vierling J.M., Zelenetz A.D., Lackey S.C., Loomba R. Hepatitis B virus management to prevent reactivation after chemotherapy: a review. *Support Care Cancer.* 2012; 20(11): 2999–3008. <https://doi.org/10.1007/s00520-012-1576-7>
 115. Shouval D., Shibolet O. Immunosuppression and HBV reactivation. *Semin. Liver Dis.* 2013; 33(2): 167–77. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1345722>
 116. Chen K.L., Chen J., Rao H.L., Guo Y., Huang H.Q., Zhang L., et al. Hepatitis B virus reactivation and hepatitis in diffuse large B-cell lymphoma patients with resolved hepatitis B receiving rituximab-containing chemotherapy: risk factors and survival. *Chin. J. Cancer.* 2015; 34(5): 225–34. <https://doi.org/10.1186/s40880-015-0015-9>
 117. Mezzacappa C., Lim J.K. Management of HBV reactivation: challenges and opportunities. *Clin. Liver Dis. (Hoboken).* 2024; 23(1): e0143. <https://doi.org/10.1097/CLD.0000000000000143>
 118. Anvari S., Tsoi K. Hepatitis B virus reactivation with immunosuppression: a hidden threat? *J. Clin. Med.* 2024; 13(2): 393. <https://doi.org/10.3390/jcm13020393>
 119. Zhu Y., Li H., Wang X., Zheng X., Huang Y., Chen J., et al. Hepatitis B virus reactivation increased the risk of developing hepatic failure and mortality in cirrhosis with acute exacerbation. *Front. Microbiol.* 2022; 13: 910549. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.910549>
 120. Papatheodoridis G.V., Lekakis V., Voulgaris T., Lampertico P., Berg T., Chan H.L.Y., et al. Hepatitis B virus reactivation associated with new classes of immunosuppressants and immunomodulators: A systematic review, meta-analysis, and expert opinion. *J. Hepatol.* 2022; 77(6): 1670–89. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.07.003>
 121. Savaliya B.P., Shekouhi R., Mubarak F., Manaise H.K., Jimenez P.B., Kowkabany G., et al. Risk of hepatitis B virus reactivation in cancer patients undergoing treatment with tyrosine kinase-inhibitors. *World J. Gastroenterol.* 2024; 30(24): 3052–8. <https://doi.org/10.3748/wjg.v30.i24.3052>
 122. Ma H., Yan Q.Z., Ma J.R., Li D.F., Yang J.L. Overview of the immunological mechanisms in hepatitis B virus reactivation: Implications for disease progression and management strategies. *World J. Gastroenterol.* 2024; 30(10): 1295–312. <https://doi.org/10.3748/wjg.v30.i10.1295>

Информация об авторе:

Куш Алла Александровна — д-р биол. наук, профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Москва, Россия. E-mail: vitalku@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3396-5533>

Участие авторов: Куш А.А. — написание обзора, научное редактирование.

Information about the author:

Alla A. Kushch — D.Sci. (Biol.), Prof., Senior Researcher at the Laboratory of Cell Engineering, N.F. Gamaleya NRCM, Moscow, Russia. E-mail: vitalku@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3396-5533>

Contribution: Kushch A.A. — review writing, scientific editing.

Поступила 24.02.2025
Принята в печать 20.04.2025
Опубликована 30.08.2025

REVIEW

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-328>

© AGBAJELOLA V.I., OLUWADARE F.A., HAMMAN M.M., LATEEF A.M., 2025



Zika Virus in the Shadows: An Underrecognized Contributor to Nigeria's Febrile Disease Landscape

Victor I. Agbajelola^{1,2✉}, Franklyn A. Oluwadare³, Mark M. Hamman², Adeola M. Lateef²

¹Department of Veterinary Parasitology, University of Ibadan, Oyo State, Nigeria;

²Department of Veterinary Pathobiology, University of Missouri, Columbia 65211, MO, USA;

³Vaccine Production and Quality Control Program, Pan African University Life and Earth Sciences Institute, Including (Health and Agriculture) – PAULESI, University of Ibadan, Oyo State, Nigeria

Abstract

Background. Zika virus (*Orthoflavivirus zikaense*), a mosquito-borne virus in the family Flaviviridae and genus *Orthoflavivirus*, has garnered international attention due to its neurological and congenital impacts. Although endemic to Africa, its presence in Nigeria remains poorly understood and often overshadowed by other febrile illnesses such as malaria and dengue. This review synthesizes peer-reviewed literature published between 2015 and 2025 to explore the epidemiology, diagnostic challenges, and public health implications of ZIKV in Nigeria.

Materials and methods. A narrative synthesis of studies reporting ZIKV infection in Nigeria was conducted using targeted searches of PubMed, Scopus, Web of Science, and African Journals Online. Eligible studies included peer-reviewed articles in English reporting serological or molecular data from human or vector populations.

Results. Evidence from eleven studies across ten states shows seroprevalence of ZIKV ranging from 1.4% to over 50%, particularly among pregnant women and febrile patients. Diagnostic gaps, including symptom overlap and serological cross-reactivity, contribute to underreporting. Co-endemicity with other arboviruses and limited surveillance further obscure ZIKV's public health impact.

Conclusion. ZIKV likely circulates silently in Nigeria, sustained by ecological and infrastructural factors. Fragmented vector control, inadequate diagnostics, and lack of integrated arboviral surveillance hinder timely recognition. Lessons from other Aedes-borne viruses should inform a more unified and proactive national strategy.

Keywords: *Zika virus; arboviruses; Nigeria; fever; pregnant women*

For citation: Agbajelola V.I., Oluwadare F.A., Hamman M.M., Lateef A.M. Zika Virus in the Shadows: An Under-recognized Contributor to Nigeria's Febrile Disease Landscape. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2025; 70(4): 317–323. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-328> EDN: <https://elibrary.ru/bimlfa>

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.

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-328>

Вирус Зика в тени: недооцененный фактор в эпидемиологии лихорадочных заболеваний в Нигерии

Agbajelola V.I.^{1,2✉}, Oluwadare F.A.³, Hamman M.M.², Lateef A.M.²

¹Кафедра ветеринарной паразитологии, Университет Ибадана, штат Ойо, Нигерия;

²Кафедра ветеринарной патобиологии, Университет Миссури, Колумбия, штат Миссури, 65211, США;

³Программа по производству и контролю качества вакцин, Институт наук о жизни и Земле Панафриканского университета (включая здравоохранение и сельское хозяйство) – PAULESI, Университет Ибадана, штат Ойо, Нигерия

Аннотация

Предпосылки. Передаваемый комарами вирус Зика (*Orthoflavivirus zikaense*), представитель семейства Flaviviridae рода *Orthoflavivirus*, привлекает международное внимание из-за своих неврологических и врожденных последствий. Хотя вирус является эндемичным для Африки, его распространенность в Нигерии остается малоизученной и часто маскируется другими лихорадочными заболеваниями, такими как малярия и лихорадка денге. В настоящем обзоре обобщены данные исследований, опубликованных в рецензируемых журналах в период с 2015 по 2025 г., с целью анализа эпидемиологических особенностей, диагностических трудностей и значения для общественного здравоохранения инфекции, вызываемой вирусом Зика, в Нигерии.

Материалы и методы. Был проведен нарративный синтез исследований, сообщающих о случаях заражения вирусом Зика в Нигерии, с использованием целенаправленного поиска в базах данных PubMed, Scopus, Web of Science и African Journals Online. Включали рецензируемые статьи на английском языке, содержащие серологические или молекулярные данные, полученные при исследованиях в популяциях людей или переносчиков вирусов.

Результаты. Данные 11 исследований в 10 штатах показывают, что серопревалентность вируса Зика варьирует от 1,4% до более чем 50%, особенно среди беременных женщин и пациентов с лихорадочными состояниями. Диагностические пробелы, связанные со схожестью симптомов и серологической перекрестной реактивностью, способствуют недооценке распространенности вируса. Коциркуляция с другими арбовирусами и ограниченный охват эпидемиологическим надзором дополнительно затрудняют оценку бремени вируса Зика на общественное здоровье.

Заключение. Вирус Зика, вероятно, циркулирует в Нигерии скрытно, чему способствуют экологические и инфраструктурные факторы. Несистематический контроль за переносчиками, ограниченные возможности диагностики и отсутствие интегрированного надзора за арбовирусами мешают своевременному выявлению инфекции. Опыт борьбы с другими вирусами, передающимися комарами рода *Aedes*, должен лечь в основу унифицированной и активной национальной стратегии борьбы с инфекцией, вызываемой вирусом Зика.

Ключевые слова: вирус Зика; арбовирусы; Нигерия; лихорадка; беременные женщины

Для цитирования: Agbajelola V.I., Oluwadare F.A., Hamman M.M., Lateef A.M. Вирус Зика в тени: недооцененный фактор в эпидемиологии лихорадочных заболеваний в Нигерии. Вопросы вирусологии. 2025; 70(4): 317–323. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-328> EDN: <https://elibrary.ru/bimlfa>

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

Zika virus (ZIKV), now taxonomically classified as *Orthoflavivirus zikaense* under the genus *Orthoflavivirus* and family *Flaviviridae* following ICTV ratification in April 2023, is a mosquito-borne virus that has gained global notoriety due to its strong association with severe neurological and congenital disorders, notably Guillain-Barré syndrome and microcephaly in newborns [1, 2]. The virus was first isolated in 1947 from a rhesus monkey in Uganda's Zika Forest and was initially considered of limited clinical relevance. However, it is now recognized as a serious public health threat due to its diverse transmission routes and potential for large outbreaks. ZIKV is primarily transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, mosquitoes well-adapted to tropical and subtropical urban environments [3]. Additionally, non-vector modes of transmission such as vertical transmission during pregnancy, sexual transmission, and via blood transfusions and organ transplants contribute to its epidemiological complexity [4]. Although most infections are asymptomatic or present with mild symptoms like fever, rash, conjunctivitis, and arthralgia, the virus's potential for causing debilitating outcomes in specific populations warrants serious concern.

The global burden of ZIKV was exemplified during the explosive outbreak in the Americas between 2015 and 2016. During this period, the rise in congenital Zika syndrome (CZS) and neurological complications led the World Health Organization (WHO) to declare ZIKV a Public Health Emergency of International Concern (PHEIC) in February 2016 [5]. Brazil, the epicenter of the outbreak, reported over 200,000 suspected cases and more than 2,000 confirmed cases of microcephaly by late 2016, illustrating the virus's profound clinical

and socioeconomic impacts [5]. In several affected countries, the outbreaks overwhelmed healthcare systems, exposed gaps in diagnostic infrastructure, and highlighted the fragility of surveillance mechanisms in low- and middle-income settings.

Despite ZIKV's African origin, its early history on the continent, including Nigeria, has been characterized by sparse and inconsistent surveillance. In Nigeria, ZIKV was first detected in humans in the late 1970s [6]. However, epidemiological interest in the virus has since remained limited, and few systematic efforts have been made to monitor its prevalence or transmission patterns. This neglect is particularly concerning given that Nigeria harbors dense human populations and a widespread presence of competent *Aedes* vectors, especially in urban and peri-urban areas [7]. These ecological and demographic conditions are highly favorable to arboviral transmission, yet ZIKV continues to be eclipsed by more well-recognized arboviruses such as dengue, yellow fever, and chikungunya.

The overlapping clinical presentations of ZIKV with other endemic febrile illnesses, such as malaria, typhoid fever, and dengue further contribute to its diagnostic obscurity. Most patients with ZIKV are misclassified due to non-specific symptoms and low clinical suspicion. Furthermore, laboratory diagnosis is challenged by the serological cross-reactivity of ZIKV antibodies with other flaviviruses, compounded by the limited availability of molecular diagnostic platforms and trained personnel [8]. These factors contribute to a persistent underreporting and misdiagnosis of ZIKV cases, particularly in pregnant women and febrile individuals who are most at risk of adverse outcomes.

Adding to these challenges is the broader context of Nigeria's under-resourced healthcare infrastructure. Frag-

mented vector control programs, inadequate antenatal care utilization, and presumptive treatment of febrile illnesses without confirmatory testing hinder the early identification and management of ZIKV infections. Pregnant women may present late to healthcare facilities or not at all, while febrile patients are frequently treated empirically for malaria or typhoid without laboratory confirmation. These realities suggest that ZIKV may be circulating silently in the population, representing an underrecognized contributor to Nigeria's febrile disease burden.

This review aims to provide a comprehensive synthesis of peer-reviewed literature on Zika virus in Nigeria, published between 2015 and 2025. Specifically, it focuses on the epidemiology of ZIKV in pregnant women and febrile populations, identifies existing diagnostic and surveillance gaps, and contextualizes the findings within the broader framework of arboviral disease control in Nigeria. By doing so, the review highlights the need for greater clinical awareness, enhanced vector control, and investment in diagnostic infrastructure to ensure ZIKV does not continue to remain in the shadows of Nigeria's public health priorities.

This review employed a narrative synthesis approach to summarize current knowledge on ZIKV in Nigeria. A structured and targeted literature search was conducted across major scientific databases including PubMed, Scopus, Web of Science, and African Journals Online (AJOL). The search focused on articles published between 2015 and 2025 and used combinations of relevant keywords such as «Zika virus», «Nigeria», «seroprevalence», «Aedes mosquitoes», and «arbovirus», connected using Boolean operators. Eligible studies were required to be peer-reviewed, published in English, and report original data on ZIKV infections in humans or vectors specific to Nigeria. Given the narrative nature of the review, no formal risk-of-bias assessment tool was employed, but careful attention was given to the methodological quality and relevance of each included study. Where applicable, visualization was created using R software (version 4.3.0), specifically leveraging packages such as *ggplot2* to facilitate clear presentation of data trends and patterns [9].

Epidemiology of Zika Virus in Nigeria (2015–2025)

Although ZIKV has likely circulated in Nigeria for decades, epidemiological data only began to emerge meaningfully in the past ten years. A growing number of hospital-based and population-level studies conducted between 2015 and 2025 have reported serological and, to a lesser extent, molecular evidence of ZIKV infection across at least ten states spanning five geopolitical zones. Despite the expanding body of evidence, the true burden of ZIKV in Nigeria remains unclear due to underdiagnosis, non-specific clinical symptoms, and the absence of routine surveillance.

The reviewed studies, summarized in **Table**, predominantly employed cross-sectional designs targeting pregnant women, febrile patients, blood donors, and general outpatient populations. Reported prevalence estimates vary from 3.45 to 55.6% depending on the population studied, geographic location, and diagnostic methods

used, while the overall prevalence estimates of ZIKV in Nigeria is 13.69% (95% CI: 12.7–14.75%). Notably, several studies reported both IgM and IgG antibody positivity, indicating ongoing and past infections, while a few employed RT-qPCR to confirm active viremia. Pregnant women emerged as a particularly vulnerable group, with some studies revealing double-digit IgM antibody prevalence and a small proportion testing PCR-positive, evidence suggestive of recent transmission and the potential risk of congenital Zika syndrome.

Geographical differences in ZIKV exposure were evident, potentially reflecting variations in vector distribution, urbanization, healthcare access, and diagnostic capacity. Among febrile patients, ZIKV was also detected at moderate rates, raising concerns about its under recognition in clinical settings where malaria and typhoid are more commonly suspected. However, interpretation of seroprevalence findings must be approached cautiously, as many studies relied on serological assays prone to cross-reactivity with other flaviviruses, such as dengue and yellow fever, which are endemic in Nigeria. As shown in **Figure**, the number of ZIKV-related studies in Nigeria has gradually increased over the last decade, with notable peaks in 2023, reflecting a growing but still limited research focus on the virus. Overall, while the evidence base remains limited, available studies suggest that ZIKV is circulating in Nigeria, albeit under the radar and may be contributing to the broader landscape of undiagnosed febrile illnesses.

These findings collectively indicate that ZIKV is not only present but likely underreported in Nigeria, and its detection among pregnant women and febrile patients highlights its clinical and epidemiological relevance, particularly in regions where arboviral surveillance is weak or non-existent. Yet, ZIKV has remained in the shadows of more frequently diagnosed infections such as dengue, malaria, and yellow fever. Meanwhile, the lack of community-based surveillance studies also limits our understanding of asymptomatic and rural infections, and most current data are derived from health facilities, which may not adequately capture infections in populations with limited access to care.

Overlapping Burdens and Diagnostic Blind Spots

ZIKV exists within a complex web of overlapping infectious diseases in Nigeria, particularly in regions burdened by co-circulating arboviruses and other febrile pathogens, and while it gained international attention primarily due to its teratogenic effects in pregnancy, emerging evidence from Nigeria suggests that its impact may extend well beyond this high-risk group, because febrile individuals (who may be harboring ZIKV infections) might be often misdiagnosed or treated presumptively for malaria or typhoid in clinical practice.

One of the major challenges in detecting ZIKV stems from its nonspecific clinical presentation, which mimics common endemic illnesses such as malaria, dengue, and typhoid fever. In regions with high malaria transmission, febrile illnesses are frequently attributed to *Plasmodium falciparum* without laboratory confirmation, effectively exclud-

Table. Summary of reported studies on Zika virus in Nigeria (2015–2025)**Таблица.** Перечень опубликованных исследований по вирусу Зика в Нигерии (2015–2025 гг.)

S/N № п/п	References Ссылки	Study design Дизайн исследования	Population studied Исследуемая популяция	Diagnostic Techniques Диагностические методы	State Штат	Positive cases Положи- тельные случаи	Prev (%) Прева- лент- ность (%)	Total samples Общее количество образцов
1	[10]	Cross-sectional Поперечное	Outpatients, blood donors (incl. pregnant, HIV+) Амбулаторные пациен- ты, доноры крови (вкл. беременных, ВИЧ+)	RecomLine Tropical Fever immunoblot for ZIKV IgG (NS1 & Equad) Иммуно-блот RecomLine Tropical Fever на ZIKV IgG (NS1 и Equad)	Nasarawa (Central), Abia (South), Kaduna (North) Насарава (Центр), Абия (Юг), Кадуна (Север)	167	19.2	871
2	[11]	Cross-sectional Поперечное	Hospital patients Госпитализированные пациенты	ELISA (IgM, IgG), malaria RDT ИФА (IgM, IgG), экс- пресс-тест на малярию	Kaduna Кадуна	61	14.5	420
3	[12]	Cross-sectional Поперечное	Pregnant women attending antenatal care Беременные женщины, посещающие дородовой прием	MAC-ELISA for ZIKV IgM, followed by RT-qPCR confirmation MAC ИФА на ZIKV IgM, подтверждение методом RT-qPCR	Zaria, Ka- duna State (North-West Nigeria) Зария, штат Кадуна (Северо-Запад Нигерии)	53	29.4	180
4	[13]	Cross-sectional Поперечное	Pregnant women Беременные женщины	ELISA and microneutral- ization test (MNT) ИФА и микронейтрализа- ционный тест (MNT)	Gombe Гомбе	53	26.5	200
5	[14]	Cross-sectional Поперечное	Pregnant women Беременные женщины	ELISA IgM/IgG + HI test ИФА IgM/IgG + тест торможения гемагглюти- нации (HI)	Oyo Ойо	20	55.6	36
6	[15]	Cross-sectional Поперечное	Pregnant women Беременные женщины	ELISA + PCR ИФА + ПЦР	Kwara state Квара	32	16.0	200
7	[16]	Cross-sectional Поперечное	Pregnant women Беременные женщины	Zika virus IgG and IgM capture Enzyme-linked immunosorbent assay ИФА тест на Zika IgG и IgM	Lagos state Ларос	12	3.4	352
8	[17]	Cross-sectional Поперечное	Pregnant women Беременные женщины	Commercial sandwich enzyme-linked ELISA- (ZV-IgG) Коммерческий сэн- двич-ИФА тест на ZV-IgG	Plateau Плато	13	14.4	90
9	[18]	Cross-sectional Поперечное	Febrile patients ≥ 1 year Пациенты с лихорадкой ≥ 1 года	Lateral-flow IgM/IgG test Латерально-потоковый тест IgM/IgG	Cross River State Кросс-Ривер	12	12	100
10	[19]	Cross-sectional Поперечное	Mixed outpatients (~ 60% pregnant women) at six healthcare facilities Смешанные амбулатор- ные пациенты (~ 60% беременные) в шести медуздредениях	ZIKV NS1-based ELISA (IgM, IgG); confirmatory neutralization assay; subset RT-PCR ИФА на NS1 ZIKV (IgM, IgG); подтверждающий нейтрализационный тест; RT-PCR подгруппа	North Central Nigeria (6 facilities) Северная Центральная Нигерия (6 учрежде- ний)	48	10	468
11	[20]	Prospective cohort Проспектив- ная когорта	Pregnant women Беременные женщины	Rapid IgM/IgG test, confirmatory ELISA + Neutralization Быстрый тест IgM/IgG, подтверждающий ИФА + нейтрализация	Plateau Плато	38	3.8	1006
12	[21]	Cross-sectional Поперечное	Females of childbearing age Женщины репродуктивного возраста	ELISA + PCR ИФА + ПЦР	Niger & Nasarawa Нигер и Насарава	83	20.8	400

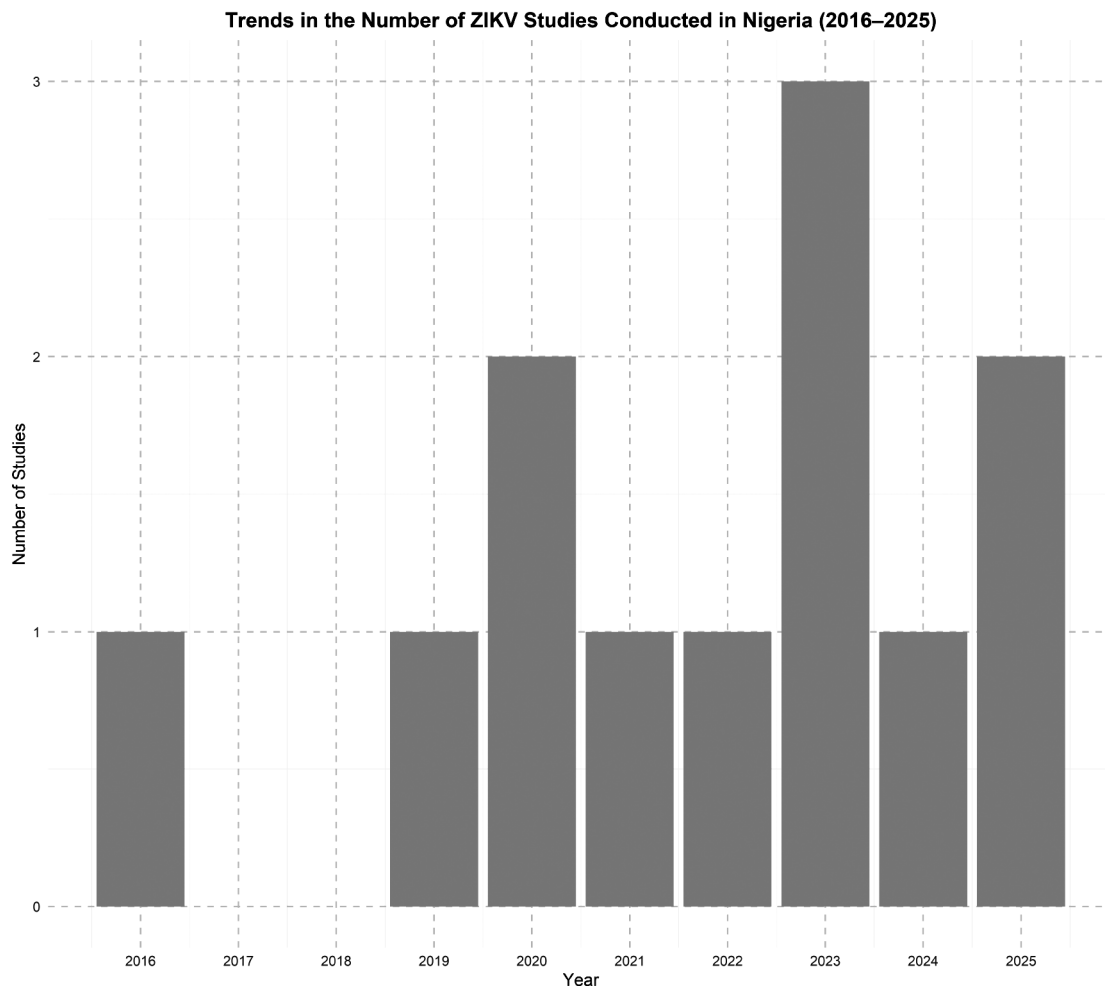


Figure. Trends in Number of studies conducted on ZIKV in Nigeria in the last decade

Рисунок. Динамика количества исследований, посвященных вирусу Зика в Нигерии за последнее десятилетие

ing ZIKV and other arboviruses from clinical consideration [22, 23]. This problem is further amplified in co-infected individuals, where overlapping symptoms such as fever, rash, and joint pain blur the clinical picture, increasing the likelihood of missed or delayed ZIKV diagnoses [24].

Ecological and entomological factors also contribute to this diagnostic blind spot. ZIKV shares vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, with other arboviruses such as dengue virus (DENV), yellow fever virus (YFV), and chikungunya. These vectors thrive in urban and peri-urban areas where water storage practices, poor drainage systems, and dense human populations create ideal breeding environments [24]. The co-circulation of multiple arboviruses within the same ecological and geographical settings increases the likelihood of misdiagnosis and underreporting, especially during outbreaks categorized as “fevers of unknown origin.”

Despite the known presence of competent *Aedes* vectors in Nigeria for decades, vector control efforts remain fragmented, largely reactive, and poorly integrated into broader disease prevention strategies [22, 25]. Factors such as rapid urbanization, poor sanitation infrastructure, and lack of sustained vector surveillance contribute to

persistent arbovirus transmission, including ZIKV. These structural challenges disproportionately affect underserved populations, where access to healthcare, laboratory diagnostics, and vector control measures is already limited [26, 27].

Adding to the problem is the reliance on hospital-based studies for ZIKV surveillance in Nigeria. Most existing data focus on symptomatic individuals who present at healthcare facilities, primarily pregnant women and febrile patients. Consequently, there is a significant knowledge gap regarding asymptomatic or subclinical ZIKV infections, which may constitute a substantial proportion of total cases. Without community-based surveillance systems or routine integration of ZIKV testing into diagnostic panels for febrile illnesses, a large segment of the infected population remains invisible in national health data.

Addressing these diagnostic blind spots will require a multi-pronged approach, including enhanced clinical awareness, improved access to molecular and serological diagnostics, integration of ZIKV into differential diagnosis protocols, and expansion of surveillance beyond healthcare settings to include communities and high-risk populations.

Leveraging Arboviral Overlaps for Improved Zika Virus Control in Nigeria

The overlapping ecology, symptomatology, and transmission pathways of Aedes-borne arboviruses, such as Zika virus (ZIKV), dengue virus (DENV), chikungunya virus, and yellow fever virus (YFV) pose unique challenges for Nigeria's public health response. However, these overlaps also offer critical opportunities to develop integrated and more efficient control strategies, even though Nigeria's response to arboviruses has always been fragmented and largely reactive. The growing body of evidence on ZIKV circulation provides a chance to strengthen broader arboviral surveillance and vector control frameworks.

Experiences from past arboviral outbreaks in Nigeria highlight the urgency of adopting a comprehensive approach to control. Despite the availability of vaccines, diseases like yellow fever continue to cause periodic and deadly outbreaks, such as the 2020 episode in Delta State, which had a case fatality rate of 62.5% [28]. Similarly, the recent emergence of novel dengue virus genotypes in Lagos, affecting both pediatric and geriatric populations, points to ongoing silent transmission in urban areas [29]. These examples underscore the limitations of relying solely on vaccination, especially for arboviruses like ZIKV, for which no vaccine currently exists. Therefore, Nigeria must prioritize integrated and collaborative strategies for arboviral control, focusing on surveillance, vector management, and community engagement to prevent future outbreaks.

Importantly, the shared *Aedes* mosquito vector means that interventions aimed at controlling one virus can have broader benefits, therefore, coordinated efforts in entomological surveillance, such as monitoring vector density, breeding patterns, and insecticide resistance should be prioritized across arboviruses, and not just for ZIKV. Improving diagnostic capacity is equally essential, because the current lack of routine ZIKV testing, particularly in febrile and pregnant populations, limits the country's ability to detect and respond to outbreaks. Introducing ZIKV diagnostics into the standard panel for febrile illnesses and maternal health care would also facilitate early identification and response.

Strategically, ZIKV control in Nigeria should not be pursued in isolation. Instead, it should be embedded within an integrated arboviral response system that promotes intersectoral collaboration among public health authorities, environmental agencies, researchers, and urban planners. Real-time data sharing, early warning systems, and the development of national guidelines for arboviral disease management will help bridge current gaps.

Conclusion

ZIKV remains a largely overlooked but potentially significant contributor to Nigeria's febrile disease burden. Despite its likely silent circulation across various regions of the country, limited awareness, overlapping symptomatology with other endemic diseases, and inadequate diagnostic infrastructure have kept ZIKV in the shadows. The evidence synthesized in this review highlights spo-

radic yet concerning serological and molecular findings, particularly among pregnant women and febrile individuals, underscoring both the epidemiological reality of the virus and the systemic failures to recognize its presence. Nigeria's public health response to arboviruses has historically been reactive and disease specific. However, the ecological and clinical overlaps between ZIKV, dengue, chikungunya, and yellow fever present an opportunity for integrated surveillance and control. The experiences from recent Aedes-borne outbreaks in Nigeria reinforce the need for stronger health system preparedness, sustainable vector control, and diagnostic innovation.

REFERENCES

1. Postler T.S., Beer M., Blitvich B.J., Bukh J., de Lamballerie X., Drexler J.F., et al. Renaming of the genus *Flavivirus* to *Orthoflavivirus* and extension of binomial species names within the family *Flaviviridae*. *Arch. Virol.* 2023; 168(9): 224. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05835-1>
2. de Araújo T.V.B., Rodrigues L.C., de Alencar Ximenes R.A., de Barros Miranda-Filho D., Montarroyos U.R., de Melo A.P.L., et al. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infect. Dis.* 2016; 16(12): 1356–63. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30318-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30318-8)
3. Musso D., Gubler D.J. Zika virus. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016; 29(3): 487–524. <https://doi.org/10.1128/CMR.00072-15>
4. Petersen L.R., Jamieson D.J., Powers A.M., Honein M.A. Zika virus. *N. Engl. J. Med.* 2016; 374(16): 1552–63. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1602113>
5. WHO. WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations – 2005 (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations. Retrieved from WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations; 2016.
6. Fagbami A.H. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *J. Hyg. (Lond)*. 1979; 83(2): 213–9. <https://doi.org/10.1017/s0022172400025997>
7. Omatola C.A., Onoja B.A., Olayemi A., Eze A.A. Low seroprevalence of Zika virus infection among pregnant women in North-Central Nigeria. *BMC Infect. Dis.* 2021; 21(1): 403. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06073-1>
8. Olusola B.A., Bello M.B., Olaleye D.O. Seroprevalence of Zika virus among febrile patients in Nigeria: Implications for clinical diagnosis and public health. *J. Infect. Pub. Health.* 2021; 14(5): 656–62. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2020.11.006>
9. Wickham H., Chang W., Henry L., Pedersen T.L., Takahashi K., Wilke C., et al. *GGPLOT2: create elegant data visualisations using the grammar of graphics (R package version 3.3.5)*; 2019. Available at: <https://cran.r-project.org/package=ggplot2>
10. Mac P.A., Kroeger A., Daehne T., Anyaie C., Velayudhan R., Panning M. Zika, flavivirus and malaria antibody cocirculation in Nigeria. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2023; 8(3): 171. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8030171>
11. Atai R.B., Aminu M., Ella E.E., Kia G.S.N., Obishakin E.T., Luka H.G., et al. Zika virus in Malaria-endemic populations: a climate change-driven syndemic in the Sudan savannah, Nigeria. *Microbiol. Res.* 2025; 16(6): 109. <https://doi.org/10.3390/microbiol-res16060109>
12. Adekola H.A., Ojo D.A., Balogun S.A., Dipeolu M.A., Mohammed M., Adejo D.S., et al. The prevalence of IgM antibodies to Zika virus in pregnant women in Northern Nigeria. *Vopr. Virusol.* 2023; 68(2): 117–23. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-162>
13. Bamidele O.S., Bakoji A., Yaga S.J., Ijaya K., Mohammed B., Yuguda I.Y., et al. Zika virus infections and associated risk factors among pregnant women in Gombe, Nigeria. *Virol. Sin.* 2025; 40(1): 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.virs.2024.12.008>
14. Oluwole T., Fowotade A., Mirchandani D., Almeida S., Plante K.S., Weaver S., et al. Seroprevalence of some arboviruses among preg-

- nant women in Ibadan, Southwestern, Nigeria. *Int. J. Infect. Dis.* 2022; 116: S1–130. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.12.307>
15. Kolawole O.M., Suleiman M.M., Bamidele E.P. Molecular epidemiology of Zika virus and Rubella virus in pregnant women attending Sobi Specialist Hospital Ilorin, Nigeria. *Int. J. Res. Med. Sci.* 2020; 8(6): 2275–83. <https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20202234>
 16. Shaibu J.O., Okwuraiwe A.P., Jakkari A., Dennis A., Akinyemi K.O., Li J., et al. Sero-molecular prevalence of Zika virus among pregnant women attending some public hospitals in Lagos State, Nigeria. *Eur. J. Med. Health Sci.* 2021; 3(5): 77–82. <https://doi.org/10.24018/ejmed.2021.3.5.1075>
 17. Anejo-Okopi J., Gotom D.Y., Chiehiura N.A., Okojoku J.O., Amanyi D.O., Egbere J.O., et al. The seroprevalence of Zika virus infection among HIV positive and HIV negative pregnant women in Jos, Nigeria. *Hosts Viruses* 2020; 7(6): 129–36. <https://doi.org/10.17582/journal.hv/2020/7.6.129.136>
 18. Otu A.A., Udoh U.A., Ita O.I., Hicks J.P., Ukpeh I., Walley J. Prevalence of Zika and malaria in patients with fever in secondary health-care facilities in south-eastern Nigeria. *Trop. Doct.* 2019; 50(1): 22–30. <https://doi.org/10.1177/0049475519872580>
 19. Mathé P., Egah D.Z., Müller J.A., Shehu N.Y., Obishakin E.T., Shwe D.D., et al. Low Zika virus seroprevalence among pregnant women in North Central Nigeria, 2016. *J. Clin. Virol.* 2018; 105: 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.05.011>
 20. Ogwuche J., Chang C.A., Ige O., Sagay A.S., Chaplin B., Kahan-sim M.L., et al. Arbovirus surveillance in pregnant women in north-central Nigeria, 2019–2022. *J. Clin. Virol.* 2023; 169: 105616. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2023.105616>
 21. Suleiman M.M., Kolawole O.M. Simultaneous detection and genomic characterization of Zika virus Protein M, E and NS1 using optimized primers from Asian and African Lineage. *Vacunas*. 2024; 25(1): 40–5. <https://doi.org/10.1016/j.vacune.2024.02.008>
 22. Adeleke M.A., Mafiana C.F., Idowu A.B., Adekunle M.F., Sam-Wobo S.O. Mosquito larval habitats and public health implications in Abeokuta, Ogun State, Nigeria. *Tanzan J. Health Res.* 2008; 10(2): 103–7. <https://doi.org/10.4314/thrb.v10i2.14348>
 23. Chimaeze C.O., Chukwuemeka N.A., Okechukwu N.E., Ayorinde D.F., Chukwubuofu N.U., Ogbonnaya O.C. Diversity and distribution of Aedes mosquitoes in Nigeria. *New York Sci. J.* 2018; 11(2): 50–7. <https://doi.org/10.7537/marsnys110218.07>
 24. Afolabi O.J., Simon-Oke I.A., Osomo B.O. Distribution, abundance and diversity of mosquitoes in Akure, Ondo State, Nigeria. *J. Virol. Vect. Biol.* 2013; 5(10): 132–6. <https://doi.org/10.5897/JVPB2013.0133>
 25. Ma J., Guo Y., Gao J., Tang H., Xu K., Liu Q., et al. Climate change drives the transmission and spread of vector-borne diseases: an ecological perspective. *Biology (Basel)*. 2022; 11(11): 1628. <https://doi.org/10.3390/biology11111628>
 26. Wilder-Smith A., Gubler D.J., Weaver S.C., Monath T.P., Heymann D.L., Scott T.W. Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. *Lancet. Infect. Dis.* 2017; 17(3): e101–6. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30518-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30518-7)
 27. Otu A., Ebeoso B., Etokidem A., Chukwuekezie O. Dengue fever – an update review and implications for Nigeria, and similar countries. *Afr. Health Sci.* 2019; 19(2): 2000–7. <https://doi.org/10.4314/ahs.v19i2.23>
 28. WHO. Yellow fever – Nigeria; 2021. Available at: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2021-DON336>
 29. Kolawole O.M., Seriki A.A., Irekeola A.A., Bello K.E., Adeyemi O.O. Dengue virus and malaria concurrent infection among febrile subjects within Ilorin metropolis, Nigeria. *J. Med. Virol.* 2017; 89(8): 1347–53. <https://doi.org/10.1002/jmv.24788>

Information about the authors

Victor Ibukun Agbajelola✉ – Department of Veterinary Parasitology, University of Ibadan, Oyo State, Nigeria; Department of Veterinary Pathobiology, University of Missouri, Columbia 65211, MO, USA. E-mail: agbajelolavictor@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7289-7764>

Franklyn Ayomide Oluwadare – Vaccine Production and Quality Control Program, Pan African University Life and Earth Sciences Institute, Including (Health and Agriculture) – PAULESI, University of Ibadan, Oyo State, Nigeria. E-mail: aoluwadare292@stu.ui.edu.ng; <https://orcid.org/0009-0009-0134-7130>

Mark Musa Hamman – Department of Veterinary Pathobiology, University of Missouri, Columbia 65211, MO, USA. E-mail: mhgkv@missouri.edu; <https://orcid.org/0000-0002-2237-6813>

Adeola Mariam Lateef – Department of Veterinary Pathobiology, University of Missouri, Columbia 65211, MO, USA. E-mail: amorff@missouri.edu; <https://orcid.org/0009-0000-9710-740X>

Contribution: Agbajelola V.I. Oluwadare F.A., Hamman M.M., Lateef A.M. – literature search and analysis, article writing, scientific editing.

Received 02 July 2025
Accepted 20 August 2025
Published 30 August 2025

Информация об авторах:

Victor Ibukun Agbajelola✉ – кафедра ветеринарной паразитологии, Университет Ибадана, штат Ойо, Нигерия; кафедра ветеринарной патобиологии, Университет Миссури, Колумбия 65211, Миссури, США. E-mail: agbajelolavictor@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-7289-7764>

Franklyn Ayomide Oluwadare – Программа производства и контроля качества вакцин, Институт наук о жизни и Земле Панафриканского университета, включая здравоохранение и сельское хозяйство – PAULESI, Университет Ибадана, штат Ойо, Нигерия. E-mail: aoluwadare292@stu.ui.edu.ng; <https://orcid.org/0009-0009-0134-7130>

Mark Musa Hamman – кафедра ветеринарной патобиологии, Университет Миссури, Колумбия, 65211, Миссури, США. E-mail: mhgkv@missouri.edu; <https://orcid.org/0000-0002-2237-6813>

Adeola Mariam Lateef – кафедра ветеринарной патобиологии, Университет Миссури, Колумбия, 65211, Миссури, США. E-mail: amorff@missouri.edu; <https://orcid.org/0009-0000-9710-740X>

Участие авторов: Agbajelola V.I. Oluwadare F.A., Hamman M.M., Lateef A.M. – поиск и анализ литературы, написание статьи, научное редактирование.

Поступила 02.07.2025
Принята в печать 20.08.2025
Опубликована 30.08.2025

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-296>

© КУЗНЕЦОВА А.И., АНТОНОВА А.А., МАКЕЕВА Е.А., КИМ К.В., МУНЧАК Я.М., МЕЖЕНСКАЯ Е.Н., ОРЛОВА-МОРОЗОВА Е.А., ПРОНИН А.Ю., ПРИЛИПОВ А.Г., ГАЛЗИТСКАЯ О.В., 2025

Вспомогательный белок Vpr вируса иммунодефицита человека 1-го типа (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1*): особенности генетических вариантов вируса, циркулировавших на территории Московской области в 2019–2020 гг.

Кузнецова А.И.^{1✉}, Антонова А.А.¹, Макеева Е.А.², Ким К.В.¹, Мунчак Я.М.¹,
Меженская Е.Н.¹, Орлова-Морозова Е.А.³, Пронин А.Ю.³, Прилипов А.Г.¹, Галзитская О.В.^{1,4}

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

²ФГАОУ ВО «Московский политехнический университет», 107023, г. Москва, Россия;

³ГБУЗ МО «Центр профилактики и борьбы со СПИД», 140053, г. Котельники, Московская область, Россия;

⁴ФБУН «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» Российской академии наук, 142290, г. Пущино, Московская область, Россия

Резюме

Введение. Vpr является многофункциональным вспомогательным белком ВИЧ-1, который проявляет свою активность на разных этапах жизненного цикла вируса. Олигомеризация белка является необходимым условием для проникновения Vpr в вирион и последующего его участия на ранних этапах ВИЧ-инфекции. К настоящему времени определены естественные аминокислотные замены в Vpr, ассоциированные с прогрессированием заболевания; рассматривается возможность создания средств терапии на основе Vpr.

Цель исследования – изучение особенностей Vpr у наиболее распространенных генетических вариантов ВИЧ-1, циркулировавших на территории Московской области в 2019–2020 гг.

Материалы и методы. Исследовали образцы ВИЧ-1, полученные от 231 пациента ГБУЗ МО «Центр профилактики и борьбы со СПИД» в период 2019–2020 гг. с разными стадиями заболевания, по схеме: экстракция провирусной ДНК, амплификация гена *vpr*, секвенирование, анализ полученных данных. Изучали консенсусные последовательности Vpr наиболее распространенных в России генетических вариантов и их пространственные структуры, вариабельность Vpr вариантов ВИЧ-1 суб-субтипа A6 (Vpr-A6) у пациентов с разными стадиями заболевания.

Результаты. Особенности Vpr различных генетических вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в России, могут влиять на формирование его олигомерных форм. Не было выявлено ни одного сайта со статистически значимыми различиями в частоте встречаемости аминокислотных замен у пациентов с разными стадиями заболевания.

Заключение. Белки Vpr генетических вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в России, могут иметь различия в функциональных свойствах. Варианты Vpr-A6 имели низкую вариабельность у пациентов с разными стадиями заболевания, в связи с чем Vpr-A6 может рассматриваться как объект для создания средств терапии.

Ключевые слова: ВИЧ-1; Vpr; суб-субтип A6; субтип B; CRF63_02A6

Для цитирования: Кузнецова А.И., Антонова А.А., Макеева Е.А., Ким К.В., Мунчак Я.М., Меженская Е.Н., Орлова-Морозова Е.А., Пронин А.Ю., Прилипов А.Г., Галзитская О.В. Вспомогательный белок Vpr вируса иммунодефицита человека 1-го типа (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1*): особенности генетических вариантов вируса, циркулировавших на территории Московской области в 2019–2020 гг. *Вопросы вирусологии*. 2025; 70(4): 324–339. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-296> EDN: <https://elibrary.ru/mfngcsm>

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 23-15-00027, <https://rscf.ru/project/23-15-00027/> (дата заключения соглашения 15.05.2023).

Благодарности. Авторы выражают благодарность канд. биол. наук, научному сотруднику лаборатории вирусов лейкозов Алексею Владимировичу Лебедеву за помощь в графической визуализации результатов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при добровольном информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России протокол № 16 от 08.02.2019.

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-296>

Vpr, accessory protein of human immunodeficiency virus type 1 (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1*): features of genetic variants of the virus circulating in the Moscow region in 2019–2020

Anna I. Kuznetsova^{1✉}, Anastasiia A. Antonova¹, Ekaterina A. Makeeva², Kristina V. Kim¹, Iana M. Munchak¹, Ekaterina N. Mezhenkaya¹, Elena A. Orlova-Morozova³, Alexander Yu. Pronin³, Alexey G. Prilipov¹, Oxana V. Galzitskaya^{1,4}

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

²Moscow Polytechnic University, 107023, Moscow, Russia;

³Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, 140053, Kotelniki, Moscow region, Russia ;

⁴Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, 142290, Pushchino, Moscow Region, Russia

Abstract

Introduction. Vpr is a multifunctional auxiliary HIV-1 protein. Oligomerisation is a prerequisite for the entry of Vpr into the virion and its subsequent participation in the early stages of HIV-infection. To date, natural amino acid substitutions in Vpr associated with disease progression were identified; the possibility of creating therapeutics based on Vpr is being considered.

The aim of the study is to investigate Vpr features in the most common genetic variants of HIV-1 circulating in the Moscow region in 2019–2020.

Materials and methods. HIV-1 samples obtained from 231 patients of the AIDS Prevention and Control Center in the period 2019–2020 were studied according to the scheme: proviral DNA extraction, amplification of the *vpr* gene, sequencing, and data analysis. Consensus Vpr sequences of the most common genetic variants in Russia and their spatial structures, variability of Vpr variants of HIV-1 sub-subtype A6 in patients with different stages of the disease were studied.

Results. Features of Vpr protein in different genetic variants of HIV-1 could influence the formation of their oligomeric forms. No sites with statistically significant differences in the frequency of amino acid substitutions were identified in patients with different stages of disease.

Conclusion. Vpr protein of HIV-1 genetic variants circulating in Russia may have differences in functional properties. Vpr-A6 variants had low variability in patients with different stages of the disease, and therefore Vpr-A6 can be considered as a target for the development of therapeutic agents.

Keywords: HIV-1; Vpr; sub-subtype A6; subtype B; CRF63_02A6

For citation: Kuznetsova A.I., Antonova A.A., Makeeva E.A., Kim K.V., Munchak I.A., Mezhenkaya E.N., Orlova-Morozova E.A., Pronin A.Yu., Prilipov A.G., Galzitskaya O.V. Vpr, accessory protein of human immunodeficiency virus type 1 (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1*): features of genetic variants of the virus circulating in the Moscow region in 2019–2020. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2025; 70(4): 324–339. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-296> EDN: <https://elibrary.ru/mfgcsm>

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.

Acknowledgement. The authors are grateful to Lebedev Aleksey Vladimirovich, PhD, Researcher in Laboratory of T-lymphotropic viruses, Ivanovsky Institute of virology, Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia for assistance in graphical visualization of the results.

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

Ethics approval. All obtained clinical material was used with the informed consent of patients based on the permission of the Committee on Biomedical Ethics of the D.I. Ivanovsky Institute of Virology of National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia (protocol no. 16 of 8 February 2019).

Введение

Вспомогательный белок Vpr вируса иммунодефицита человека 1-го типа (*Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1*; ВИЧ-1) является высококонсервативным вирусным белком, состоящим из 96 аминокислотных остатков

(а.о.), массой около 14 кДа [1]. В своей структуре белок Vpr содержит три α -спирали, которые образованы участками белковой цепи с 17-го по 33-й а.о., с 38-го по 50-й а.о. и с 55-го по 77-й а.о. (рис. 1). α -Спираль левозакручена и ориентирована друг относительно друга таким образом, чтобы обеспечить взаимодействия между следующими аминокислот-

ными остатками: L20, L23, L26, A30, V31 первой α -спирали, W38, L39, L42, I46 второй α -спирали и V57, L60, I61, L64, L68, F72 третьей α -спирали. Вышеуказанная ориентация дополнительно фиксируется взаимодействиями между T19, L20, W54 с одной стороны и между H33, F34, H71, F72 с другой. Структура белка Vpr характеризуется гибкими N- и C-концевыми областями: с 1-го по 13-й а.о. и с 78-го по 96-й а.о. соответственно [2].

Ген белка Vpr экспрессируется на поздних стадиях жизненного цикла ВИЧ-1 и связывается с вирусным белком-предшественником Pr55^{Gag}, который играет важную роль в сборке и продукции вирусных частиц. Олигомеризация Vpr имеет решающее значение для распознавания Pr55^{Gag}, затем Pr55^{Gag}-Vpr-комплексы накапливаются в плазматической мембране для последующего эффективного включения в вирионы [3–5]. Таким образом, при инфицировании вирусом клетки-хозяина белок Vpr проникает в нее в составе вириона, что позволяет ему активно участвовать уже в ранних стадиях репликации вируса. Белок Vpr обладает многочисленными функциями (**рис. 2**):

- повышает процессивность и точность обратной транскрипции [6, 7];
- входит в состав прединтеграционного комплекса (вирусная ДНК, интегразы, белок Vpr и т.д.), который обеспечивает доставку вирусной ДНК из цитоплазмы в ядро для последующей интеграции в геном клетки-хозяина [6, 7];
- усиливает транскрипцию провирусной ДНК [6–8];
- вызывает убиквитин/протеасомозависимую деградацию некоторых клеточных белков, останавливая клеточный цикл в фазе G2, что способствует созданию клеточной среды, оптимальной для экспрессии генов ВИЧ-1 [7, 8];
- индуцирует ответ на повреждение ДНК, что, как предполагают, может также приводить к остановке клеточного цикла и повышению продукции цитокинов воспаления [6, 7];
- нарушает работу митохондрий, что запускает ряд процессов, которые также могут приводить к апоптозу [9];

- в макрофагах Vpr противодействует специальному клеточному белку, LAMP5, который транспортирует вирусный белок Env в лизосому [6, 10].

Vpr высвобождается продуцирующими клетками и проникает в окружающие В-лимфоциты. В В-лимфоцитах белок Vpr влияет на диверсификацию антител и обладает способностью снижать переключение классов иммуноглобулинов [11]. Отдельное внимание уделяют роли Vpr в усилении вирусной инфекции в неделящихся миелоидных клетках, макрофагах и дендритных клетках, которые позволяют формировать и поддерживать вирусный резервуар, эффективно передавая ВИЧ-1 к CD4⁺-Т-клеткам во время презентации антигена [6, 12].

Белок Vpr рассматривают как один из факторов, способствующих развитию у пациентов нейрокогнитивных ВИЧ-ассоциированных расстройств (HIV-associated neurocognitive disorders, HAND): Vpr может проникать в клетки нервной ткани, является нейротоксином, который индуцирует апоптоз, активирует вирусную репликацию в латентно инфицированных клетках; в нейронах нарушает регуляцию уровней некоторых микроРНК и соответствующих им генов, что также может вызывать нейронную дисфункцию. Более того, ген *vpr* продолжает экспрессироваться даже при успешной антиретровирусной терапии (АРТ) [13–15].

На протяжении многих лет изучают вопрос корреляции аминокислотных замен в белке Vpr с изменением его функциональных свойств [16, 17]. Определены естественные аминокислотные замены в белке Vpr ВИЧ-1, ассоциированные со степенью развития HAND у лиц, живущих с ВИЧ (ЛЖВ), которые находятся на АРТ [18]. Сравнение генетического разнообразия белка Vpr вариантов ВИЧ-1 у пациентов с быстрым прогрессированием заболевания и у пациентов с долгосрочным отсутствием признаков прогрессирования заболевания в отсутствие АРТ показало, что аминокислотные замены в белке Vpr могут способствовать изменению кинетики репликации вируса и приводить к наблюдаемым различиям в прогрессировании заболевания [19]. При сравнении С-концевой области белка Vpr у вариантов ВИЧ-1

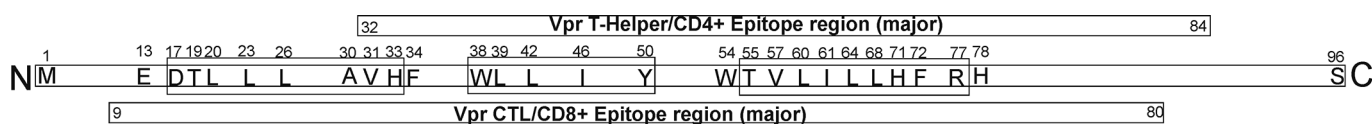


Рис. 1. Схематическое изображение первичной структуры белка Vpr.

М – метионин; Е – глутаминовая кислота; D – аспарагиновая кислота; Т – треонин; L – лейцин; А – аланин; V – валин; H – гистидин; F – фенилаланин; I – изолейцин; Y – тирозин; W – триптофан; R – аргинин; S – серин; Vpr T-Helper/CD4⁺ Epitope region (major) – область белка Vpr, в которой преимущественно были картированы эпитопы, распознающиеся иммунной системой для последующего развития CD4⁺-Т-клеточного ответа (<https://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/maps/helper/Vpr.html>); Vpr CTL/CD8⁺ Epitope region (major) – область белка Vpr, в которой преимущественно были картированы эпитопы, распознающиеся иммунной системой для последующего развития CD8⁺-цитотоксического Т-клеточного ответа (<https://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/maps/ctl/Vpr.html>).

Fig. 1. Schematic representation of Vpr primary structure.

M – methionine; E – glutamic acid; D – aspartic acid; T – threonine; L – leucine; A – alanine; V – valine; H – histidine; F – phenylalanine; I – isoleucine; Y – tyrosine; W – tryptophan; R – arginine; S – serine; Vpr T-Helper/CD4⁺ Epitope region (major) – Vpr region in which predominantly the epitopes have been mapped that are recognized by the immune system for subsequent development of CD4⁺ T cell response; Vpr CTL/CD8⁺ Epitope region (major) – Vpr region in which predominantly the epitopes have been mapped that are recognized by the immune system for subsequent development of CD8⁺ cytotoxic T cell response (<https://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/maps/ctl/Vpr.html>).

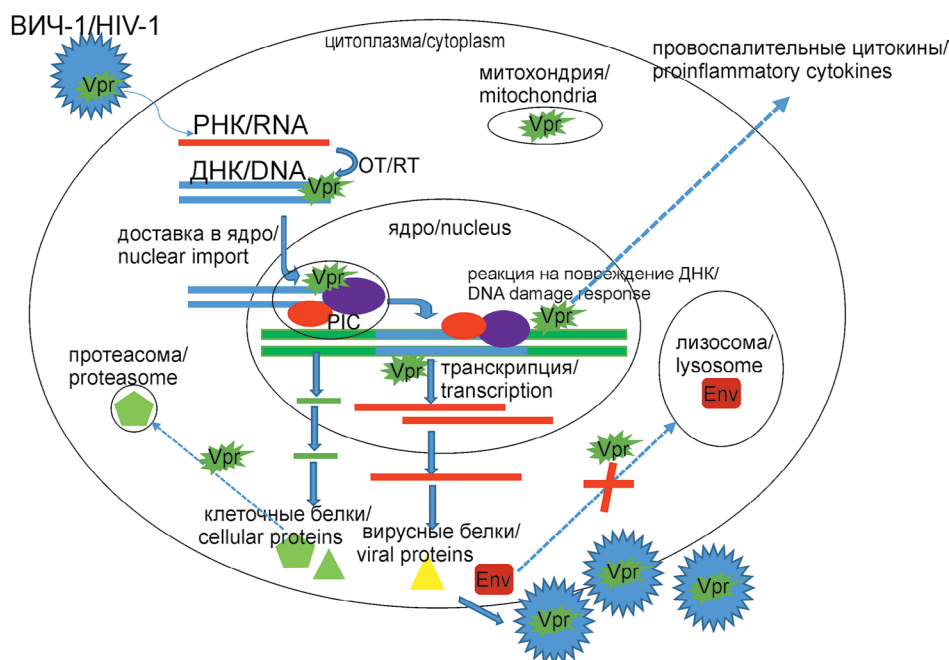


Рис. 2. Активности белка Vpr.

OT – обратная транскрипция; Vpr – белок Vpr; Env – белок Env; PIC – прединтеграционный комплекс.

Fig. 2. Activities of Vpr protein.

RT – reverse transcription; Vpr – Vpr protein; Env – Env protein; PIC – pre-integration complex.

субтипов В и С были определены субтип-специфичные аминокислотные замены, которые могут оказывать влияние на функциональные свойства белка [20].

Практически сразу после описания белка Vpr стали рассматривать возможности создания агентов, ингибирующих репликацию ВИЧ-1 посредством противодействия этому белку: известно большое количество попыток создания антиретровирусных средств как на основе природных, так и синтетических компонентов [17, 21]. Кроме того, белок Vpr содержит эпитопы, распознаваемые Т-клетками (<https://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/maps/helper/Vpr.html>, <https://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/maps/ctl/Vpr.html>), и рассматривается в качестве антиген-кандидата для создания анти-ВИЧ-вакцины [22].

Наиболее широко распространенным в России генетическим вариантом ВИЧ-1 на протяжении многих лет остается суб-субтип А6, тогда как в странах Европы, Азии и Америки циркулируют другие варианты вируса [23, 24]. Со временем сосуществование и взаимодействие ВИЧ-1 суб-субтипа А6 с менее распространенными на территории России генетическими вариантами вируса (субтипом В, циркулирующей рекомбинантной формой CRF02_AG и т.д.) привели к формированию и распространению других рекомбинантов. Недавно проведенные исследования демонстрируют постепенное увеличение с течением времени доли рекомбинантных форм в генетической структуре ВИЧ-1, циркулирующих на территории Российской Федерации, – в частности, за счет CRF63_02A6 [25]. Также в период 2022–2023 гг. на

территории России были выявлены две новые формы: CRF133_A6B и CRF157_A6C [26, 27]. Таким образом, несмотря на постепенное изменение состава циркулирующих вариантов ВИЧ-1 в России, молекулярно-эпидемиологический профиль ВИЧ-инфекции по-прежнему сохраняет свою уникальность.

Целью данной работы является изучение особенностей белка Vpr генетических вариантов ВИЧ-1, циркулировавших на территории Московской области в 2019–2020 гг.

Материалы и методы

При выполнении работы были проанализированы клинические образцы цельной крови «наивных» (ранее не получавших лечения) пациентов с ВИЧ-инфекцией ГКУЗ МО «Центр профилактики и борьбы со СПИД» (231 образец). В период 2019–2020 гг. у каждого пациента был проведен однократный забор крови в рамках реализации проекта CARE (<https://www.sareresearch.eu/>, доступ на 01.11.2024). Весь клинический материал был собран и использован в настоящем исследовании с информированного согласия пациентов и на основании одобрения Комитета по биомедицинской этике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол № 16 от 08.02.2019). Параллельно была зарегистрирована и в дальнейшем проанализирована следующая информация о пациентах: пол, возраст, фактор риска инфицирования, дата забора клинического образца, стадия заболевания, показатели вирусной нагрузки (ВН) и иммунный статус пациента (количество CD4⁺-клеток). В табл. 1 приведены основные характеристики пациентов, вклю-

Таблица 1. Основные характеристики включенных в исследование ЛЖВ, классифицированных по стадии ВИЧ-инфекции
Table 1. Main characteristics of people living with HIV (PLWH) included in the study, classified by stage of HIV infection

Характеристики Characteristics	2-я стадия/стадия начальных проявлений Stage 2/stage of initial symptoms	3-я стадия/ субклиническая стадия Stage 3/subclinical stage	4-я стадия/стадия вторичных проявлений Stage 4/stage of secondary symptoms
Всего пациентов, абс. Total number of patients, abs.	48	82	101
Демографические показатели Demographics			
Мужчины, абс. Males, abs.	30	45	71
Женщины, абс. Females, abs.	18	37	30
Возраст, медиана лет, диапазон Age, median age, range	38 [19; 62]	38 [21; 70]	39 [24; 64]
Путь инфицирования, абс. Infection route, abs.			
Гетеро Hetero	24	59	62
ПИН IDU	6	11	36
MCM MSM	17	9	3
Неизвестно Unknown	1	3	0
Лабораторные показатели Laboratory parameters			
CD4, кл/мкл clones/ μ L	599,50 (108–2022)	474,10 (110–1658)	229,72 (8–1062)
Вирусная нагрузка Ig PHK, копий/мл Viral load log10 RNA, copies/mL	5,0 (3,4–7,0)	4,6 (3,3–6,2)	5,1 (3,1–6,4)

Примечание. ПИН – потребители инъекционных наркотиков; MCM – мужчины, практикующие секс с мужчинами.

Note. IDU – Injecting drug users; MSM – Men having sex with other men.

ченных в исследование, в зависимости от стадии ВИЧ-инфекции, согласно клиническим рекомендациям Минздрава России¹.

Выделение провирусной ДНК в составе геномной ДНК осуществляли методом высаливания [28]. Получение продуктов области генома, кодирующей ген *vpr*, проводили методом гнездовой двухраундовой полимеразной цепной реакции (ПЦР): внешние праймеры – Vif1p (GCAGGTAAGAGAGCAAGCTGAACA) и Vif1o (GTCTCCGCTTCTTCCTGCCATAGGA), внутренние праймеры – Vif2p (GCTaCTCTGGAAAGGTGAAGG) и Vif2o (TACAAGGAGTCTTGGGCTGAC). Полученные ПЦР-продукты были очищены с использованием коммерческого набора для очистки ПЦР-фрагментов – Clean S-Cap («Евроген», Россия), а затем секвенированы дидезокси-методом по Сэнгеру с использованием коммерческого набора BigDye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) и праймеров Vif2p и Vif2o. Сборку и редактирование нуклеотидных последовательностей (н.п.) гена *vpr*

на основе полученных электрофореграмм выполняли с использованием приложения SeqMan II 6.1. (DNASTAR Inc., США).

Предварительное определение генетических вариантов полученных нуклеотидных последовательностей гена *vpr* ВИЧ-1 осуществляли с применением трех специализированных программ: COMET HIV-1 (<https://comet.liv.lu/>) [29], REGA HIV-1 Subtyping Tool (Version 3.46) (<https://www.genomedetective.com/app/typingtool/hiv>) и jpHMM [30]. Затем для уточнения результатов предварительного субтипирования проводили филогенетический анализ методом максимального правдоподобия с использованием программы IQ-TREE [31]. Эталонные последовательности для проведения анализа были выгружены из международной базы данных Лос-Аламосской лаборатории, США (<https://www.hiv.lanl>, дата обращения 31.10.2024). Парное и множественное выравнивание исследуемых и эталонных нуклеотидных последовательностей осуществляли с применением модуля ClustalW, интегрированного в программный пакет AliView [32]. Модель замещения нуклеотидов была выбрана при помощи программы jModelTest v. 2.1.7 на основании информационного критерия Акаике (Akaike information criterion, AIC) [33]. Достоверность выведенных фило-

¹Минздрав РФ. Клинические рекомендации. ВИЧ-инфекция у взрослых; 2024. Available at: https://cr.minzdrav.gov.ru/schema/79_2

гений оценивали с помощью бутстрэп-теста (bootstrap) и критерия приблизительного отношения правдоподобия Шимодайры–Хасегавы (SH-aLRT) с 1000 послестартовых итераций. Кластеры с поддержкой SH-aLRT > 0,9 считались достоверно установленными. Визуализацию и графическую обработку результатов филогенетического анализа осуществляли в программе iTOL (<https://itol.embl.de>) [34].

На следующем этапе исследования формировали и анализировали консенсусные последовательности белка Vpr для наиболее распространенных генетических вариантов ВИЧ-1 по результатам исследования. Для этого полученные нуклеотидные последовательности гена *vpr* были разделены на группы в зависимости от их генетического варианта. Затем нуклеотидные последовательности гена *vpr* ВИЧ-1 были переведены в аминокислотные с помощью онлайн-инструмента для трансляции, представленного на сайте (<https://www.bioinformatics.org/sms2/translate.html>). Также для каждого анализируемого генетического варианта ВИЧ-1 на основе полученных аминокислотных последовательностей с помощью инструмента Simple Consensus Maker (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/CONSENSUS/SimpCon.html>) были сформированы общие консенсусные аминокислотные последовательности и сравнены между собой и относительно Vpr_model (последовательность белка Vpr субтипа B, анализируемого при определении его пространственной структуры [2]) с применением программы MEGA v. 10.2.2. При формировании консенсусной последовательности инсерции не учитывались; частота встречаемости, при которой аминокислота (а также стоп-кодон или делеция) в каждой позиции учитывалась в консенсусе, должна была быть больше 50%. При помощи программы IsUnstruct предсказывали расположение неструктурированных участков в консенсусных последовательностях и в Vpr_model [35]. При помощи программы AlphaFold 2 (AlphaFold Protein Structure Database) предсказывали пространственную структуру консенсусных последовательностей и Vpr_model [36].

В программе Chimera предсказанные гексамерные

структуры анализируемых последовательностей накладывали друг на друга и на Vpr_model, чтобы определить максимально похожие друг с другом структуры (<https://www.rbvi.ucsf.edu/chimera/>).

На завершающем этапе исследования изучали вариативность белка Vpr-A6 (белок Vpr вариантов ВИЧ-1 суб-субтипа A6) у пациентов с разными стадиями заболевания. Для этого полученные аминокислотные последовательности Vpr-A6 были сгруппированы в соответствии со стадией ВИЧ-инфекции пациента, от которого был получен образец. Ранее полученную консенсусную последовательность Vpr-A6 использовали в качестве референсной, относительно нее определяли аминокислотные замены в каждой группе пациентов, с применением программы MEGA v. 10.2.2. (www.megasoftware.net). С применением программного модуля Nonparametric Statistics из пакета Statistica 8.0 (StatSoft Inc., США) выявляли сайты со статистически достоверными различиями в частоте встречаемости у пациентов с разными стадиями заболевания ($p < 0,0012$ при использовании критерия χ^2 с поправкой Бонферрони).

Результаты

При проведении попарного и множественного выравнивания и оценке качества 5 из 231 н.п. были исключены из дальнейшего анализа в связи с низким качеством или длиной нуклеотидных последовательностей (количество вырожденных букв или гар-ов (пробелов) более 1% от общей длины последовательности). В дальнейший анализ были включены 226 н.п., кодирующих ген *vpr* ВИЧ-1. Все полученные в ходе настоящего исследования нуклеотидные последовательности гена *vpr* ВИЧ-1 (226) были депонированы в международную базу данных генотипов GenBank со следующими номерами: PV059601–PV059826.

По результатам предварительного субтипирования было установлено, что два образца (0,88%, 2/226), полученные от пациентов со 2-й (1311101072) и с 3-й (1311001115) стадиями заболевания, относились к уникальным рекомбинантам (URFs) ВИЧ-1, образованным фрагментами ВИЧ-1 генетических вариантов B и G. Структуры геномов выявленных URFs_B/G представлены на **рис. 3**.

Данные последовательности были исключены из дальнейшего филогенетического анализа.

По результатам филогенетического анализа 4 (1,77%) н.п. образовали достоверный кластер (SH-aLRT > 0,9) с последовательностями ВИЧ-1 субтипа G, 16 (7,08%) н.п. образовали достоверный кластер (SH-aLRT > 0,9) с последовательностями ВИЧ-1 субтипа B и 11 (4,87%) н.п. были включены в кластер, образованный совместно нуклеотидными последовательностями ВИЧ-1 циркулирующих рекомбинантных форм CRF02_AG и CRF63_02A6 (**рис. 4**).

Поскольку в исследуемой области генома (*vpr*) ВИЧ-1 генетические варианты CRF02_AG и CRF63_02A6 обладают максимальным сходством, было принято решение идентифицировать их на основании совместных результатов филогенетического анализа и программы COMET HIV-1 – 10 последовательностей были отне-

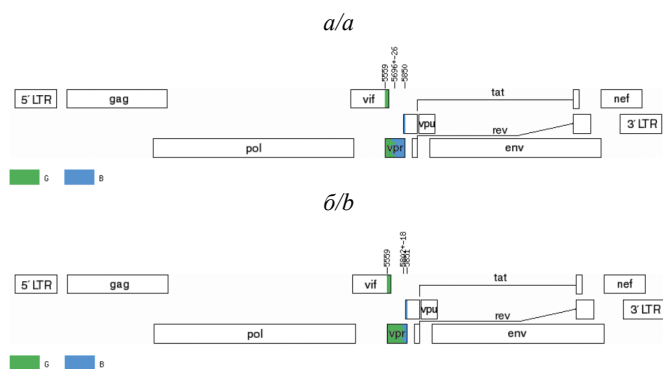


Рис. 3. Карта генома с исследуемой областью *vpr* у образцов 1311001072 (а) и 1311001115 (б).

Fig. 3. Genome map with the studied *vpr* region in samples 1311001072 (a) и 1311001115 (b).

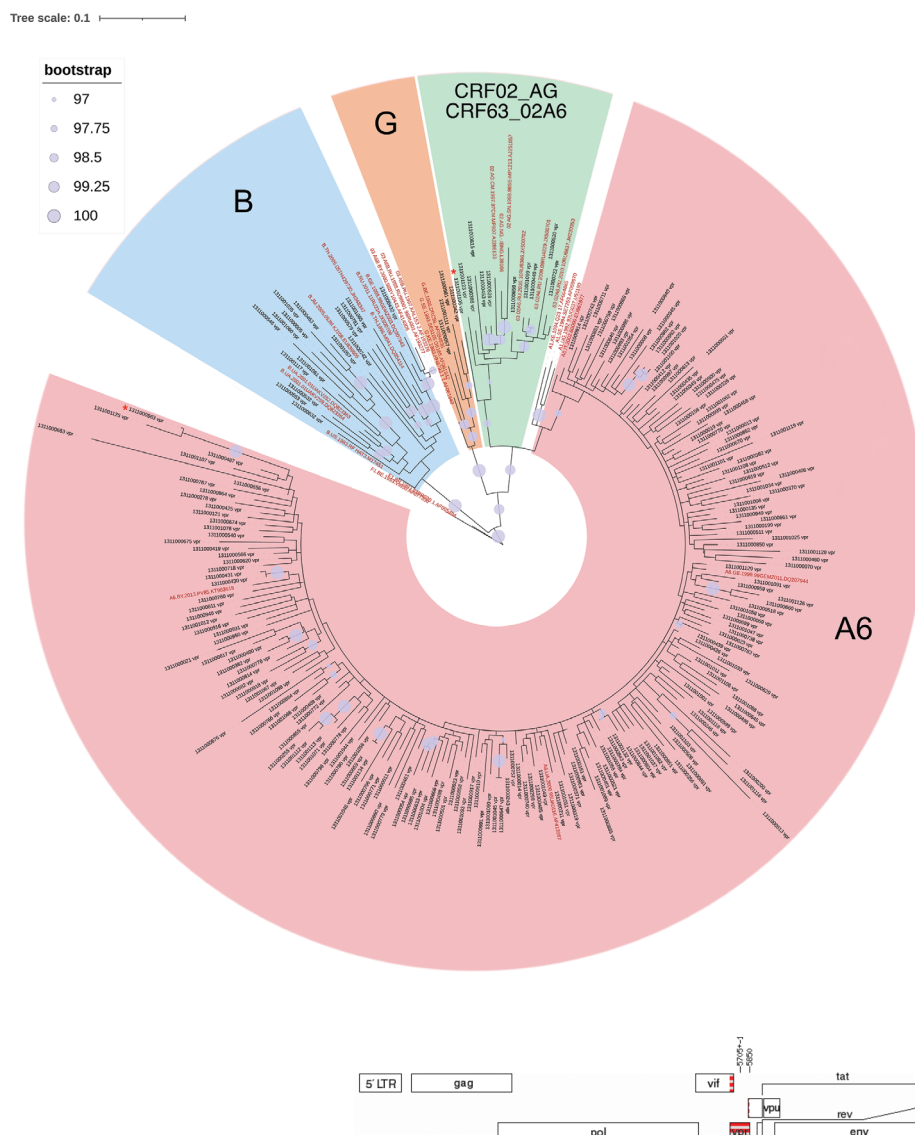


Рис. 4. Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей гена *vpr* ВИЧ-1 ($n = 254$, модель замещения нуклеотидов – TIM1 + I + G4). Референсные последовательности выделены красным цветом, исследуемые – черным. Красной звездочкой отмечены нуклеотидные последовательности, отнесенные к потенциальным уникальным рекомбинантам.

Fig. 4. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences of the HIV-1 *vpr* gene ($n = 254$, nucleotide substitution model – TIM1 + I + G4).

Nucleotide sequences classified as potential unique recombinants are marked with a red asterisk.



Рис. 5. Карта генома с исследуемой областью *vpr* у образца 1311001105.

Пунктиром отмечена область, образованная фрагментом ВИЧ-1 рекомбинантных форм CRF02_AG и CRF63_02A6.

Fig. 5. Genome map for the studied *vpr* region in sample 1311001105.

The dotted line indicates the region formed by the HIV-1 fragment of recombinant forms CRF02_AG and CRF63_02A6.

сены к CRF63_02A6. По результатам филогенетического анализа (из-за положения на филогенетическом дереве – опосредованно от остальных) совместно с результатами программы jрHMM (для определения рекомбинантных формы вируса) было принято решение о том, что последовательность 1311001105 (на рисунке отмечена красной звездочкой) может являться потенциальным уникальным рекомбинантом (URF_CRF02/CRF63), структура его генома представлена на **рис. 5**.

Последовательность 1311000563 на основе совместных результатов филогенетического анализа и анализа в программе COMET HIV-1 была отнесена к URF_A6/B. Остальные 192 (84,96%) н.п. образовали достоверный кластер с нуклеотидными последова-

тельностью ВИЧ-1 суб-субтипа A6.

Консенсусные последовательности белка Vpr были сформированы для вариантов ВИЧ-1 суб-субтипа A6, субтипа B и рекомбинантной формы CRF63_02A6, выявленных в ходе исследования. Консенсусная аминокислотная последовательность Vpr-A6 была сформирована на основе 192 исследуемых последовательностей, субтипа B – 16, а CRF63_02A6 – 10 соответственно. Данные генетические варианты также являются наиболее распространенными на территории Российской Федерации [24].

В исследуемых аминокислотных последовательностях Vpr-A6 были выявлены инсерции (аминокислотные вставки), делеции (пропуски аминокислот)

и стоп-кодона. Инсерции и делеции наблюдались в аминокислотных последовательностях, полученных от пациентов со всеми стадиями заболевания (табл. 2), тогда как стоп-кодона – у 6 пациентов с 3-й и 4-й стадиями заболевания.

Все сформированные консенсусные последовательности содержали 96 а.о. (рис. 6).

Первичная структура консенсусных последователь-

ностей суб-субтипа А6, субтипа В и CRF63_02А6 отличалась от Vpr_model в 17, 11 и 15-й позициях соответственно (рис. 6).

В дальнейшем для сравнения пространственных структур при проведении анализа консенсусной последовательности субтипа В анализировали вариант последовательности содержащей в 77-м положении Q, в 84-м – I, при проведении анализа

Таблица 2. Выявленные инсерции и делеции в исследуемых аминокислотных последовательностях Vpr-A6

Table 2. Identified insertions and deletions in the studied amino acid sequences Vpr-A6

Стадия заболевания Infection stage	Инсерции Insertions		Делеции Deletions	
	наименование последовательности sequence name	положение position	наименование последовательности sequence name	положение position
2-я стадия Stage 2	1311000412	ins84V85	1311000645	85
	1311000512	ins84I85	1311000738	85, 86
	1311000660	ins84I85	1311000948	85
3-я стадия Stage 3	1311000997	ins84I85	1311000121	85, 86
			1311000278	84
			1311000601	84
			1311000613	85, 86
			1311000617	85, 86
			1311000780	85, 86
			1311001119	85
4-я стадия Stage 4	1311001126	ins84I85	1311001125	85, 86
			1311000382	87, 88
			1311000599	85, 86
			1311000766	85
			1311000767	85
			1311000919	85
			1311001068	85, 89
			1311001088	85, 86
	1311000884	ins84P85	1311001089	85
			1311001093	85

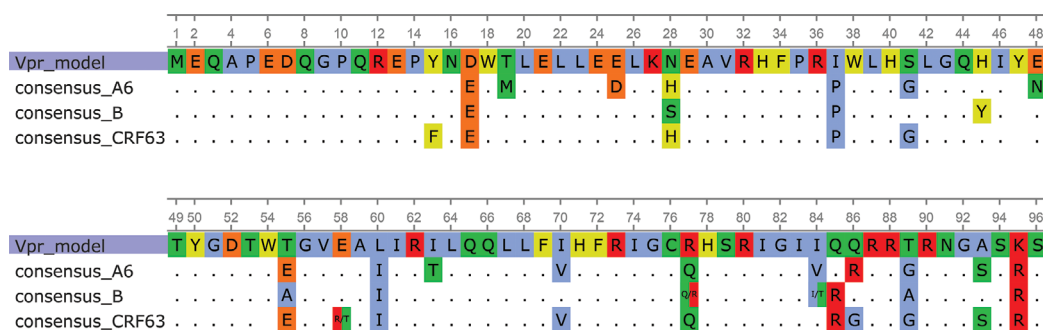


Рис. 6. Консенсусные последовательности Vpr ВИЧ-1 суб-субтипа А6, субтипа В и рекомбинантной формы CRF63_02А6, выравненные относительно Vpr_model (последовательность белка Vpr, анализируемого при определении пространственной структуры [2]).

Точками обозначены позиции аминокислотных остатков (а.о.), в которых а.о. в консенсусах соответствовали референсу. Аминокислоты классифицированы на основе полярности радикалов. Неполарные аминокислоты: G (глицин), A (аланин), V (валин), L (лейцин), I (изолейцин), P (пролин) отмечены синим цветом; полярные незаряженные аминокислоты: S (серин), T (треонин), C (цистеин), M (метионин), N (аспарагин), Q (глутамин) – зеленым; ароматические аминокислоты: F (фенилаланин), тирозин (Y), W (триптофан), гистидин (H) – желтым; отрицательно заряженные аминокислоты: аспарагиновая кислота (D) и глутаминовая кислота (E) – оранжевым; положительно заряженные аминокислоты: лизин (K), аргинин (R) – красным [37, 38].

Fig. 6. Consensus sequences of Vpr HIV-1 sub-subtype A6, B and CRF63_02A6 genetic variants aligned with the Vpr_model (sequence of the Vpr protein analyzed in determining the spatial structure [2]).

The dots indicate amino acid residues (aa) positions in which the aa in the consensus were the same as in the reference. Non-polar amino acids: G (glycine), A (alanine), V (valine), L (leucine), I (isoleucine), P (proline) – are marked in blue; Polar uncharged amino acids: S (serine), T (threonine), C (cysteine), M (methionine), N (asparagine), Q (glutamine) – green; aromatic amino acids: F (phenylalanine), Tyrosine (Y), W (tryptophan), Histidine (H) – yellow; Polar acidic, negatively charged, amino acids: aspartic acid (D) and glutamic acid (E) – orange; Polar basic, positively charged amino acids: lysine (K), arginine (R) – in red [37, 38].

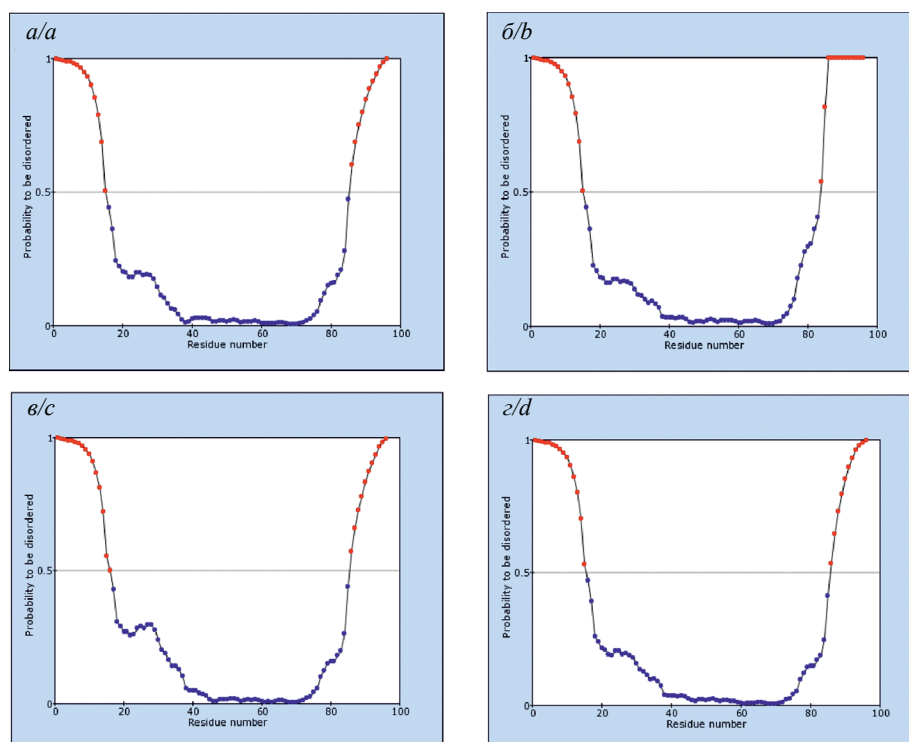


Рис. 7. Сравнение профилей неструктурированных участков для консенсусных последовательностей суб-субтипа А6, субтипа В и CRF63_02A6 и Vpr_model, предсказанные программой IsUnstruct.

a – Vpr_model: развернутые участки с 1–15 и с 86–96 а.о.; *б* – консенсус суб-субтипа А6: развернутые участки с 1–15 и с 84–96 а.о.; *в* – консенсус субтипа В: развернутые участки с 1–16 и с 86–96 а.о.; *г* – консенсус CRF63_02A6: развернутые участки с 1–15 и с 86–96 а.о.

Fig. 7. The comparison of the tertiary structure of the consensus sequences of sub-subtype A6, subtype B and CRF63_02A6 and Vpr_model, predicted by the IsUnstruct program.

a – Vpr_model: unfolded regions from 1 to 15 and from 86 to 96 aa; *b* – sub-subtype A6 consensus: unfolded regions from 1 to 15 and from 84 to 96 aa; *c* – subtype B consensus: unfolded regions from 1 to 16 and from 86 to 96 aa; *d* – CRF63_02A6 consensus: unfolded regions from 1 to 15 and from 86 to 96 aa.

консенсусной последовательности CRF63_02A6 – вариант последовательности, содержащей в 58-м положении R.

На **рис. 7** представлены предсказанные профили для неструктурированных участков для Vpr_model, консенсусных последовательностях суб-субтипа А6, субтипа В и CRF63_02A6.

На **рис. 8** представлены результаты предсказания пространственной структуры мономерных, димерных, тетрамерных и гексамерных структур, анализируемых последовательностей белка Vpr.

Результаты пространственного выравнивания (сопоставления) предсказанных гексамерных структур представлены на **рис. 9**.

При оценке вариабельности Vpr-A6 у пациентов с разными стадиями ВИЧ-инфекции было выявлено 14 замен, имеющих статистически значимые различия ($p < 0,05$) в частоте их встречаемости (**табл. 3**).

С учетом поправки Бонферрони ($p < 0,0012$) не было выявлено ни одного сайта со статистически значимыми различиями в частоте встречаемости у пациентов с разными стадиями заболевания.

Обсуждение

В настоящее время во всем мире продолжается рост генетического разнообразия ВИЧ-1, которое является

одним из препятствий для разработки эффективных средств профилактики и терапии ВИЧ-инфекции [39]. Более того, результаты исследований позволяют предположить, что разные генетические варианты ВИЧ-1 способны обуславливать различные клинические проявления и скорость прогрессирования заболевания, а также оказывать влияние на эффективность лечения [40]. Регулярно проводятся работы, посвященные изучению степени влияния отдельных вирусных белков на течение ВИЧ-инфекции [14, 41–43]. Также изучают аминокислотные замены в вирусных белках, которые могут оказывать влияние на прогрессирование ВИЧ-инфекции, отдельное внимание уделяется характерным субтип-специфичным аминокислотным заменам [18, 44, 45]. В ранее проведенных исследованиях генетического разнообразия белка Vpr наиболее широко распространенного в России суб-субтипа А6 отмечали его низкий уровень изменчивости и, в связи с этим, определяли белок Vpr как перспективную мишень для разработки средств терапии [46]. Также для белка Vpr суб-субтипа А6 вариантов вируса, циркулирующих в разных регионах России, предварительно не было отмечено наличия характерных особенностей [47]. Настоящее исследование направлено на изучение особенностей белка Vpr наиболее широко распространенных в России генетических вариантов

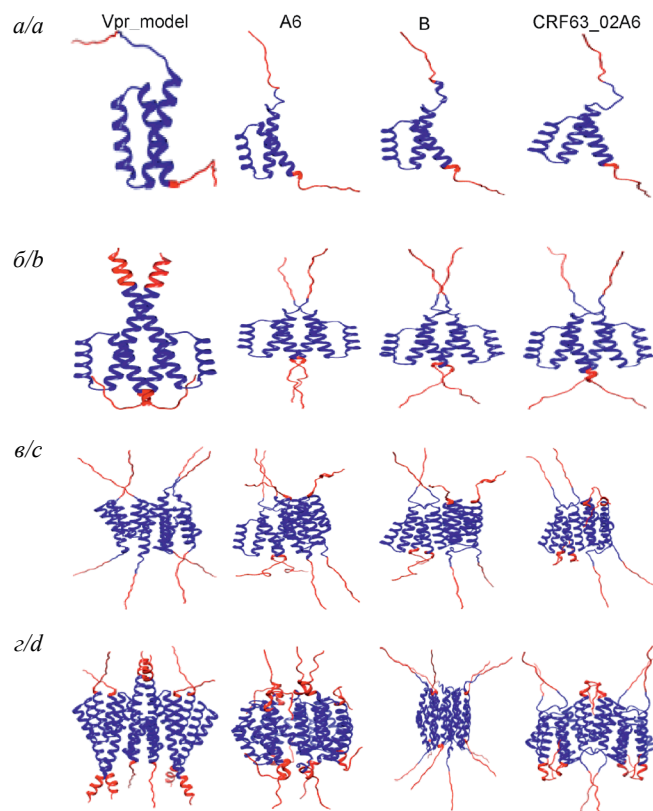


Рис. 8. Мономерные, димерные и олигомерные формы белка Vpr вариантов Vpr_model, суб-субтипа A6, субтипа B, рекомбинантной формы CRF63_02A6, предсказанные программой AlphaFold 2.

a – мономерные формы белка Vpr; *b* – димерные формы белка Vpr; *c* – тетрамерная форма белка Vpr; *d* – гексамерная форма белка Vpr.

Fig. 8. Monomeric, dimeric and oligomeric forms of Vpr protein in Vpr_model, sub-subtype A6, subtype B and CRF63_02A6 variants predicted by the AlphaFold 2 program.

a – monomeric forms of Vpr protein; *b* – dimeric forms of Vpr protein; *c* – tetrameric forms of Vpr protein; *d* – hexameric forms of Vpr protein.

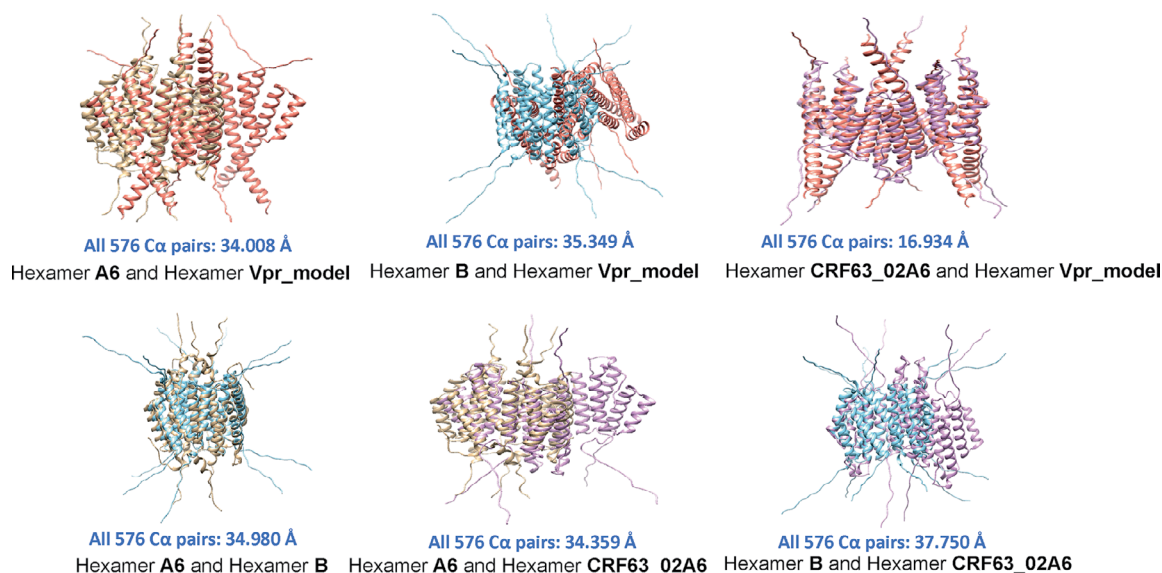


Рис. 9. Совмещение гексамерных структур Vpr.

Hexamer A6 and Hexamer Vpr_model – гексамер консенсусной последовательности белка суб-субтипа A6 и гексамер Vpr_model; Hexamer B and Hexamer Vpr_model – гексамер консенсусной последовательности белка субтипа B и гексамер Vpr_model; Hexamer CRF63_02A6 and Hexamer Vpr_model – гексамер консенсусной последовательности рекомбинантной формы CRF63_02A6 и гексамер Vpr_model; Hexamer A6 and Hexamer B – гексамер консенсусной последовательности суб-субтипа A6 и гексамер консенсусной последовательности субтипа B; Hexamer A6 and Hexamer CRF63_02A6 – гексамер консенсусной последовательности суб-субтипа A6 и гексамер консенсусной последовательности CRF63_02A6; Hexamer B and Hexamer CRF63_02A6 – гексамер консенсусной последовательности субтипа B и гексамер консенсусной последовательности CRF63_02A6; Среднеквадратичное отклонение между Ca-атомами для разных пар гексамеров показано на рисунке, которое изменяется от 16,9 Å до 37,8 Å.

Fig. 9. Alignment of Vpr hexameric structures.

Hexamer A6 and Hexamer Vpr_model – hexamer of A6 consensus sequence and hexamer Vpr_model; Hexamer B and Hexamer Vpr_model – hexamer of subtype B consensus sequence and hexamer Vpr_model; Hexamer CRF63_02A6 and Hexamer Vpr_model – hexamer of CRF63_02A6 consensus sequence and hexamer Vpr_model; Hexamer A6 and Hexamer B – hexamer of A6 consensus sequence and hexamer of subtype B consensus sequence; Hexamer A6 and Hexamer CRF63_02A6 – hexamer of A6 consensus sequence and hexamer of CRF63_02A6 consensus sequence; Hexamer B and Hexamer CRF63_02A6 – hexamer of subtype B consensus sequence and hexamer of CRF63_02A6 consensus sequence; The root mean square deviation between Ca atoms for different pairs of hexamers is shown in the figure, which varies from 16.9 Å to 37.8 Å.

Таблица 3. Аминокислотные замены Vpr-A6 со статистически значимыми различиями по частоте встречаемости в группах ЛЖВ с разными стадиями заболевания**Table 3.** Vpr-A6 amino acid substitutions with statistically significant differences in frequency of occurrence in groups of PLWH with different stages of the disease

Позиция Position	Мутация Mutation	Стадия 2 Stage 2	Стадия 3 Stage 3	Стадия 4 Stage 4	p_{2-3}	p_{2-4}	p_{3-4}
13	E13A	2	0	0	0,0465	0,0190	–
15	Y15H	6	8	23	–	–	0,0444
15	Y15F	1	5	1	–	–	0,0353
19	M19V	3	0	2	0,0143	–	–
20	L20I	0	3	0	–	–	0,0390
45	H45Q	6	6	3	–	0,0054	–
55	E55V	2	0	0	0,0465	0,0190	–
61	I61T	6	2	8	0,0107	–	–
72	F72Y	2	0	0	0,0465	0,0190	–
77	Q77H	5	4	4	–	0,0451	–
85	Q85H	1	0	7	–	–	0,0219
87	R87S	5	3	3	–	0,0194	–
93	S93T	0	3	0	–	–	0,0390
94	S94N	1	3	0	–	–	0,0390

Примечание. Значения p -value представлены для позиций с $p < 0,05$; позиции с $p \geq 0,05$ отмечены знаком «–». Достоверно значимыми считали различия с p -value с поправкой Бонферрони ($p < 0,0012$).

Note. The p -values are presented for items with $p < 0.05$; items with $p \geq 0.05$ are marked with ‘–’. Differences with p -value with Bonferroni correction ($p < 0.0012$) were considered as statistically significant.

ВИЧ-1 на примере вариантов вирусов, циркулировавших в Московской области в 2019–2020 гг., и сравнение генетической вариабельности белка Vpr-A6 у пациентов с разными стадиями заболевания.

По результатам исследования было установлено, что большинство (84,96%) нуклеотидных последовательностей *vpr* относились к ВИЧ-1 суб-субтипа A6, вторым по распространенности стал субтип B (7,08%), затем – рекомбинантная форма CRF63_02A6 (4,87%), что согласуется с результатами исследования генетического разнообразия ВИЧ-1 на территории Российской Федерации [24]. Две последовательности были идентифицированы как уникальные B/G-рекомбинантные формы, что также согласуется с ранее представленными данными о выявлении в России уникальных B/G-рекомбинантных форм [48]. Одна последовательность гена *vpr* была определена как уникальная A6/B-рекомбинантная форма, что подкрепляется данными о формировании различных рекомбинантных форм между ВИЧ-1 суб-субтипа A6 и субтипа B на территории России [49].

Шесть из 192 (3,13%) последовательностей Vpr-A6, полученные от пациентов с разными стадиями ВИЧ-инфекции, содержали инсерцию между 84-м и 85-м положениями аминокислотных остатков. Двадцать из 192 (10,42%) последовательностей Vpr-A6, полученные от пациентов с разными стадиями заболевания, содержали делеции в 84–89-м положениях, при этом 50% данных последовательностей содержали сразу две делеции. Наиболее часто делеции встречались в 85-м (85%, 17/20) и в 86-м (40%, 8/20) положениях (табл. 2). Ранее уже отмечалось наличие делеций в 85, 86 и 89-й позициях в белке Vpr вариантов суб-субтипа A6 [46]. Преждевременные стоп-кодоны были выявлены у 6 пациентов с 3-й и 4-й стадиями за-

болевания. Известны исследования закономерностей и частоты встречаемости стоп-кодонов в участках провирусной ДНК, кодирующих протеазу, обратную транскриптазу и интегразу [50, 51]. Однако аналогичных работ по изучению распространенности стоп-кодонов в провирусной ДНК, кодирующей белок Vpr, пока не проводилось. В целом в настоящее время существует предположение, что дефектные провирусы могут обладать биологической активностью: образующиеся на их основе транскрипты и соответствующие им белки могут участвовать в стимуляции иммунного ответа, последующей хронической активации иммунной системы и быть серьезным препятствием для разработки средств эрадикации ВИЧ [52].

Консенсусные последовательности анализируемых вариантов ВИЧ-1 в нескольких позициях, предположительно участвующих в формировании пространственной структуры белка, содержали замены относительно референсной последовательности – Vpr_model: замену D17E – суб-субтип A6, субтип B, CRF63_02A6; T19M – суб-субтип A6, T55E – суб-субтип A6, CRF63_02A6; T55A – субтип B; L60I – суб-субтип A6, субтип B, CRF63_02A6 и R77Q – суб-субтип A6, субтип B, CRF63_02A6. При этом замены T55E, T55A и R77Q приводили к изменению химических свойств аминокислотного остатка в заданном положении.

Предсказание пространственных структур консенсусных последовательностей и референсной последовательности Vpr_model определило, что в анализируемых последовательностях структурированные участки белка преимущественно приходились на область с 16-го по 85-й а.о., что совпадало с областью, в которой картировались эпитопы в белке Vpr (рис. 1, 7).

Предсказание олигомерных структур белка Vpr консенсусных последовательностей и Vpr_model проде-

монстрировало различия среди тетрамерных и гексамерных форм. При пространственном выравнивании гексамерных форм было определено, что наибольшее среднеквадратичное отклонение между α -атомами (RMSD) составило 37,8 Å для пары гексамера консенсусной последовательности субтипа В и гексамера консенсусной последовательности CRF63_02A6, а наименьшее – 16,9 Å для пары гексамера консенсусной последовательности рекомбинантной формы CRF63_02A6 и гексамера Vpr_model (рис. 9). RMSD является количественной мерой сходства между двумя белковыми структурами, и наименьшее значение RMSD между олигомерными формами указывает на их структурное сходство.

Таким образом, имеющиеся особенности белка Vpr у различных вариантов ВИЧ-1 могут повлиять на формирование олигомерных форм белка. Учитывая высокую значимость процесса олигомеризации, который влияет на включение белка Vpr в вирионы и, как следствие, определяет возможность участия белка Vpr в ранних стадиях репликации вируса, можно утверждать, что существующие особенности могут повлиять на функциональные свойства белка Vpr [4].

В ранее выполненном исследовании динамики вариативности гена *vpr* у пациентов, инфицированных ВИЧ-1 субтипа С, отмечалось постепенное увеличение генетического разнообразия *vpr* в популяции вируса у пациента в течение первого года развития заболевания [53]. Однако сравнение белка Vpr у вариантов вируса, выделенных от пациентов с разными стадиями заболевания в Китае, не выявило существенных различий аминокислот в функционально значимых областях [54]. В данном исследовании также не было обнаружено аминокислотных замен в белке Vpr-A6, имеющих статистически значимые различия в частоте встречаемости у пациентов с разными стадиями заболевания, что подтверждает ранее сделанные выводы о низкой вариативности белка Vpr-A6 и перспективности его использования для создания средств терапии ВИЧ-инфекции [46, 47].

Ограничениями проведенного исследования является относительно небольшая выборка, в том числе не-A6-вариантов, а также изучение вариантов вируса, циркулирующих в пределах одного региона – Московской области.

Заключение

Впервые проведено сравнение особенностей белков Vpr генетических вариантов ВИЧ-1, наиболее широко распространенных на территории Российской Федерации (A6, В, CRF63). Было установлено, что присутствующие особенности могут повлиять на формирование олигомерных форм белка. Принимая во внимание важность процесса олигомеризации белка Vpr, можно предположить, что имеющиеся различия могут приводить к разной функциональной активности белка Vpr у вариантов ВИЧ-1. Вместе с тем сравнение генетического разнообразия Vpr-A6 у пациентов с разными стадиями ВИЧ-инфекции не выявило достоверно значимых аминокислотных замен,

что подтверждает данные о низкой вариативности белка Vpr внутри вариантов ВИЧ-1 суб-субтипа A6 и о возможности его использования для разработки средств терапии ВИЧ-инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

- Kogan M., Rappaport J. HIV-1 accessory protein Vpr: Relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology*. 2011; 8: 25. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-8-25>
- Morellet N., Bouaziz S., Petitjean P., Roques B.P. NMR structure of the HIV-1 regulatory protein VPR. *J. Mol. Biol.* 2003; 327(1): 215–27. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00060-3](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00060-3)
- Sawaya B.E., Khalili K., Gordon J., Taube R., Amini S. Cooperative interaction between HIV-1 regulatory proteins Tat and Vpr modulates transcription of the viral genome. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(45): 35209–14. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005197200>
- Fritz J.V., Dujardin D., Godet J., Didier P., De Mey J., Darlix J.L., et al. HIV-1 Vpr oligomerization but not that of Gag directs the interaction between VPR and GAG. *J. Virol.* 2010; 84(3): 1585–96. <https://doi.org/10.1128/JVI.01691-09>
- Venkatachari N.J., Walker L.A., Tasthan O., Le T., Dempsey T.M., Li Y., et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr: oligomerization is an essential feature for its incorporation into virus particles. *Virol. J.* 2010; 7: 119. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-119>
- Nodder S.B., Gummuluru S. Illuminating the role of VPR in HIV infection of myeloid cells. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1606. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01606>
- Vanegas-Torres C.A., Schindler M. HIV-1 Vpr functions in primary CD4+ T Cells. *Viruses*. 2024; 16(3): 420. <https://doi.org/10.3390/v16030420>
- Zhang F., Bieniasz P.D. HIV-1 VPR induces cell cycle arrest and enhances viral gene expression by depleting CCDC137. *Elife*. 2020; 9: e55806. <https://doi.org/10.7554/eLife.55806>
- Huang C.Y., Chiang S.F., Lin T.Y., Chiou S.H., Chow K.C. HIV-1 VPR triggers mitochondrial destruction by impairing Mfn2-mediated ER-mitochondria interaction. *PLoS One*. 2012; 7(3): e33657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033657>
- Zhao L., Wang S., Xu M., He Y., Zhang X., Xiong Y., et al. VPR counteracts the restriction of LAPTM5 to promote HIV-1 infection in macrophages. *Nat. Commun.* 2021; 12(1): 3691. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24087-8>
- Eldin P., Péron S., Galashevskaya A., Denis-Lagache N., Cogné M., Slupphaug G., et al. Impact of HIV-1 Vpr manipulation of the DNA repair enzyme UNG2 on B lymphocyte class switch recombination. *J. Transl. Med.* 2020; 18(1): 310. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02478-7>
- Casey Klockow L., Sharifi H.J., Wen X., Flagg M., Furuya A.K., Nekorchuk M., et al. The HIV-1 protein Vpr targets the endoribonuclease Dicer for proteasomal degradation to boost macrophage infection. *Virology*. 2013; 444(1-2): 191–202. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.06.010>
- Li G., Makar T., Gerzanich V., Kalakonda S., Ivanova S., Pereira E.F.R., et al. HIV-1 VPR-induced proinflammatory response and apoptosis are mediated through the Sur1-Trpm4 channel in astrocytes. *mBio*. 2020; 11(6): e02939–20. <https://doi.org/10.1128/mbio.02939-20>
- Mukerjee R., Chang J.R., Del Valle L., Bagashev A., Gayed M.M., Lyde R.B., et al. Deregulation of microRNAs by HIV-1 VPR protein leads to the development of neurocognitive disorders. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(40): 34976–85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.241547>
- James T., Nonnemacher M.R., Wigdahl B., Krebs F.C. Defining the roles for VPR in HIV-1-associated neuropathogenesis. *J. Neurovirol.* 2016; 22(4): 403–15. <https://doi.org/10.1007/s13365-016-0436-5>
- Fabryova H., Strebel K. VPR and its cellular interaction partners: R we there yet? *Cells*. 2019; 8(11): 1310. <https://doi.org/10.3390/cells8111310>
- González M.E. The HIV-1 VPR protein: A multifaceted target for therapeutic intervention. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(1): 126. <https://doi.org/10.3390/ijms18010126>
- Dampier W., Antell G.C., Aiamkitsumrit B., Nonnemacher M.R., Jacobson J.M., Pirrone V., et al. Specific amino acids in HIV-1 Vpr are significantly associated with differences in patient neuro-

- cognitive status. *J. Neurovirol.* 2017; 23(1): 113–24. <https://doi.org/10.1007/s13365-016-0462-3>
19. Hadi K., Walker L.A., Guha D., Murali R., Watkins S.C., Tarwater P., et al. Human immunodeficiency virus type 1 VPR polymorphisms associated with progressor and non-progressor individuals alter VPR-associated functions. *J. Gen. Virol.* 2014; 95(3): 700–11. <https://doi.org/10.1099/vir.0.059576-0>
 20. Colle J.H., Rose T., Rouzioux Ch., Garcia A. Two highly variable Vpr84 and Vpr85 residues within the HIV-1-Vpr C-terminal protein transduction domain control transduction activity and define a clade specific polymorphism. *World Journal of AIDS.* 2014; (4): 148–55. <https://doi.org/10.4236/wja.2014.4201>
 21. Hagiwara K., Ishii H., Murakami T., Takeshima S.N., Chutiwittonchai N., Kodama E.N., et al. Synthesis of a VPR-binding derivative for use as a novel HIV-1 inhibitor. *PLoS One.* 2015; 10(12): e0145573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145573>
 22. Milani A., Baesi K., Agi E., Marouf G., Ahmadi M., Bolhassani A. HIV-1 accessory proteins: which one is potentially effective in diagnosis and vaccine development? *Protein Pept. Lett.* 2021; 28(6): 687–98. <https://doi.org/10.2174/0929866528999201231213610>
 23. Bbosa N., Kaleebu P., Ssemwanga D. HIV subtype diversity worldwide. *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2019; 14(3): 153–60. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000534>
 24. 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/tpwttn>
 25. 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>
 26. Maksimenko L.V., Sivay M.V., Totmenin A.V., Shvalov A.N., Skudarnov S.E., Ostapova T.S., et al. Novel HIV-1 A6/B recombinant forms (CRF133_A6B and URF_A6/B) circulating in Krasnoyarsk region, Russia. *J. Infect.* 2022; 85(6): 702–69. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.10.001>
 27. Halikov M.R., Ekushov V.E., Totmenin A.V., Gashnikova N.M., Antonets M.E., Tregubchak T.V., et al. Identification of a novel HIV-1 circulating recombinant form CRF157_A6C in Primorsky Territory, Russia. *J. Infect.* 2024; 88(2): 180–2. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2023.11.005>
 28. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16(3): 1215. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1>
 29. Struck D., Lawyer G., Ternes A.M., Schmit J.C., Bercoff D.P. COMET: adaptive context-based modeling for ultrafast HIV-1 subtype identification. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(18): e144. <https://doi.org/10.1093/nar/gku739>
 30. Schultz A.K., Bulla I., Abdou-Chekarau M., Gordien E., Morgenstern B., Zoaulim F., et al. jpHMM: recombination analysis in viruses with circular genomes such as the hepatitis B virus. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(Web Server issue): W193–8. <https://doi.org/10.1093/nar/gks414>
 31. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 2015; 32(1): 268–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
 32. Larsson A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics.* 2014; 30(22): 3276–8. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
 33. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods.* 2012; 9(8): 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
 34. Letunic I., Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49(W1): W293–6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
 35. Lobanov M.Y., Sokolovskiy I.V., Galzitskaya O.V. IsUnstruct: prediction of the residue status to be ordered or disordered in the protein chain by a method based on the Ising model. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2013; 31(10): 1034–43. <https://doi.org/10.1080/07391102.2012.718529>
 36. Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 2021; 596(7873): 583–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
 37. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. *Биологическая химия.* М.: Медицина; 1998.
 38. Lobanov M.Y., Pereyaslavets L.B., Likhachev I.V., Matkariyev B.T., Galzitskaya O.V. Is there an advantageous arrangement of aromatic residues in proteins? Statistical analysis of aromatic interactions in globular proteins. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2021; 19: 5960–8. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.10.036>
 39. Nair M., Gettins L., Fuller M., Kirtley S., Hemelaar J. Global and regional genetic diversity of HIV-1 in 2010–21: systematic review and analysis of prevalence. *Lancet Microbe.* 2024; 5(11): 100912. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(24\)00151-4](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(24)00151-4)
 40. Bouman J.A., Venner C.M., Walker C., Arts E.J., Regoes R.R. Per-pathogen virulence of HIV-1 subtypes A, C and D. *Proc. Biol. Sci.* 2023; 290(1998): 20222572. <https://doi.org/10.1098/rspb.2022.2572>
 41. Sami Saribas A., Cicalese S., Ahooyi T.M., Khalili K., Amini S., Sariyer I.K. HIV-1 Nef is released in extracellular vesicles derived from astrocytes: evidence for Nef-mediated neurotoxicity. *Cell Death Dis.* 2017; 8(1): e2542. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.467>
 42. Cafaro A., Schietroma I., Sernicola L., Belli R., Campagna M., Mancini F., et al. Role of HIV-1 tat protein interactions with host receptors in HIV infection and pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2024; 25(3): 1704. <https://doi.org/10.3390/ijms25031704>
 43. Khan N., Geiger J.D. Role of Viral Protein U (VPU) in HIV-1 infection and pathogenesis. *Viruses.* 2021; 13(8): 1466. <https://doi.org/10.3390/v13081466>
 44. Ruiz A.P., Ajasin D.O., Ramasamy S., DesMarais V., Eugenin E.A., Prasad V.R. A naturally occurring polymorphism in the HIV-1 tat basic domain inhibits uptake by bystander cells and leads to reduced neuroinflammation. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 3308. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39531-5>
 45. 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>
 46. Лапавок И.А. *Анализ полиморфизма неструктурных областей генома варианта ВИЧ-1, доминирующего в России:* Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. М.; 2009. <https://elibrary.ru/nkranl>
 47. Антонова А.А., Лебедев А.В., Ожмегова Е.Н., Шлык А.В., Лаповок И.А., Кузнецова А.И. Вариативность неструктурных белков у вариантов ВИЧ-1 суб-субтипа А6 (Retroviridae: Orthoretrovirinae: Lentivirus: Human immunodeficiency virus-1, sub-subtype A6), циркулирующих в разных регионах Российской Федерации. *Вопросы вирусологии.* 2024; 69(5): 470–80. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-262> <https://elibrary.ru/vbbkqu>
 48. Murzakova A., Kireev D., Baryshev P., Lopatukhin A., Serova E., Shemshura A., et al. Molecular epidemiology of HIV-1 subtype G in the Russian Federation. *Viruses.* 2019; 11(4): 348. <https://doi.org/10.3390/v11040348>
 49. 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://elibrary.ru/bkswno>
 50. Makinson A., Masquelier B., Taieb A., Peytavin G., Waldner-Combarnoux A., Collin G., et al. Presence of numerous stop codons in HIV-1 reverse transcriptase proviral DNA sequences from patients with virological response to HAART. *AIDS.* 2006; 20(9): 1327–9. <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000232242.51286.7b>
 51. Alidjinou E.K., Deldalle J., Robineau O., Hallaert C., Meybeck A., Huileux T., et al. Routine drug resistance testing in proviral HIV-1 DNA: Prevalence of stop codons and hypermutation, and associated factors. *J. Med. Virol.* 2019; 91(9): 1684–7. <https://doi.org/10.1002/jmv.25474>
 52. Бобкова М.Р. Дефектные провирусы ВИЧ: возможное участие в патогенезе ВИЧ-инфекции. *Вопросы вирусологии.* 2024; 69(5): 399–414. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-261> <https://elibrary.ru/pselci>
 53. Rossen Khan R., Novitsky V., Sebunya T.K., Musonda R., Gashe B.A., Essex M. Viral diversity and diversification of major non-structural genes vif, vpr, vpu, tat exon 1 and rev exon 1 during primary HIV-1 subtype C infection. *PLoS One.* 2012; 7(5): e35491. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035491>
 54. Shen C., Gupta P., Wu H., Chen X., Huang X., Zhou Y., et al. Molecular characterization of the HIV type 1 vpr gene in infected Chinese former blood/plasma donors at different stages of diseases.

AIDS Res. Hum. Retroviruses. 2008; 24(4): 661–6. <https://doi.org/10.1089/aid.2007.0270>

REFERENCES

- Kogan M., Rappaport J. HIV-1 accessory protein Vpr: Relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology*. 2011; 8: 25. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-8-25>
- Morellet N., Bouaziz S., Petitjean P., Roques B.P. NMR structure of the HIV-1 regulatory protein VPR. *J. Mol. Biol.* 2003; 327(1): 215–27. [https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00060-3](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00060-3)
- Sawaya B.E., Khalili K., Gordon J., Taube R., Amini S. Cooperative interaction between HIV-1 regulatory proteins Tat and Vpr modulates transcription of the viral genome. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(45): 35209–14. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005197200>
- Fritz J.V., Dujardin D., Godet J., Didier P., De Mey J., Darlix J.L., et al. HIV-1 Vpr oligomerization but not that of Gag directs the interaction between VPR and GAG. *J. Virol.* 2010; 84(3): 1585–96. <https://doi.org/10.1128/JVI.01691-09>
- Venkatachari N.J., Walker L.A., Tastan O., Le T., Dempsey T.M., Li Y., et al. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr: oligomerization is an essential feature for its incorporation into virus particles. *Virol. J.* 2010; 7: 119. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-119>
- Nodder S.B., Gummuluru S. Illuminating the role of VPR in HIV infection of myeloid cells. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1606. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01606>
- Vanegas-Torres C.A., Schindler M. HIV-1 Vpr functions in primary CD4+ T Cells. *Viruses*. 2024; 16(3): 420. <https://doi.org/10.3390/v16030420>
- Zhang F., Bieniasz P.D. HIV-1 VPR induces cell cycle arrest and enhances viral gene expression by depleting CCDC137. *Elife*. 2020; 9: e55806. <https://doi.org/10.7554/eLife.55806>
- Huang C.Y., Chiang S.F., Lin T.Y., Chiou S.H., Chow K.C. HIV-1 VPR triggers mitochondrial destruction by impairing Mfn2-mediated ER-mitochondria interaction. *PLoS One*. 2012; 7(3): e33657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033657>
- Zhao L., Wang S., Xu M., He Y., Zhang X., Xiong Y., et al. VPR counteracts the restriction of LAPTM5 to promote HIV-1 infection in macrophages. *Nat. Commun.* 2021; 12(1): 3691. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24087-8>
- Eldin P., Péron S., Galashevskaya A., Denis-Lagache N., Cogné M., Slupphaug G., et al. Impact of HIV-1 Vpr manipulation of the DNA repair enzyme UNG2 on B lymphocyte class switch recombination. *J. Transl. Med.* 2020; 18(1): 310. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02478-7>
- Casey Klockow L., Sharifi H.J., Wen X., Flagg M., Furuya A.K., Nekorchuk M., et al. The HIV-1 protein Vpr targets the endoribonuclease Dicer for proteasomal degradation to boost macrophage infection. *Virology*. 2013; 444(1-2): 191–202. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.06.010>
- Li G., Makar T., Gerzanich V., Kalakonda S., Ivanova S., Pereira E.F.R., et al. HIV-1 VPR-induced proinflammatory response and apoptosis are mediated through the Surl1-Trpm4 channel in astrocytes. *mBio*. 2020; 11(6): e02939–20. <https://doi.org/10.1128/mbio.02939-20>
- Mukerjee R., Chang J.R., Del Valle L., Bagashev A., Gayed M.M., Lyde R.B., et al. Dereglulation of microRNAs by HIV-1 VPR protein leads to the development of neurocognitive disorders. *J. Biol. Chem.* 2011; 286(40): 34976–85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.241547>
- James T., Nonnemacher M.R., Wigdahl B., Krebs F.C. Defining the roles for VPR in HIV-1-associated neuropathogenesis. *J. Neurovirol.* 2016; 22(4): 403–15. <https://doi.org/10.1007/s13365-016-0436-5>
- Fabryova H., Strebel K. VPR and its cellular interaction partners: R we there yet? *Cells*. 2019; 8(11): 1310. <https://doi.org/10.3390/cells8111310>
- González M.E. The HIV-1 VPR protein: A multifaceted target for therapeutic intervention. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(1): 126. <https://doi.org/10.3390/ijms18010126>
- Dampier W., Antell G.C., Aiamkitsumrit B., Nonnemacher M.R., Jacobson J.M., Pirrone V., et al. Specific amino acids in HIV-1 Vpr are significantly associated with differences in patient neurocognitive status. *J. Neurovirol.* 2017; 23(1): 113–24. <https://doi.org/10.1007/s13365-016-0462-3>
- Hadi K., Walker L.A., Guha D., Murali R., Watkins S.C., Tarwater P., et al. Human immunodeficiency virus type 1 VPR polymorphisms associated with progressor and non-progressor individuals alter VPR-associated functions. *J. Gen. Virol.* 2014; 95(3): 700–11. <https://doi.org/10.1099/vir.0.059576-0>
- Colle J.H., Rose T., Rouzioux Ch., Garcia A. Two highly variable Vpr84 and Vpr85 residues within the HIV-1-Vpr C-terminal protein transduction domain control transductional activity and define a clade specific polymorphism. *World Journal of AIDS*. 2014; (4): 148–55. <https://doi.org/10.4236/wja.2014.4201>
- Hagiwara K., Ishii H., Murakami T., Takeshima S.N., Chutiwittoonchai N., Kodama E.N., et al. Synthesis of a VPR-binding derivative for use as a novel HIV-1 inhibitor. *PLoS One*. 2015; 10(12): e0145573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145573>
- Milani A., Baesi K., Agi E., Marouf G., Ahmadi M., Bolhassani A. HIV-1 accessory proteins: which one is potentially effective in diagnosis and vaccine development? *Protein Pept. Lett.* 2021; 28(6): 687–98. <https://doi.org/10.2174/0929866528999201231213610>
- Bbosa N., Kaleebu P., Ssemwanga D. HIV subtype diversity worldwide. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2019; 14(3): 153–60. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000534>
- 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/tpwtn> (in Russian)
- 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>
- Maksimov L.V., Sivay M.V., Totmenin A.V., Shvalov A.N., Skudarnov S.E., Ostapova T.S., et al. Novel HIV-1 A6/B recombinant forms (CRF133_A6B and URF_A6/B) circulating in Krasnoyarsk region, Russia. *J. Infect.* 2022; 85(6): 702–69. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.10.001>
- Halikov M.R., Ekushov V.E., Totmenin A.V., Gashnikova N.M., Antonets M.E., Tregubchak T.V., et al. Identification of a novel HIV-1 circulating recombinant form CRF157_A6C in Primorsky Territory, Russia. *J. Infect.* 2024; 88(2): 180–2. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2023.11.005>
- Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16(3): 1215. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1>
- Struck D., Lawyer G., Ternes A.M., Schmit J.C., Bercoff D.P. COMET: adaptive context-based modeling for ultrafast HIV-1 subtype identification. *Nucleic Acids Res.* 2014; 42(18): e144. <https://doi.org/10.1093/nar/gku739>
- Schultz A.K., Bulla I., Abdou-Chekaraou M., Gordien E., Morgenstern B., Zoulim F., et al. jPHMM: recombination analysis in viruses with circular genomes such as the hepatitis B virus. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(Web Server issue): W193–8. <https://doi.org/10.1093/nar/gks414>
- Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 2015; 32(1): 268–74. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>
- Larsson A. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*. 2014; 30(22): 3276–8. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
- Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*. 2012; 9(8): 772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Letunic I., Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* 2021; 49(W1): W293–6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Lobanov M.Y., Sokolovskiy I.V., Galzitskaya O.V. IsUnstruct: prediction of the residue status to be ordered or disordered in the protein chain by a method based on the Ising model. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2013; 31(10): 1034–43. <https://doi.org/10.1080/07391102.2012.718529>
- Jumper J., Evans R., Pritzel A., Green T., Figurnov M., Ronneberger O., et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021; 596(7873): 583–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Berezov T.T., Korovkin B.F. *Biological Chemistry [Biologicheskaya khimiya]*. Moscow: Meditsina; 1998. (in Russian)
- Lobanov M.Y., Pereyaslavets L.B., Likhachev I.V., Matkarimov B.T.,

- Galzit'skaya O.V. Is there an advantageous arrangement of aromatic residues in proteins? Statistical analysis of aromatic interactions in globular proteins. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2021; 19: 5960–8. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.10.036>
39. Nair M., Gettins L., Fuller M., Kirtley S., Hemelaar J. Global and regional genetic diversity of HIV-1 in 2010–21: systematic review and analysis of prevalence. *Lancet Microbe.* 2024; 5(11): 100912. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(24\)00151-4](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(24)00151-4)
 40. Bouman J.A., Venner C.M., Walker C., Arts E.J., Regoes R.R. Per-pathogen virulence of HIV-1 subtypes A, C and D. *Proc. Biol. Sci.* 2023; 290(1998): 20222572. <https://doi.org/10.1098/rspb.2022.2572>
 41. Sami Saribas A., Cicalese S., Ahooyi T.M., Khalili K., Amini S., Sariyer I.K. HIV-1 Nef is released in extracellular vesicles derived from astrocytes: evidence for Nef-mediated neurotoxicity. *Cell Death Dis.* 2017; 8(1): e2542. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.467>
 42. Cafaro A., Schietroma I., Sernicola L., Belli R., Campagna M., Mancini F., et al. Role of HIV-1 tat protein interactions with host receptors in HIV infection and pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2024; 25(3): 1704. <https://doi.org/10.3390/ijms25031704>
 43. Khan N., Geiger J.D. Role of Viral Protein U (VPU) in HIV-1 infection and pathogenesis. *Viruses.* 2021; 13(8): 1466. <https://doi.org/10.3390/v13081466>
 44. Ruiz A.P., Ajasin D.O., Ramasamy S., DesMarais V., Eugenin E.A., Prasad V.R. A naturally occurring polymorphism in the HIV-1 tat basic domain inhibits uptake by bystander cells and leads to reduced neuroinflammation. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 3308. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39531-5>
 45. 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>
 46. Lapavok 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)
 47. Antonova A.A., Lebedev A.V., Ozhmegova E.N., Shlykova A.V., Lapavok I.A., Kuznetsova A.I. 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. *Voprosy virusologii.* 2024; 69(5): 470–80. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-262> <https://elibrary.ru/wbbkuq> (in Russian)
 48. Murzakova A., Kireev D., Baryshev P., Lopatukhin A., Serova E., Shemshura A., et al. Molecular epidemiology of HIV-1 subtype G in the Russian Federation. *Viruses.* 2019; 11(4): 348. <https://doi.org/10.3390/v11040348>
 49. 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://elibrary.ru/bkswno> (in Russian)
 50. Makinson A., Masquelier B., Taieb A., Peytavin G., Waldner-Combrenoux A., Collin G., et al. Presence of numerous stop codons in HIV-1 reverse transcriptase proviral DNA sequences from patients with virological response to HAART. *AIDS.* 2006; 20(9): 1327–9. <https://doi.org/10.1097/01.aids.0000232242.51286.7b>
 51. Alidjinou E.K., Deldalle J., Robineau O., Hallaert C., Meybeck A., Huileux T., et al. Routine drug resistance testing in proviral HIV-1 DNA: Prevalence of stop codons and hypermutation, and associated factors. *J. Med. Virol.* 2019; 91(9): 1684–7. <https://doi.org/10.1002/jmv.25474>
 52. Bobkova M.R. Defective HIV proviruses: possible involvement in the HIV infection pathogenesis. *Voprosy virusologii.* 2024; 69(5): 399–414. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-261> <https://elibrary.ru/pselci> (in Russian)
 53. Rossenkhon R., Novitsky V., Sebunya T.K., Musonda R., Gashe B.A., Essex M. Viral diversity and diversification of major non-structural genes vif, vpr, vpu, tat exon 1 and rev exon 1 during primary HIV-1 subtype C infection. *PLoS One.* 2012; 7(5): e35491. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035491>
 54. Shen C., Gupta P., Wu H., Chen X., Huang X., Zhou Y., et al. Molecular characterization of the HIV type 1 vpr gene in infected Chinese former blood/plasma donors at different stages of diseases. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 2008; 24(4): 661–6. <https://doi.org/10.1089/aid.2007.0270>

Информация об авторах:

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>

Антонова Анастасия Александровна — канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории вирусов лейкозов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: aantonova1792@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-9180-9846>

Макеева Екатерина Александровна — студентка факультета химической технологии и биотехнологии ФГАОУ ВО «Московский политехнический университет», Москва, Россия. E-mail: makeevakaty13@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0005-7085-3361>

Ким Кристина Вячеславовна — младший научный сотрудник лаборатории вирусов лейкозов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: kimsya99@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-4150-2280>

Мунчак Яна Михайловна — младший научный сотрудник лаборатории вирусов лейкозов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: yana_munchak@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4792-8928>

Меженская 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>

Орлова-Морозова Елена Александровна — канд. мед. наук, заведующая амбулаторно-поликлиническим отделением ГБУЗ МО «Центр профилактики и борьбы со СПИД», Котельники, Московская область, Россия. E-mail: orlovamorozova@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-2495-6501>

Пронин Александр Юрьевич — канд. мед. наук, главный врач ГБУЗ МО «Центр профилактики и борьбы со СПИД», Котельники, Московская область, Россия. E-mail: alexanderp909@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-9268-4929>

Прилипов Алексей Геннадьевич — д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной генетики института вирусологии им. Д.И. Иванковского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: a_prilipov@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8755-1419>

Галзитская Оксана Валериановна — д-р физ.-мат. наук, заведующая лабораторией биоинформатики, главный научный сотрудник ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Москва, Россия. E-mail: ogalzit@vega.protres.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3962-1520>

Участие авторов: Кузнецова А.И. — концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста, одобрение окончательного варианта статьи для публикации; Антонова А.А. — анализ и интерпретация данных, подготовка текста, одобрение окончательного варианта статьи для публикации; Макеева Е.А. — анализ и интерпретация данных; Ким К.В. — проведение экспериментов; Мунчак Я.М. — проведение экспериментов; Меженская Е.Н. — анализ и интерпретация данных; Орлова-Морозова Е.А. — сбор данных; Пронин А.Ю. — сбор данных; Прилипов А.Г. — проведение экспериментов; Галзитская О.В. — анализ и интерпретация данных, подготовка текста, одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

Поступила 13.02.2025
Принята в печать 10.04.2025
Опубликована 30.08.2025

Information about the authors:

Anna I. Kuznetsova ✉ – PhD, Head of laboratory of T-lymphotropic viruses, PhD, leading researcher, Ivanovsky Institute of virology, Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. E-mail: a-myznikova@list.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5299-3081>

Anastasiia A. Antonova – PhD, Researcher, Laboratory of T-lymphotropic viruses, Ivanovsky Institute of virology, Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. E-mail: aantonova1792@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-9180-9846>

Ekaterina A. Makeeva – student, Moscow Polytechnic University, Faculty of Chemical Engineering and Biotechnology, Moscow, Russia. E-mail: makeevakaty13@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0005-7085-3361>

Kristina V. Kim – junior researcher, Laboratory of T-lymphotropic viruses, Ivanovsky Institute of virology, Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. E-mail: kimsya99@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-4150-2280>

Iana M. Munchak – junior researcher, Laboratory of T-lymphotropic viruses, Ivanovsky Institute of virology, Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. E-mail: yana_munchak@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4792-8928>

Ekaterina N. Mezhenkaya – PhD, 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>

Elena A. Orlova-Morozova – PhD, Head of outpatient department, Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Moscow region, Kotelniki, Russia. E-mail: orlovamorozova@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-2495-6501>

Alexander Yu. Pronin – PhD, Chief Physician, Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious Diseases, Moscow region, Kotelniki, Russia. E-mail: alexanderp909@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-9268-4929>

Alexey G. Prilipov – Doctor of Biological Sciences, leading researcher, head of the laboratory of molecular genetics, Ivanovsky Institute of virology, Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. E-mail: a_prilipov@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8755-1419>

Oxana V. Galzitskaya – Doctor of Physical and Mathematical Sciences, Head of the Bioinformatics Laboratory, Chief Researcher, Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia. E-mail: ogalzit@vega.protres.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3962-1520>

Contribution: 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; Antonova A.A. – analysis and interpretation of the data, preparing of the text, final approval of the article for publication; Makeeva E.A. – analysis and interpretation of the data; Kim K.V. – conducting experiments; Munchak I.A. – conducting experiments; Mezhenkaya E.N. – analysis and interpretation of the data; Orlova-Morozova E.A. – data collection; Pronin A.Yu. – data collection; Prilipov A.G. – conducting experiments; Galzitskaya O.V. – analysis and interpretation of the data, preparing of the text, final approval of the article for publication.

Received 13 February 2025

Accepted 10 April 2025

Published 30 August 2025

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-324>

© СВЯТЧЕНКО В.А., ПРОТОПОПОВА Е.В., ЛЕГОСТАЕВ С.С., МИКРЮКОВА Т.П., АГАФОНОВ А.П., ЛОКТЕВ В.Б., 2025



Моделирование смешанной инфекции вирусами Зика и Западного Нила (*Flaviviridae: Orthoflavivirus: Orthoflavivirus zikaense, Orthoflavivirus nilense*) *in vitro* и *in vivo*

Святченко В.А., Протопопова Е.В., Легостаев С.С., Микрюкова Т.П.,
Агафонов А.П., Локтев В.Б.✉

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Резюме

Введение. Заболевания человека, вызываемые вирусами Западного Нила (ВЗН) и Зика и передающиеся через укус комара, широко распространены на разных континентах и обуславливают крупные вспышки. Ареалы этих вирусов перекрываются, что создает возможность возникновения микст-инфекций. Знания о подобных микст-инфекциях ограничены.

Цель исследования. Провести изучение особенностей протекания микст-инфекции ВЗН и вируса Зика *in vitro* и *in vivo* с целью оценки их возможной интерференции и/или усиления инфекции.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы Влг27924 и MR766 ВЗН и вируса Зика соответственно. Инфекционную активность вирусов при моно- и коинфицировании определяли на культуре клеток Vero E6 с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, а также на мышах линии BALB/c.

Результаты. При исследовании коинфицирования ВЗН и вирусом Зика *in vitro* показано, что совместное инфицирование приводит к интерференции, при этом степень конкурентного ингибирования репликации более выражена в отношении вируса Зика (в 1000 раз и более) при сравнении с моноинфекцией. При одновременном инфицировании мышей вирус Зика не влияет на развитие летальной инфекции, вызванной ВЗН. Однако предварительное (за 4 и 20 сут) инфицирование сублетальной дозой вируса Зика достоверно защищает животных от последующего введения 10 и 100 ЛД₅₀ ВЗН. У предварительно инфицированных вирусом Зика коинфицированных животных зарегистрировано появление специфичных к ВЗН вируснейтрализующих антител в более высоком титре, чем у моноинфицированных ВЗН особей.

Заключение. Показано наличие интерференции *in vitro* между исследованными ортофлавивирусами, наиболее выраженной в отношении вируса Зика. При одновременном инфицировании мышей вирус Зика не влияет на течение и исход инфекционного процесса, вызванного ВЗН. Предварительное инфицирование мышей вирусом Зика обеспечивает защиту животных от летальной инфекции ВЗН, праймируя индукцию более высокого уровня вируснейтрализующих антител.

Ключевые слова: вирус Зика; вирус Западного Нила; коинфекция; интерференция

Для цитирования: Святченко В.А., Протопопова Е.В., Легостаев С.С., Микрюкова Т.П., Агафонов А.П., Локтев В.Б. Моделирование смешанной инфекции вирусами Зика и Западного Нила (*Flaviviridae: Orthoflavivirus: Orthoflavivirus zikaense, Orthoflavivirus nilense*) *in vitro* и *in vivo*. *Вопросы вирусологии*. 2025; 70(4): 340–348. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-324> EDN: <https://elibrary.ru/gkebwv>

Финансирование. Исследование было выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2025-526.

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, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен Биоэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Протокол № 2 от 03.04.2023).

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-324>

Modeling of mixed infection with Zika and West Nile viruses (*Flaviviridae: Orthoflavivirus: Orthoflavivirus zikaense, Orthoflavivirus nilense*) *in vitro* and *in vivo*

Victor A. Svyatchenko, Elena V. Protopopova, Stanislav S. Legostaev, Tamara P. Mikryukova, Alexander P. Agafonov, Valery B. Loktev✉

State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

Abstract

Introduction. Mosquito-borne human diseases caused by Zika virus and West Nile virus (WNV) are widespread across multiple continents and cause major outbreaks. Their ranges overlap and the possibility of mixed infections is obvious. The information of such mixed infections is limited.

The aim of the study is to investigate the features of mixed infection of WNV and Zika virus *in vitro* and *in vivo* in order to assess their possible interference and/or enhancement of viral infection.

Materials and methods. The study used West Nile virus and Zika virus strains Vlg27924 and MR766, respectively. The infectious activity of viruses during mono- and co-infection was determined on Vero E6 cell culture using RT-PCR, as well as on BALB/c mice using various administration schemes.

Results. *In vitro* studies of co-infection with WNV and Zika virus showed that co-infection leads to interference, with the degree of competitive inhibition of replication being more pronounced for Zika virus, reaching 1000 times or more when compared to mono-infection. During simultaneous infection in mice, Zika virus does not affect the development of lethal infection caused by WNV. However, preliminary (4 and 20 days) infection with a sublethal dose of Zika virus reliably protects animals from subsequent administration of 10 and 100 LD₅₀ WNV, respectively. In pre-infected and co-infected animals with Zika virus, the development of WNV-specific viral neutralizing antibodies was recorded in higher titers than in WNV monoinfected animals.

Conclusion. The presence of *in vitro* interference between the studied orthoflaviviruses was shown, most pronounced in relation to the Zika virus. No significant effect was observed with simultaneous co-infection *in vivo*. However, pre-infection of mice with Zika virus provides protection to animals from lethal WNV infection due to the induction of high levels of antibodies that specifically neutralize its infectious activity.

Keywords: Zika virus; West Nile virus; co-infection; viral interference

For citation: Svyatchenko V.A., Protopopova E.V., Legostaev S.S., Mikryukova T.P., Agafonov A.P., Loktev V.B. Modeling of mixed infection with Zika and West Nile viruses (*Flaviviridae: Orthoflavivirus: Orthoflavivirus zikaense, Orthoflavivirus nilense*) *in vitro* and *in vivo*. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2025; 70(4): 340–348. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-324> EDN: <https://elibrary.ru/gkebwv>

Funding. The study was carried out with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, agreement No. 075-15-2025-526

Conflict of interest. The authors declare no apparent and 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 study protocol was approved by the Bioethics Committee of the State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rosпотребнадзор (Protocol No. 02 of April 03, 2023)

Введение

Многие РНК-содержащие ортофлавиовирусы, относящиеся к семейству *Flaviviridae* (*Riboviria; Orthornavirae; Kitrinoviricota; Flasuviricetes; Amarillovirale; Flaviviridae; Orthoflavivirus*), вызывают тяжелые заболевания человека [1]. В настоящее время ортофлавиовирусы распространены практически повсеместно, формируют природные очаги инфекций, захватывающие подчас целые регионы и континенты, и вызывают глобальные вспышки заболеваний человека [2, 3]. Принято выделять так называемые большие флавиовирусные инфекции, которые вызывают вирусы денге, японского энцефалита, Западного Нила (ВЗН), желтой лихорадки и Зика и с которыми ассоциируется десят-

ки миллионов случаев инфицирования человека [4]. Начало глобальной вспышки лихорадки Западного Нила, ассоциированной с генотипом 1a ВЗН, связывают со вспышками заболевания в 1999 г. в США и России [5]. В течение последующих нескольких лет эта инфекция распространилась практически на всех континентах [6–8]. Быстрое распространение инфекции было связано с различными видами диких птиц и комарами рода *Culex* (Linnaeus, 1758). В РФ постоянно циркулируют ВЗН 1-го и 2-го генотипов в центральной и южной европейской части России, на юге Западной Сибири и в Дальневосточном регионе [6, 7]. Комары *Culex pipiens*, так же как *C. tarsalis* и *C. Quinquefasciatus*, считаются основными векторами для распространения ВЗН в разных регионах мира.

Первоначально вирус Зика был выделен в Уганде в 1947 г. и был ассоциирован с комарами рода *Aedes* [9]. Позднее его циркуляция была описана в странах бассейна Индийского океана, и в 1966 г. был выделен азиатский генотип вируса Зика [10]. Фактически повсеместное распространение лихорадки Зика началось в 2007 г., и в 2015–2016 гг. заболевание стали регистрировать в странах Центральной и Южной Америки. К концу 2023 г. эта инфекция была зарегистрирована более чем в 92 странах, не считая стран, включая Россию, в которых были выявлены завозные случаи заболевания. Принципиальным вектором для распространения лихорадки Зика считаются комары *Aedes aegypti* и *Ae. albopictus*, однако и другие комары рода *Aedes* могут вовлекаться в распространение вируса Зика [10].

Ортофлавиовирусы, как и другие возбудители арбовирусных инфекций, передаются через укусы комаров, которые могут быть заражены сразу несколькими видами патогенов [11]. Так, комары *Ae. aegypti* и *Ae. albopictus* были одновременно экспериментально инфицированы вирусами Зика, денге и чикунгунья [12]. Известны случаи микст-инфекций Зика/чикунгунья, Зика/денге, денге/чикунгунья, Зика/денге/чикунгунья у человека, ассоциированных с комарами [13–17]. Клиническая картина микст-инфекций, вызываемых ортофлавиовирусами, может отличаться от моноинфекций, что затрудняет их диагностику и лечение. Важно отметить, что для ряда микст-инфекций характерно модулирование вирулентности вирусов, что может приводить к усилению (ослаблению) тяжести заболевания [18, 19]. Так, последовательное инфицирование различными субтипами вируса денге может вызывать резкое усиление тяжести заболевания человека, вплоть до летальных случаев [20]. Этот феномен обычно связывают с действием предсуществующих антител к другому субтипу вируса денге, что вызывает усиление тяжести повторного заболевания лихорадкой денге у человека.

Важность проблемы микст-инфекций обусловлена сложностью профилактики, диагностики и лечения подобных случаев. При этом информации о возникновении, особенностях протекания микст-инфекций и их последствиях в разных регионах мира недостаточно [21].

Целью настоящей работы является экспериментальное исследование особенностей протекания микст-инфекции ВЗН и вируса Зика *in vitro* и *in vivo*.

Материалы и методы

В экспериментах использовали ВЗН (штамм Влг27924) и вирус Зика (штамм MR766), полученные из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Вирусы культивировали на монослойных клеточных культурах Vero E6 и СПЭВ (культура клеток почечной ткани эмбриона свиньи), выращенных до образования 80–90% конфлюэнтности в среде DMEM F12 (Gibco, США), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США), пенициллина 100 МЕ/мл и стрептомицина 100 мкг/мл (Gibco, США), в атмос-

фере с 5% CO₂ при температуре 37 °С. Инфекционную активность вирусных препаратов определяли титрованием микрометодом на 96-луночных культуральных планшетах (Greiner, Австрия) с субконфлюэнтным монослоем клеток, как описано ранее [22, 23]. Учет результатов проводили с помощью микроскопии через 6 сут по развитию ЦПД (цитопатогенного действия) и/или с использованием МТТ-теста. Расчет инфекционных титров вирусов осуществляли по методу Спирмена–Кербера и выражали через lg ТЦД₅₀ (50% тканевая цитопатогенная доза). Вирусные препараты хранили при температуре –80 °С.

Исследование эффектов коинфицирования *in vitro* проводили с использованием клеток Vero E6 при одновременном и последовательном (с различной очередностью) инфицировании клеточных культур ВЗН и вирусом Зика. Инфицированные клеточные культуры (по три повтора на экспериментальную точку) в 24-луночных культуральных планшетах (Greiner, Австрия) инкубировали при 37 °С в CO₂-инкубаторе; через разный период времени отбирали пробы для определения вирусной нагрузки с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), как описано нами ранее [24]. В качестве контролей использовали моноинфицированные клеточные культуры. РНК из образцов извлекали с использованием набора РНК Рибо-ПРЕП (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва). Для определения вирусных РНК применяли наборы реагентов для выявления РНК ВЗН и вируса Зика (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово, Новосибирская обл.) методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени, используя праймеры, специфичные к 3'-UTR и гену NS5 соответственно. Контроль специфичности осуществляли с использованием вирусных суспензий содержащих 10⁶ ТЦД₅₀/мл ВЗН либо вируса Зика. Отсутствие значимого влияния одного вируса на количественность детекции другого в смеси подтверждено модельным экспериментом (**рис. S1**, дополнительные материалы). Регистрацию результатов проводили с помощью прибора CFX 96 (Bio-Rad, США). Стандартные кривые были получены с помощью 10-кратного серийного разбавления образцов внутреннего положительного контроля (IPCS), поставляемых с соответствующим набором для ПЦР (от 10⁶ до 0,1 копий/реакция). Значения Ct образцов были получены по двум флуоресцентным каналам, для вирусной кДНК и для ИПС. Значения Ct вирусной кДНК были масштабированы относительно значений Ct ИПС [25].

Инфицирование мышей BALB/c массой 10–12 г осуществляли посредством интраперитонеального введения 200 мкл вирусосодержащей суспензии, контрольным животным вводили аналогичный объем физиологического раствора. При исследовании смешанного инфицирования использовали следующие экспериментальные схемы: моноинфицирование животных вирусом Зика и ВЗН; одновременное введение вируса Зика и ВЗН; последовательное введение (вирус Зика и через 4 сут ВЗН; вирус Зика и че-

рез 20 сут ВЗН). В качестве групп сравнения использовали моноинфицированных ВЗН или вирусом Зика животных. В течение эксперимента состояние животных оценивали ежедневно. Животные содержались однополовыми группами в индивидуально вентилируемых клетках (Animal Care Systems) в контролируемых условиях, при температуре 22–26 °С и относительной влажности 30–60%. Гранулированный корм и вода животным предоставлялись *ad libitum*.

Реакцию нейтрализации (РН) ВЗН или вируса Зика проводили микрометодом на клетках Vero E6 с использованием двукратных серийных разведений (начиная с 1 : 10) индивидуальных мышинных сывороток, прогретых при 56 °С в течение 30 мин [26]. За титры вируснейтрализующих антител принимали обратные величины разведения сывороток, полностью нейтрализующие инфекционную активность ВЗН или вируса Зика в дозе 50 ТЦД₅₀.

Статистический анализ, включая расчет среднего значения, стандартного отклонения и коэффициента вариации среднего значения St, выполняли с помощью программы Excel (Microsoft Corp., США). Также статистическую обработку данных осуществляли с помощью статистической программы Statistica 12 (StatSoft Inc., США). Статистическую оценку различий между группами проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента; значение $p < 0,05$ считали значимым.

Эксперименты с инфекционным материалом проводили в соответствии с требованиями правил биобезопасности, регламентированных в СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» от 28.01.2021. Инфицирование мышей ВЗН и вирусом Зика и все манипуляции с ними проводили в инфекционном виварии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора в условиях BSL-3.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 23.07.2010). Эксперименты с животными проводили с соблюдением принципов гуманности в соответствии с протоколом, утвержденным Биоэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Протокол № 2 от 03.04.2023).

Результаты

Микст-инфекция *in vitro*. Репликационную активность вирусов *in vitro* при микст-инфицировании в сравнении с моноинфицированием оценивали посредством определения вирусной нагрузки с помощью количественного ПЦР-анализа (табл. 1). Одновременное инфицирование приводило к выраженному ингибированию репликации вируса Зика, при отсутствии выраженного влияния коинфекции на накопление инфекционного ВЗН в инфицированных клетках (табл. 1 а). Последовательное инфицирование приводило к конкурентному ингибированию инфекционной активности вирусов, при этом степень конкурентного ингибирования существенно была более

выражена для вируса Зика (табл. 1 б). Так, вирусная нагрузка вирусом Зика в клетках, предварительно инфицированных ВЗН и через 24 ч вирусом Зика, была более чем на 3 порядка ниже, чем в соответствующих моноинфицированных вирусом Зика клетках. В обратных экспериментах отличия в вирусной нагрузке ВЗН в микст-инфицированных и моноинфицированных ВЗН клетках не превышали 1,5 lg.

Микст-инфекция *in vivo*. Коинфекцию ВЗН и вирусом Зика моделировали при одновременном и последовательном инфицировании мышей разными дозами вирусов (вирус Зика и через 4 сут ВЗН; вирус Зика и через 20 сут ВЗН). Как видно из результатов, представленных на рис. 1, инфицирование вирусом Зика (10^4 ТЦД₅₀/мышь) не вызывало развитие летальной инфекции, а при наблюдении за животными не отмечалось видимых клинических проявлений вирусной инфекции. Напротив, инфицирование мышей ВЗН в дозе 10^3 ТЦД₅₀ приводило к гибели 90% мышей с развитием клинических проявлений нейроинфекции. При смешанном одновременном инфицировании двумя вирусами вирус Зика не влиял значимым образом на течение и исход инфекционного процесса, вызванного ВЗН. В то же время при предварительном инфицировании животных вирусом Зика (за 4 сут до инфицирования ВЗН) отмечалось выживание 80% мышей, инфицированных 10 ЛД₅₀ ВЗН.

На рис. 2 приведены результаты инфицирования мышей BALB/c через 20 сут после предварительного инфицирования вирусом Зика в дозе 10^4 ТЦД₅₀/мышь. Обнаружена 100 и 90% защита предварительно инфицированных вирусом Зика животных от последующего заражения дозами 10 и 100 ЛД₅₀ ВЗН соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что предварительное инфицирование вирусом Зика обеспечивает выраженную защиту животных от последующего инфицирования летальными дозами ВЗН.

Индукция вируснейтрализующих антител у мышей BALB/c. Индивидуальные сыворотки крови экспериментальных животных были тестированы на наличие вируснейтрализующих антител (табл. 2). Сыворотки мышей, инфицированные вирусом Зика либо ВЗН, нейтрализовали только гомологичные вирусы. Однако после заражения ВЗН сыворотки животных, предварительно инфицированных вирусом Зика, были способны нейтрализовать как вирус Зика, так и ВЗН. При этом титры вируснейтрализующих антител в сыворотках, предварительно инфицированных вирусом Зика и затем инфицированных 100 ЛД₅₀ ВЗН, были существенно выше, чем у животных, инфицированных только ВЗН. Для подтверждения специфичности вируснейтрализующих антител и отсутствия их перекрестной реактивности в реакции нейтрализации была проведена оценка их нейтрализующей активности против гетерологичного вируса. Так, сыворотки выживших мышей после инфицирования ВЗН дозой 10 ЛД₅₀ через 21 сут после заражения имели высокий титр нейтрализующих антител против ВЗН (750 ± 107), но при этом они были не способны нейтрализовать вирус Зика на культуре клеток.

Таблица 1. Одновременное и последовательное инфицирование культуры клеток Vero E6 вирусом Западного Нила (ВЗН) и вирусом Зика (МОИ 0,5 ТЦД₅₀)**Table 1.** Simultaneous and sequential infection of Vero E6 cell culture with West Nile virus (WNV) and Zika virus (MOI 0.5 TCID₅₀)

Одновременное инфицирование (а) Simultaneous infection (a)			
Время после инфицирования Time post-infection	ВЗН (lg копий РНК/мл) WNV (log10 RNA copies/mL)	Вирус Зика (lg копий РНК/мл) Zika virus (log10 RNA copies/mL)	ВЗН/вирус Зика (lg копий РНК/мл) WNV/Zika virus (log10 RNA copies/mL)
24 ч / h	< 3,0	< 3,0	< 3,0 / < 3,0
48 ч / h	4,3 ± 0,3	3,8 ± 0,2	4,0 ± 0,3 / 3,2 ± 0,2
72 ч / h	6,5 ± 0,4	5,7 ± 0,3	6,3 ± 0,4 / 3,5 ± 0,2
96 ч / h	8,1 ± 0,4	7,8 ± 0,3	7,7 ± 0,3 / 3,9 ± 0,3
Последовательное инфицирование (б) Sequential infection (b)			
Время после инфицирования вирусом Зика Time post-infection with Zika virus	ВЗН–24 ч–вирус Зика WNV–24 hours–Zika virus		PBS–24 ч –вирус Зика PBS–24 hours–Zika virus
	ВЗН/вирус Зика (lg копий РНК/мл) WNV/ Zika virus (log10 RNA copies/mL)		Вирус Зика (lg копий РНК/мл) Zika virus (log10 RNA copies/mL)
24 ч / h	4,5 ± 0,3 / < 3,0		< 3,0
48 ч / h	6,2 ± 0,4 / 3,2 ± 0,3		4,2 ± 0,2
72 ч / h	7,4 ± 0,3 / 3,4 ± 0,3		6,9 ± 0,3
Время после инфицирования ВЗН Time post-infection with WNV	Вирус Зика–24 ч–ВЗН Zika virus–24 hours–WNV		PBS–24 ч–ВЗН PBS–24 hours–WNV
	Вирус Зика/ВЗН (lg копий/мл) Zika virus/WNV (log10 RNA copies/mL)		ВЗН (lg копий РНК/мл) WNV (log10 RNA copies/mL)
24 ч / h	3,5 ± 0,3 / < 3,0		< 3,0
48 ч / h	5,1 ± 0,4 / 3,3 ± 0,3		4,2 ± 0,2
72 ч / h	6,5 ± 0,4 / 5,0 ± 0,3		6,4 ± 0,2

Примечание. Значения представляют собой $M \pm SD$ трех независимых экспериментов. Для сравнения двух групп использовался *t*-критерий Стьюдента.

Note. Values represent $M \pm SD$ of three independent experiments. Student's *t*-test was used to compare two groups.

Обсуждение

Феномен интерференции между различными вирусами в чувствительной клетке известен достаточно давно и в классическом виде предполагает подавление репликации одного вируса другим [27]. Возможные механизмы этого явления связывают с различными ключевыми моментами репликации вирусов в клетке, индукцией систем противовирусной защиты в клетке, включая системы интерферонов, конкуренцией за ресурсы клетки для синтеза вирусных молекул и вирусных частиц, разными скоростями репликации вирусов и рядом других факторов. Проникновение вирусной частицы в клетку может драматическим образом изменять работу клеточного генома, включая или ингибируя различные гены [28]. В эти изменения могут вовлекаться десятки и сотни клеточных генов. Сложность проведения этих исследований предопределяет недостаточность наших знаний о феномене интерференции между различными вирусами, а развитие исследований по генетическому многообразию вирионов показало острую необходимость ускоренного развития исследований в этой области [29]. Особенность ортофлавивирусов состоит в том, что в природных очагах они распространяются, как правило, с помощью векторов [11]. В этом качестве наиболее

часто выступают иксодовые клещи и различные виды комаров. В случае совпадения природных очагов возможны случаи микст-инфицирования как беспозвоночных, так и их теплокровных хозяев. Вирус Зика и ВЗН относятся к так называемым «комариным» флавивирусам и циркулируют подчас в одних и тех же регионах, поэтому случаи возникновения коинфицирования вполне вероятны среди чувствительных видов хозяев, включая человека.

В наших экспериментах были использованы вирус Зика и ВЗН, которые широко распространены в современном мире и недавно вызвали практически глобальные вспышки заболеваний в странах с теплым климатом. Результаты, полученные с использованием этих вирусов, показывают наличие интерференции *in vitro* между этими двумя ортофлавивирусами. Одновременное инфицирование приводит к выраженному ингибированию репликации вируса Зика, при отсутствии столь же выраженного эффекта на репликацию ВЗН в клетках млекопитающих. Последовательное (с различной очередностью) инфицирование также приводит к конкурентному взаимному ингибированию репликации этих вирусов, при этом степень конкурентного ингибирования остается более выражена в отношении вируса Зика. Недавно было показано,

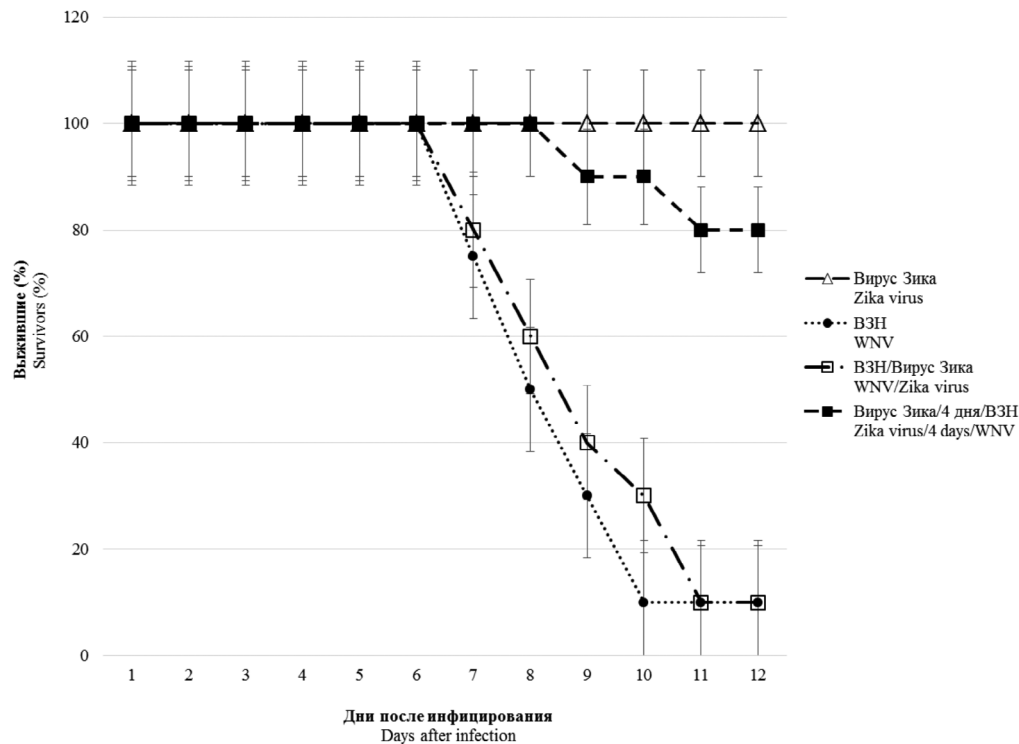


Рис. 1. Выживаемость мышей BALB/c, инфицированных вирусами Западного Нила (ВЗН) и Зика, при разных схемах введения вирусных препаратов.

△ – результаты, полученные при внутрибрюшинном инфицировании вирусом Зика дозой 10^4 ТЦД₅₀; ● – при внутрибрюшинном инфицировании ВЗН дозой 10^3 ТЦД₅₀ (10 ЛД₅₀); □ – при одновременном внутрибрюшинном инфицировании вирусом Зика (10^4 ТЦД₅₀) и ВЗН (10 ЛД₅₀); ■ – при внутрибрюшинном инфицировании вирусом Зика (10^4 ТЦД₅₀) и через 4 сут внутрибрюшинном инфицировании ВЗН (10 ЛД₅₀) ($n = 10$; $p < 0,05$).

Fig. 1. Survival of BALB/c mice infected with West Nile virus (WNV) and Zika virus under different schemes of virus administration.

△ – experimental results obtained by intraperitoneal Zika virus infection with a dose of 10^4 TCID₅₀; ● – experimental results obtained by intraperitoneal infection of WNV with a dose of 10^3 TCID₅₀ (10 LD₅₀); □ – experimental results obtained by simultaneous intraperitoneal infection with Zika virus (10^4 TCID₅₀) and WNV (10 LD₅₀); ■ – experimental results obtained by intraperitoneal infection with Zika virus (10^4 TCID₅₀) and after 4 days intraperitoneal infection with 10 LD₅₀ of WNV ($n = 10$; $p < 0.05$).

что коинфекция клеток Vero ВЗН и вирусом энцефалита Сент-Луис (St. Louis encephalitis virus, SLEV) сопровождается ингибированием репликации SLEV при минимальном влиянии на репликационную активность ВЗН. В то же время коинфицирование комариных клеток СТ (*Cx. tarsalis*) не оказывало влияния на репликацию любого из вирусов [30].

Моделирование микст-инфекции на лабораторных животных (*in vivo*) частично подтвердило результаты, полученные на культуре клеток. Так, при одновременном инфицировании мышей BALB/c вирусом Зика не влиял значимым образом на течение заболевания и летальный исход инфекционного процесса, вызванного ВЗН. Однако при предварительном инфицировании животных вирусом Зика (за 4 сут до инфицирования ВЗН) отмечалось достоверное снижение инфекционной активности ВЗН для лабораторных животных. Эти результаты свидетельствуют о возможности интерференции *in vivo* между этими двумя флавивирусами. Оценить обратный эффект нам не удалось вследствие того, что выбранная модель инфекции на животных не обеспечивала развитие клинически выраженной и/или летальной инфекции после введения вируса Зика. При моделировании ко-

инфекции с заражением животных ВЗН через 20 сут после инфицирования вирусом Зика было обнаружено, что предварительное инфицирование вирусом Зика практически полностью защищает животных от последующего инфицирования 10 и 100 ЛД₅₀ ВЗН.

В нашей работе продемонстрировано, что, в отличие от ранее опубликованных данных о смешанной инфекции вирусами Зика и денге [30, 31], инфекция ВЗН у мышей, предварительно инфицированных вирусом Зика, не сопровождалась усилением проявлений инфекции. Более того, при предварительном инфицировании вирусом Зика мы наблюдали формирование выраженной защиты животных от последующего инфицирования ВЗН. Ранее была показана ключевая роль нейтрализующих антител в защите от флавивирусных инфекций [32–34]. Оценка способности сывороток крови нейтрализовать вирус Зика и ВЗН была протестирована в реакции вирусной нейтрализации на культуре клеток Vero Е6. Индукция вируснейтрализующих антител была обнаружена только против гомологичного вируса (табл. 2), перекрестная реактивность вируснейтрализующих антител отсутствовала. Важно подчеркнуть, что предварительная инфекция вирусом Зика приводила к более быстрому

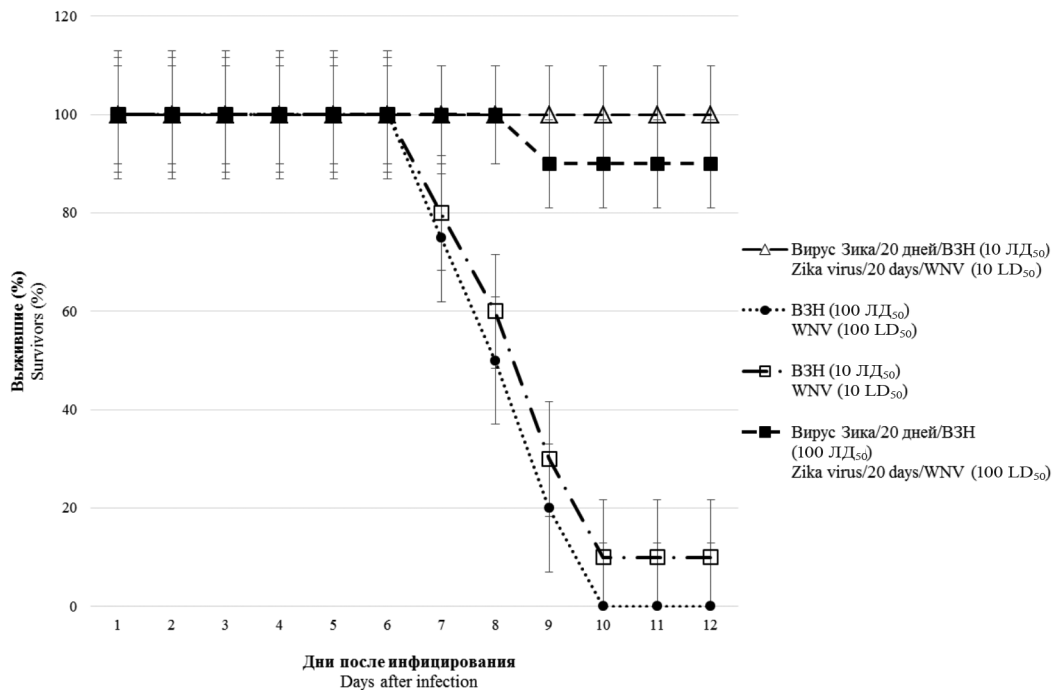


Рис. 2. Выживаемость предварительно инфицированных вирусом Зика мышей BALB/c при последующем инфицировании летальными дозами вируса Западного Нила (ВЗН).

△ – результаты, полученные при внутрибрюшинном инфицировании вирусом Зика (10⁴ ТЦД₅₀) и через 20 сут при внутрибрюшинном инфицировании ВЗН (10 ЛД₅₀); ● – при внутрибрюшинном инфицировании ВЗН (100 ЛД₅₀); □ – при внутрибрюшинном инфицировании ВЗН (10 ЛД₅₀); ■ – при внутрибрюшинном инфицировании вирусом Зика (10⁴ ТЦД₅₀) и через 20 сут при внутрибрюшинном инфицировании ВЗН (100 ЛД₅₀) (n = 10; p < 0,05).

Fig. 2. Survival of Zika virus pre-infected BALB/c mice upon subsequent infection with lethal doses of West Nile virus (WNV).

△ – experimental results obtained by intraperitoneal infection with Zika virus (10⁴ TCID₅₀) and after 20 days intraperitoneal infection with WNV (10 LD₅₀); ● – experimental results obtained by intraperitoneal infection with WNV (100 LD₅₀); □ – experimental results obtained with intraperitoneal infection of WNV (10 LD₅₀); ■ – experimental results obtained by intraperitoneal infection with Zika virus (10⁴ TCID₅₀) and after 20 days intraperitoneal infection with WNV (100 LD₅₀) (n = 10; p < 0.05).

Таблица 2. Индукция вируснейтрализующих антител у мышей BALB/c, инфицированных вирусом Зика и через 20 сут зараженных вирусом Западного Нила (ВЗН) (8 сут после заражения ВЗН)

Table 2. Induction of virus-neutralizing antibodies in BALB/c mice pre-infected with Zika virus and after 20 days infected with West Nile virus (WNV) (8 days after WNV infection)

Сыворотки мышей Mouse serum	Титры вируснейтрализующих антител (M ± SEM) Virus neutralizing antibody titers (M ± SEM)	
	Вирус Зика Zika virus	ВЗН WNV
Моноинфекция Mono infection		
Вирус Зика (20 сут) Zika virus (20 days)	82,3 ± 15,4	< 10
ВЗН (8 сут)* WNV (8 days)*	< 10	112,6 ± 27,2
Коинфекция Co-infection		
Вирус Зика/20 сут/ВЗН (8 сут) Zika virus/20 days/WNV (8 days)	74,5 ± 17,7	525,7 ± 73,5
Контроль Control	< 10	< 10

Примечание. * – гибель 100% животных к 10-м суткам после инфицирования 100 ЛД₅₀ ВЗН. За титр принимали соответствующее разведение индивидуальной сыворотки животного нейтрализующей 50 ТЦД₅₀ вируса Зика или ВЗН в реакции нейтрализации. Представлены среднегеометрические титры вируснейтрализующих антител (n = 5; p < 0,05).

Note. * – death of 100% of animals to tenth day after infection with 100 LD₅₀ of WNV. The corresponding dilution of an individual animal serum neutralizing 50 TCID₅₀ of Zika virus or WNV in the neutralization test was taken as a titer. Geometric mean titers of virus neutralizing antibodies are presented (n = 5; p < 0.05).

ответу на инфицирование ВЗН, усиливая последующую выработку нейтрализующих антител против ВЗН. Причем уровень антител был достаточен для защиты животных от летальной инфекции. При моноинфекции ВЗН вируснейтрализующие антитела также были зарегистрированы на 8-е сутки инфек-

ции, но при этом животные погибали к 10-м суткам после инфицирования. Неоднозначность потенциальных исходов смешанного инфицирования ВЗН и вирусом Зика иллюстрируется в работе [35] в, которой показано, что образцы сывороток от серопозитивных по ВЗН лиц эффективно нейтрализуют ВЗН, но усиливают инфекционную активность вируса Зика.

Биологическая значимость предварительной нелетальной инфекции вирусом Зика, обеспечивающей защиту от ВЗН, может ограничивать циркуляцию этих ортофлавивирусов в природных очагах этих инфекций. Эти результаты могут быть полезны для дальнейшего изучения микст-инфекций, вызываемых вирусом Зика и ВЗН, а также для будущей разработки иммунопрофилактических средств широкого спектра действия против флавивирусных инфекций.

Заключение

Таким образом, исследование микст-инфекции двух ортофлавивирусов на модели *in vitro* показало наличие выраженной интерференции вирусов на культуре клеток Vero E6. Так, ВЗН при одновременном и последовательном инфицировании ингибировал репликацию вируса Зика в клеточной культуре более чем в 1000 раз, обратный эффект не превышал 30 (1,5 lg). Моделирование микст-инфекции *in vivo* показало более сложную картину развития инфекционного процесса у мышей BALB/c. При одновременном микст-инфицировании мышей вирус Зика не влиял значимым образом на развитие летальной инфекции, вызванной ВЗН. При этом предварительное инфицирование мышей нелетальными дозами вируса Зика за 4 и 20 сут до введения ВЗН обеспечивало эффективную защиту животных от летальной инфекции ВЗН и появление высокого уровня вируснейтрализующих антител против этого вируса.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Postler T.S., Beer M., Blitvich B.J., Bukh J., de Lamballerie X., Drexler J.F., et al. Renaming of the genus Flavivirus to Orthoflavivirus and extension of binomial species names within the family Flaviviridae. *Arch. Virol.* 2023; 168(9): 224. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05835-1>
- Baker R.E., Mahmud A.S., Miller I.F., Rajeev M., Rasambainarivo F., Rice B.L., et al. Infectious disease in an era of global change. *Nat. Rev. Microbiol.* 2022; 20(4): 193–05. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00639-z>
- Petersen L.R., Brault A.C., Nasci R.S. West Nile virus: review of the literature. *JAMA.* 2013; 310(3): 308–15. <https://doi.org/10.1001/jama.2013.8042>
- van Leur S.W., Heunis T., Munnur D., Sanyal S. Pathogenesis and virulence of flavivirus infections. *Virulence.* 2021; 12(1): 2814–38. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1996059>
- Brüssow H., Figuerola J. The spread of the mosquito-transmitted West Nile virus in North America and Europe. *Microb. Biotechnol.* 2025; 18(3): e70120. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.70120>
- Kariwa H., Murata R., Totani M., Yoshii K., Takashima I. Increased pathogenicity of West Nile virus (WNV) by glycosylation of envelope protein and seroprevalence of WNV in wild birds in Far Eastern Russia. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2013; 10(12): 7144–64. <https://doi.org/10.3390/ijerph10127144>
- Korobitsyn I.G., Moskvitina N.S., Tyutenkov O.Y., Gashkov S.I., Kononova Y.V., Moskvitin S.S., et al. Detection of tick-borne pathogens in wild birds and their ticks in Western Siberia and high level of their mismatch. *Folia Parasitol. (Praha).* 2021; 68: 2021.024. <https://doi.org/10.14411/fp.2021.024>
- Duggal N.K., Langwig K.E., Ebel G.D., Brault A.C. On the fly: interactions between birds, mosquitoes, and environment that have molded West Nile virus genomic structure over two decades. *J. Med. Entomol.* 2019; 56(6): 1467–74. <https://doi.org/10.1093/jme/tjz112>
- Dick G.W.A., Kitchen S.F., Haddow A.J., Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1952; 46: 509–20. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4)
- Rabe I.B., Hills S.L., Haussig J.M., Walker A.T., Dos Santos T., San Martin J.L., et al. A review of the recent epidemiology of Zika virus infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2025; 112(5): 1026–35. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.24-0420>
- Pielnaa P., Al-Saadawe M., Saro A., Dama M.F., Zhou M., Huang Y., et al. Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. *Virology.* 2020; 543: 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.01.015>
- Rückert C., Weger-Lucarelli J., Garcia-Luna S.M., Young M.C., Byas A.D., Murrieta R.A., et al. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by Aedes aegypti mosquitoes. *Nat. Commun.* 2017; 8: 15412. <https://doi.org/10.1038/ncomms15412>
- Laredo-Tiscareño S.V., Machain-Williams C., Rodríguez-Pérez M.A., Garza-Hernández J.A., Doria-Cobos G.L., Cetina-Trejo R.C., et al. Arbovirus surveillance near the Mexico–US border: Isolation and sequence analysis of chikungunya virus from patients with dengue-like symptoms in Reynosa, Tamaulipas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2018; 99(1): 191–94. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0117>
- Cherabuddi K., Iovine N.M., Shah K., White S.K., Paisie T., Salemi M., et al. Zika and Chikungunya virus co-infection in a traveller returning from Colombia, 2016: virus isolation and genetic analysis. *JMM Case Rep.* 2016; 3(6): e005072. <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.005072>
- Iovine N.M., Lednický J., Cherabuddi K., Crooke H., White S.K., Loeb J.C., et al. Coinfection with Zika and Dengue-2 viruses in a traveler returning from Haiti, 2016: clinical presentation and genetic analysis. *Clin. Infect. Dis.* 2017; 64(1): 72–5. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw667>
- Laredo-Tiscareño S.V., Garza-Hernández J.A., Salazar M.I., De Luna-Santillana E.J., Tangudu C.S., Cetina-Trejo R.C., et al. Surveillance for flaviviruses near the Mexico–U.S. border: co-circulation of Dengue virus serotypes 1, 2, and 3 and West Nile virus in Tamaulipas, Northern Mexico, 2014–2016. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2018; 99(5): 1308–17. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0426>
- Slavov S.N., Gonzaga F.A.C., Pimentel B.M.S., Ramos D.D.A.R., de Araújo W.N., Covas D.T., et al. Zika virus RNA surveillance in blood donors in the Federal District of Brazil during the 2016 outbreak. *Hematol. Transfus. Cell Ther.* 2020; 42(4): 394–96. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2019.08.006>
- Vasilakis N., Shell E.J., Fokam E.B., Mason P.W., Hanley K.A., Estes D.M., et al. Potential of ancestral sylvatic dengue-2 viruses to re-emerge. *Virology.* 2007; 358(2): 402–12. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.08.049>
- Aaskov J., Buzacott K., Thu H.M., Lowry K., Holmes E.C. Long-term transmission of defective RNA viruses in humans and Aedes mosquitoes. *Science.* 2006; 311(5758): 236–38. <https://doi.org/10.1126/science.1115030>
- Paz-Bailey G., Adams L.E., Deen J., Anderson K.B., Katzelnick L.C. Dengue. *Lancet.* 2024; 403(10427): 667–82. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)02576-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)02576-X)
- Rodríguez-Morales A.J., Villamil-Gómez W.E., Franco-Paredes C. The arboviral burden of disease caused by co-circulation and co-infection of dengue, chikungunya and Zika in the Americas. *Travel Med. Infect. Dis.* 2016; 14(3): 177–9. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2016.05.004>
- Svyatchenko V.A., Nikonov S.D., Mayorov A.P., Gelfond M.L., Loktev V.B. Antiviral photodynamic therapy: inactivation and inhibition of SARS-CoV-2 in vitro using methylene blue and Radachlorin. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2021; 33: 102112. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102112>
- Toth K., Spencer J.F., Dhar D., Sagartz J.E., Buller R.M., Painter G.R., et al. Hexadecyloxypropyl-cidofovir, CMX001, prevents adenovirus induced mortality in a permissive, immunosuppressed animal model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008; 105(20): 7293–97. <https://doi.org/10.1073/pnas.0800200105>
- Svyatchenko V.A., Ternovoi V.A., Lutkovskiy R.Y., Protopopova E.V., Gudymo A.S., Danilchenko N.V., et al. Human adenovirus and influenza A virus exacerbate SARS-CoV-2 infection in animal models. *Microorganisms.* 2023; 11(1): 180. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010180>

25. Sanders R., Mason D.J., Foy C.A., Huggett J.F. Evaluation of digital PCR for absolute RNA quantification. *PLoS One*. 2013; 8(9): e75296. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075296>
26. Petrović T., Blazquez A.B., Lupulović D., Lazić G., Escribano-Romero E., Fabijan D., et al. Monitoring West Nile virus (WNV) infection in wild birds in Serbia during 2012: first isolation and characterisation of WNV strains from Serbia. *Euro. Surveill.* 2013; 18(44): 20622. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2013.18.44.20622>
27. DaPalma T., Doonan B.P., Trager N.M., Kasman L.M. A systematic approach to virus-virus interactions. *Virus Res.* 2010; 149(1): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.01.002>
28. Zhu Y., He Z., Qi Z. Virus-host Interactions in early Japanese encephalitis virus infection. *Virus Res.* 2023; 331: 199120. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199120>
29. Du Y., Wang C., Zhang Y. Viral coinfections. *Viruses*. 2022; 14(12): 2645. <https://doi.org/10.3390/v14122645>
30. Gallichotte E.N., Fitzmeyer E.A., Williams L., Spangler M.C., Bosco-Lauth A.M., Ebel G.D. WNV and SLEV coinfection in avian and mosquito hosts: impact on viremia, antibody responses, and vector competence. *J. Virol.* 2025; 98(10): e0104124. <https://doi.org/10.1128/jvi.01041-24>
31. Dejnirattisai W., Supasa P., Wongwiwat W., Rouvinski A., Barba-Spaeth G., Duangchinda T., et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. *Nat. Immunol.* 2016; 17(9): 1102–08. <https://doi.org/10.1038/ni.3515>
32. Stettler K., Beltramello M., Espinosa D.A., Graham V., Cassotta A., Bianchi S., et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science*. 2016; 353(6301): 823–26. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8505>
33. Lobigs M., Diamond M.S. Feasibility of cross-protective vaccination against flaviviruses of the Japanese encephalitis serocomplex. *Expert Rev. Vaccines*. 2012; 11(2): 177–87. <https://doi.org/10.1586/erv.11.180>
34. Sapparapu G., Fernandez E., Kose N., Bin C., Fox J.M., Bombardi R.G., et al. Neutralizing human antibodies prevent Zika virus replication and fetal disease in mice. *Nature*. 2016; 540(7633): 443–7. <https://doi.org/10.1038/nature20564>
35. Garg H., Yeh R., Watts D.M., Mehmetoglu-Gurbuz T., Resendes R., Parsons B., et al. Enhancement of Zika virus infection by antibodies from West Nile virus seropositive individuals with no history of clinical infection. *BMC Immunol.* 2021; 22(1): 5. <https://doi.org/10.1186/s12865-020-00389-2>

Информация об авторах:

Святченко Виктор Александрович – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: svyat@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2729-0592>

Протопопова Елена Викторовна – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: protopopova_ev@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2782-8364>

Легостаев Станислав Сергеевич – младший научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: legostaev_ss@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6202-445x>

Микрюкова Тамара Петровна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: mikryukova_tp@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4350-4260>

Агафонов Александр Петрович – д-р биол. наук, генеральный директор ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: agafonov@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2577-0434>

Локтев Валерий Борисович – д-р биол. наук, профессор, академик РАН, главный научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: loktev@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0229-321x>

Участие авторов: Святченко В.А. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Протопопова Е.В. – проведение экспериментов, анализ данных; Легостаев С.С. – проведение экспериментов; Микрюкова Т.П. – проведение экспериментов; Агафонов А.П. – менеджмент исследования; Локтев В.Б. – концепция и дизайн исследования, подготовка текста.

Поступила 23.06.2025
Принята в печать 20.08.2025
Опубликована 30.08.2025

Information about the authors:

Victor A. Svyatchenko – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, Department of Molecular Virology of Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: svyat@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2729-0592>

Elena V. Protopopova – Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher, Department of Molecular Virology of Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: protopopova_ev@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2782-8364>

Stanislav S. Legostaev – junior researcher of the department of molecular virology of flaviviruses and viral hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: legostaev_ss@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6202-445x>

Tamara P. Mikryukova – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Department of Molecular Virology of Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: mikryukova_tp@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4350-4260>

Alexander P. Agafonov – Doctor of Biological Sciences, Director General, Federal Biotechnology and Biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: agafonov@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2577-0434>

Valery B. Loktev – MD, PhD, DSc, Prof., academician RANS, Chief Researcher, Department of Molecular Virology of Flaviviruses and Viral Hepatitis, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, Russia. E-mail: loktev@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0229-321x>

Contribution: Svyatchenko V.A. – the study concept and design, conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Protopopova E.V. – conducting of the experiments, analysis of the data; Legostaev S.S. – conducting of the experiments; Mikryukova T.P. – conducting of the experiments; Agafonov A.P. – management of the investigation; Loktev V.B. – the study concept and design, preparing of the text.

Received 23 June 2025
Accepted 20 August 2025
Published 30 August 2025

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-235>

© МАРЧЕНКО В.А., ЗЕЛИНСКАЯ И.А., МУХАМЕТДИНОВА Д.В., ТОРОПОВА Я.Г., ГАЛАГУДЗА М.М., ЖИЛИНСКАЯ И.Н., 2025



Эндотелиопротективные свойства сакубитрил-валсартана и дротаверина в экспериментальной инфекции, вызванной вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (*Orthomyxoviridae: Alphainfluenzavirus: Influenza A virus*)

Марченко В.А.^{1✉}, Зелинская И.А.², Мухаметдинова Д.В.², Торопова Я.Г.², Галагудза М.М.², Жилинская И.Н.¹

¹ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова» Минздрава России, 191015, г. Санкт-Петербург, Россия;

²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России, 197341, г. Санкт-Петербург, Россия

Резюме

Введение. При тяжелом течении гриппа возникают поражение и изменения морфофункциональных свойств клеток эндотелия кровеносных сосудов, что обуславливает развитие геморрагического синдрома и может стать причиной эндотелиальной дисфункции. С целью оптимизации патогенетической терапии гриппа проведен скрининг препаратов с эндотелиопротективными свойствами.

Цель. Исследование эндотелиопротективных свойств сакубитрил-валсартана и дротаверина в экспериментальной инфекции, вызванной вирусом гриппа (ВГ) A(H1N1)pdm09.

Материалы и методы. Исследование проведено на крысах стока Wistar, получавших внутривенно валсартан-сакубитрил и дротаверин (в лечебно-профилактической схеме), с последующим интраназальным инфицированием ВГ А/СПб/48/16 (H1N1)pdm09. В качестве интактного контроля использовали крыс без введения препаратов; в качестве контроля заражения – животных, не получавших препараты, с последующим инфицированием ВГ. У крыс определяли титр ВГ в легких и брыжейке, оценивали степень поражения сосудистого эндотелия легких по трем параметрам: десквамация, изменение морфологии и дистрофические изменения; определяли уровень экспрессии эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки, а также исследовали вазомоторную активность кровеносных сосудов брыжейки.

Результаты. Применение дротаверина снижает выраженность гистопатологических изменений со стороны сосудистого эндотелия легких крыс; повышает максимальный ответ кровеносных сосудов брыжейки на ацетилхолин по сравнению с группой контроля заражения; нормализует уровень экспрессии eNOS. Сакубитрил-валсартан снижает выраженность десквамации со стороны сосудистого эндотелия легких; нормализует ответ кровеносных сосудов брыжейки на ацетилхолин, но не позволяет нормализовать экспрессию eNOS.

Выводы. Дротаверин обладает более выраженной эндотелиопротективной активностью, чем сакубитрил-валсартан при их применении в лечебно-профилактической схеме у крыс, инфицированных ВГ A(H1N1)pdm09.

Ключевые слова: крысы стока Wistar; вирус гриппа A(H1N1)pdm09; эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS); гистология; иммуногистохимия; проволоочная миография; сакубитрил-валсартан; дротаверин; эндотелиопротективная активность

Для цитирования: Марченко В.А., Зелинская И.А., Мухаметдинова Д.В., Торопова Я.Г., Галагудза М.М., Жилинская И.Н. Эндотелиопротективные свойства сакубитрил-валсартана и дротаверина в экспериментальной инфекции, вызванной вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 (*Orthomyxoviridae: Alphainfluenzavirus: Influenza A virus*). *Вопросы вирусологии*. 2025; 70(4): 349–362. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-235> EDN: <https://elibrary.ru/amzvnr>

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства здравоохранения РФ (тема № 223012300007-6 «Роль вирусов гриппа в развитии дисфункции эндотелия кровеносных сосудов»).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования одобрен комиссией по биоэтике ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (протокол № 05 от 27.03.2023).

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-235>

Endothelial protective properties of sacubitril-valsartan and drotaverine in influenza A(H1N1)pdm09 virus infection (*Orthomyxoviridae: Alphainfluenzavirus: Influenza A virus*)

Vladimir A. Marchenko^{1✉}, Irina A. Zelinskaya², Darya V. Mukhametdinova², Yana G. Toropova², Michael M. Galagudza², Irina N. Zhilinskaya¹

¹North-Western State Medical University Named after I.I. Mechnikov, 191015, St. Petersburg, Russia;

²V.A. Almazov National Medical Research Centre, Russian Ministry of Health, 197341, St. Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. Severe influenza is characterized by damage and morphofunctional changes of the endothelium of blood vessels, which contributes to the development of hemorrhagic syndrome and can cause endothelial dysfunction. To optimize the pathogenetic therapy of influenza infection, a screening of medications with endothelial protective properties was carried out.

Aim. The aim of the study was to evaluate the endothelial protective properties of sacubitril/valsartan and drotaverine in influenza A(H1N1)pdm09 virus infection.

Materials and methods. The study was conducted on Wistar rats, which received sacubitril/valsartan and drotaverine (in treatment and prophylactic regimen) followed by intranasal infection with influenza A/Saint-Petersburg/48/16 (H1N1)pdm09 virus. Rats without drug administration were included in the control group; rats received no medications followed by influenza virus infection – in challenge control group. The virus infectious activity was determined in pulmonary and mesenteric tissues. Vascular endothelium damage in lungs was assessed by three parameters (desquamation, morphological and dystrophic changes). Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression level in endothelium of mesenteric blood vessels was determined as well as mesenteric arteries vasomotor activity.

Results. Drotaverine reduces the severity of histopathological changes in the pulmonary vascular endothelium; increases the maximal response of mesenteric blood vessels to acetylcholine compared to the infection control group; normalizes eNOS expression levels. Sacubitril/valsartan reduces the severity of desquamation in the pulmonary vascular endothelium; normalizes the response of mesenteric blood vessels to acetylcholine, while eNOS expression is decreased.

Conclusions. Drotaverine possesses more significant endothelial protective properties than sacubitril/valsartan when used in a treatment and prophylactic regimen in rats infected with influenza A(H1N1)pdm09 virus.

Keywords: Wistar rats; influenza A(H1N1)pdm09 virus; endothelial nitric oxide synthase (eNOS); histology; immunohistochemistry; wire myography; sacubitril/valsartan; drotaverine; endothelial protective activity

For citation: Marchenko V.A., Zelinskaya I.A., Mukhametdinova D.V., Toropova Ya.G., Galagudza M.M., Zhilinskaya I.N. Endothelial protective properties of sacubitril-valsartan and drotaverine in influenza A(H1N1)pdm09 virus infection (*Orthomyxoviridae: Alphainfluenzavirus: Influenza A virus*). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2025; 70(4): 349–362 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-235> EDN: <https://elibrary.ru/amzvmr>

Funding. This research was carried out within the framework of the state assignment of the Ministry of Health of Russian Federation (registration number: 223012300007-6 «The role of influenza viruses in the development of endothelial dysfunction of blood vessels»).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

Ethics approval. The research protocol was approved by the decision of the Local Ethics Committee of Research Institute of Influenza (protocol No. 05, March 27, 2023).

Введение

Грипп – высококонтагиозная острая респираторная вирусная инфекция с аэрогенным механизмом передачи, неизменно занимающая одно из ведущих мест в структуре инфекционной заболеваемости во всем мире. Несмотря на наличие высокоэффективных этиотропных противовирусных препаратов и значительных успехов в специфической профилактике данной инфекционной болезни, ежегодно в результате инфицирования сезонными вирусами гриппа (ВГ) болеют около 1 млрд человек, из которых у 3–5 млн ди-

агностируют тяжелые формы заболевания, тогда как летальные исходы регистрируют в среднем у 470 тыс. заболевших [1].

Своевременное применение этиотропных препаратов (в первые 48 ч) позволяет до определенной степени ингибировать репродукцию ВГ, а также снижать тяжесть течения заболевания и, как следствие, смертность от гриппозной инфекции [2]. Следовательно, этиотропная терапия не позволяет полностью ингибировать репродукцию вируса, а также не имеет значимого эффекта при назначении, начиная с 3 сут заболевания. Помимо этого, серьезной проблемой, огра-

ничивающей эффективность этиотропной терапии, остается формирование у современных циркулирующих штаммов ВГ лекарственной устойчивости. Так, возникающие мутации в генах, кодирующих различные структурные и неструктурные белки (например, *H275Y* в нейраминидазе и *I38T* в белке полимеразы PA), обуславливают невосприимчивость сезонных ВГ человека к наиболее значимым противовирусным препаратам – ингибиторам нейраминидазы (осельтамивир, занамивир) и эндонуклеазы (балоксавир марбоксил) [3, 4].

Поражение сердечно-сосудистой системы при гриппе впервые стали отмечать в конце 40-х гг. XX в. [5]. Так, на фоне гриппозной инфекции могут развиваться различные аритмии, инфаркт миокарда, миокардит, перикардит, кардиомиопатия, обострение застойной сердечной недостаточности [6, 7]. Кроме того, на вовлечение сердечно-сосудистой системы в патогенез гриппа указывают эпидемиологические данные, выявляющие более высокий уровень «дополнительной» смертности от гриппозной инфекции у больных с сопутствующими заболеваниями сердечно-сосудистой системы [8]. Так, во время эпидемии гриппа, а также на протяжении 2 мес после ее окончания у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями дополнительная смертность от гриппа составляет 481 на 100 тыс. населения, тогда как среди здоровых взрослых без соматических заболеваний данный показатель составляет 2 на 100 тыс.

Причина поражения сердечно-сосудистой системы связана с ВГ. Как было показано в многочисленных исследованиях (*in vitro* и *in vivo*), ВГ типа А способны инфицировать клетки эндотелия за счет наличия на их поверхности сиаловых кислот с α -2,3- и α -2,6-гликозидной связью [9]. В свою очередь, инфицирование эндотелиоцитов сопровождается транзитным или длительным изменением морфологии и/или нарушением функциональной активности данных клеток, что отражают понятия «активация эндотелия» и «дисфункция эндотелия» соответственно. Так, со стороны инфицированных клеток эндотелия наблюдается дисрегуляция экспрессии генов, обеспечивающих регуляцию тонуса кровеносных сосудов, гемостаза и фибринолиза, ангиогенеза [10]. Кроме того, для гриппа (особенно при тяжелом течении) характерно возникновение оксидативного стресса, гипоксии и цитокинемии, что также может служить причиной поражения эндотелия, обуславливая развитие геморагического синдрома и эндотелиальной дисфункции – типового патологического состояния, характеризующегося стойким нарушением морфологии и функциональной активности эндотелиоцитов [11].

Эндотелиальная дисфункция ассоциирована со снижением экспрессии и/или биодоступности оксида азота (NO), в том числе за счет ингибирования экспрессии гена, кодирующего эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS). Молекула NO, помимо мощного селективного вазодилатирующего эффекта, также обладает антиагрегантным, противовоспалительным, антиатерогенным и микробоцидным действием [12].

В исследованиях было показано, что ВГ A(H1N1)pdm09 вызывает выраженное снижение экспрессии eNOS *in vitro*, а также опосредует длительное (до 2 мес) снижение данного фактора *in vivo* [13, 14]. Таким образом, снижение eNOS при гриппе является одним из важных маркеров поражения эндотелия [11].

Таким образом, вовлечение эндотелия кровеносных сосудов является важным аспектом патогенеза гриппа. Более того, нарушения морфофункциональных свойств клеток эндотелия, возникающие при гриппе, могут сохраняться на протяжении 2 мес от начала заболевания, что соответствует эпидемиологическим данным о положительной корреляционной связи между заболеваемостью гриппом и «дополнительной» смертностью от заболеваний сердечно-сосудистой системы на протяжении 2 мес после окончания эпидемии [14–16]. Все это указывает на необходимость учитывать вклад поражения эндотелия в патогенез гриппа, а также создает предпосылки для проведения скрининга препаратов с эндотелиопротективной активностью, способных восстанавливать и поддерживать морфофункциональные свойства клеток сосудистого эндотелия, что, в свою очередь, необходимо для оптимизации схем патогенетической терапии данного заболевания.

Для коррекции дисфункции эндотелия при гриппе был предложен ряд препаратов с предполагаемой эндотелиопротективной активностью: статины, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента (иАПФ), блокаторы ангиотензиновых рецепторов (БАР), β -блокаторы, вазодилататоры и пр.

Перспективные данные в отношении статинов как препаратов для патогенетического лечения гриппа были получены в начале XXI в. Помимо основного механизма действия, связанного со снижением внутриклеточного содержания холестерина, также выявили ряд плеiotропных эффектов. К таким эффектам можно отнести не только противовоспалительное и иммуномодулирующее действие, но и улучшение функции эндотелия, снижение пролиферации гладкомышечных клеток меди сосудов, а также антитромботический эффект [17]. Однако за последние 10–15 лет появляется все больше данных, указывающих на отсутствие эффекта при использовании различных статинов в рамках патогенетической терапии тяжелых форм гриппа [18]. Более того, систематический прием препаратов из данной фармакологической группы до госпитализации может быть ассоциирован с ростом заболеваемости гриппом, особенно среди лиц женского пола и лиц старше 60 лет [19].

В отношении иАПФ и БАР также имеются противоречивые данные. Результаты одного из системных обзоров указывают на значимое снижение развития пневмонии и ассоциированной с ней смертностью от гриппа у пациентов, которым назначали в качестве патогенетической терапии препараты групп иАПФ, но не БАР [20]. Согласно данным другого исследования (метаанализа), при систематическом использовании препаратов этих групп у пациентов на фоне гриппа не наблюдалось статистически значимого сниже-

ния развития пневмонии и ассоциированной с ней смертности [21].

В отношении β -блокаторов было показано, что эти препараты не снижают вероятность развития сердечно-сосудистых осложнений на фоне гриппа при их систематическом приеме у пациентов с острым коронарным синдромом [22].

Таким образом, вопрос коррекции дисфункции эндотелия кровеносных сосудов в рамках патогенетической терапии гриппа остается нерешенным.

Исходя из полученных ранее результатов и данных литературы об изменениях морфофункциональных свойств клеток эндотелия при гриппе, включающих нарушение морфологии эндотелия сосудов легких, снижение уровня экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов легких и брыжейки (локальный и системный уровень), а также снижение эндотелий-зависимой вазодилатации и повышение вазоконстрикции на системном уровне, в качестве двух препаратов-кандидатов с потенциальной эндотелиопротективной активностью в настоящем исследовании были использованы дротаверин и сакубитрил-валсартан [6, 14, 23, 24].

Дротаверин является селективным ингибитором фосфодиэстеразы 4-го типа, чей механизм действия связан с повышением концентрации в клетках вторичных мессенджеров – циклического аденозинмонофосфата и циклического гуанозинмонофосфата, что, в свою очередь, повышает активность фосфатазы регуляторной легкой цепи миозина, обуславливая расслабление гладкой мускулатуры. Обладая спазмолитическим и вазодилатирующим эффектом, дротаверин способен нивелировать системную вазоконстрикцию, что снижает выраженность активации и дисфункции клеток эндотелия. Также необходимо отметить, что данный препарат активно изучался в НИИ гриппа и в 2003 г. был предложен в составе комбинированного препарата – дротаверин в сочетании с ремантадином (патент № 2229877), показавшего эндотелиопротективный эффект как в исследованиях *in vitro*, так и в клинических исследованиях.

В свою очередь, сакубитрил-валсартан, комбинированный препарат нового поколения, относится к ингибиторам неприлизина и рецепторов ангиотензина II. Так, сакубитрил-валсартан применяется при лечении хронической сердечной недостаточности с целью снижения риска сердечно-сосудистой смерти, а также при эссенциальной гипертензии [25]. Данный препарат снижает выраженность оксидативного стресса и активации тромбоцитов (антитромботическое действие), понижает концентрацию провоспалительных цитокинов (интерлейкина-6, фактора некроза опухоли- α) в крови, а также способствует снижению жесткости артериальной стенки, обуславливая вазодилатирующий эффект у пациентов с хронической сердечной недостаточностью [26]. Также имеются данные о способности сакубитрил-валсартана обуславливать коррекцию дисфункции эндотелия микроциркуляторного русла на фоне инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 [27].

Эндотелиопротективные свойства дротаверина и сакубитрил-валсартана оценивали по их способности влиять на: 1) выраженность гистопатологических изменений со стороны эндотелия кровеносных сосудов легких; 2) уровень экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки; 3) вазоконстрикцию и эндотелий-зависимую вазодилатацию кровеносных сосудов брыжейки; 4) инфекционную активность вируса в тканях легких (прямая противовирусная активность).

Цель работы – исследование эндотелиопротективных свойств сакубитрил-валсартана и дротаверина при экспериментальной инфекции, вызванной ВГ A(H1N1)pdm09.

Материалы и методы

Лабораторные животные. В исследовании были использованы 20 крыс-самцов стока Wistar (SPF-статус) массой 337 ± 65 г, полученных из питомника ФГБУ ПЛЖ «НМИЦ им. В.А. Алмазова». Животных содержали в отдельной комнате на базе вивария ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России в стандартных условиях в соответствии с директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза. Животные получали полный пищевой рацион и питьевую воду *ad libitum*. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus author guidelines for animal use (IAVES, 23.07.2010). Протокол исследования был одобрен комиссией по биоэтике ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (протокол № 05 от 27.03.2023).

Дизайн исследования. Животные были случайным образом распределены на 4 группы (по 5 особей в каждой): 1-я группа (контроль) – интактные крысы, получавшие на протяжении 4 сут питьевую воду без добавления препаратов, которым на 4-е сутки интраназально вводили стерильный физиологический раствор в объеме 0,2 мл; 2-я группа (грипп; контроль заражения) – крысы, получавшие на протяжении 4 сут воду без добавления препаратов, которых на 4-е сутки интраназально инфицировали ВГ A(H1N1)pdm09 (инфекционная активность $6,3 \lg$ ЭИД₅₀/мл, объем 0,2 мл); 3-я группа (сакубитрил-валсартан + грипп) – животные, получавшие внутривентрикулярно на протяжении 4 сут сакубитрил-валсартан (60 мг/кг/сут), которых на 4-е сутки интраназально инфицировали ВГ A(H1N1)pdm09 (объем 0,2 мл); 4-я группа (дротаверин + грипп) – крысы, получавшие внутривентрикулярно на протяжении 4 сут дротаверин (40 мг/кг/сут), с последующим интраназальным заражением (на 4-е сутки) исследуемым ВГ (объем 0,2 мл).

Препараты дротаверин и сакубитрил-валсартан были приобретены в аптечной сети «Неофарм» (г. Санкт-Петербург, Россия).

Интраназальное заражение (или введение физраствора) животных проводили после наркотизации 3% р-ром изофлюрана (Laboratorios Karizoo, Испания). Через 1 сут после введения физраствора или инфицирования крыс повторно наркотизировали,

а затем подвергали эвтаназии с последующим выделением тканей легких и брыжейки.

Содержание, заражение и введение препаратов животным проводилось сотрудниками ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (Марченко В.А. и Жилинской И.Н.) на базе вивария вышеупомянутого НИИ в 2023 г.

Определение инфекционного титра вируса в гомогенатах тканей легких и брыжейки. Из ткани правого легкого, а также брыжейки готовили 10% гомогенаты, добавляя среду DMEM («Биолот», Россия) с помощью лабораторного гомогенизатора SHM2 (Stuart, Великобритания). После центрифугирования (10–15 мин, $1000 \times g$) из супернатанта готовили серию 10-кратных разведений в фосфатно-солевом буфере (PBS) и вносили в аллантоисную полость развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ) по 200 мкл каждого разведения. Так, для гомогенатов легких использовали разведения от 10^{-1} до 10^{-8} , а для гомогенатов брыжейки – от 10^{-1} до 10^{-4} . Инкубацию РКЭ проводили при температуре 36°C в течение 2 суток, после чего из эмбрионов отбирали по 100 мкл аллантоисной жидкости, переносили в иммунологический планшет и добавляли 100 мкл 0,5% суспензии куриных эритроцитов. Реакцию гемагглютинации учитывали после оседания эритроцитов в контроле. Инфекционную активность рассчитывали по методу Рида–Менча [28].

Оценка гистопатологических изменений эндотелия кровеносных сосудов легких крыс. Сразу после некропии ткани левого легкого животных переносили в 10% формалин и оставляли для фиксации на 24 ч. Гистологическую проводку осуществляли на автоматическом процессоре замкнутого типа Shandon Excelsior ES (Thermo Fisher Scientific, Великобритания). После этого из готовых парафиновых блоков изготавливали срезы легких толщиной 3–5 мкм с последующей депарафинизацией, дегидратацией в спиртах и окрашиванием гематоксилином и эозином.

Гистопатологические изменения со стороны эндотелия легких оценивали по трем параметрам, включая: 1) десквамацию, 2) изменения морфологии эндотелия и 3) дистрофические изменения. Для оценки выраженности данных изменений использовали полуколичественную шкалу от 0 до 3, где 0 – отсутствие изменений, 1 – слабо выраженные изменения, 2 – умеренно выраженные изменения, 3 – выраженные изменения. От каждого животного изучали 3–5 кровеносных сосудов.

Иммуногистохимическое исследование. С целью локализовать нуклеопротеин (NP) ВГ в легких и брыжейке животных срезы с аутопсийным материалом инкубировали с мышиными моноклональными антителами (клон 6D11; получены из лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева») к соответствующему вирусному антигену (в разведении 1 : 1000). Для изучения уровня экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки использовали моноклональные мышиные антитела (Abcam, США,

ab76198) в соотношении 1 : 500 к соответствующему белку.

Для детекции вирусного NP и eNOS в материале использовали согласно инструкции систему иммуногистохимической визуализации Envision Flex (Dako, Дания), которая включает вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, а также DAB-хромоген.

Морфометрическую обработку для определения экспрессии eNOS проводили с использованием программного обеспечения Nis-Elements BR 4.40 (Nikon, Япония) [29]. Для этого определяли отношение суммарной интенсивности сигнала – безразмерной величины, представленной суммой интенсивности всех пикселей изучаемого объекта (в диапазоне регистрации 0–105) к площади заполнения, которое выражалось в условных единицах (у.е.).

Изучение вазомоторной активности кровеносных сосудов брыжейки крыс. Из материала от каждого животного изолировали по три артерии брыжейки (3-го порядка), с последующим их монтированием в камере проволочного миографа (DMT 620M, Дания).

Для исследования вазомоторной активности микрососудов использовали протокол кумулятивного ответа на вазоконстриктор фенилэфрин (ФЭ) и вазодилатор ацетилхолин (АХ) со ступенчато увеличивающейся концентрацией агонистов (от 10^{-7} до 10^{-5} М). Полученные данные регистрировали с помощью программного обеспечения LabChart 8.1.30. В качестве основных показателей оценки вазомоторной активности сосудов использовали: 1) концентрацию, обеспечивающую 50% максимального ответа сосудов на агонист ($\log EC_{50}$, М); 2) величину максимального ответа сосудов на агонист ($E_{\max}$, %). Также определяли площадь под кривой «концентрация–ответ» (AUC).

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ GraphPad Prism 8 с использованием метода ANOVA (однофакторного дисперсионного анализа). Нормальность полученных данных проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Данные представляли как среднее арифметическое (M), стандартное отклонение (SD) и стандартную ошибку среднего (SE). Статистическую значимость оценивали с помощью U -критерия Манна–Уитни, критерия Краскела–Уоллиса и критерия Брауна–Форсайта. Различия считали статистически значимыми для значений $p < 0,05$.

Результаты

Определение инфекционной активности вируса гриппа в гомогенатах тканей легких и брыжейки крыс. Титры ВГ А(H1N1)pdm09 в гомогенатах легких крыс всех групп представлены в **табл. 1**.

Так, в 1-й группе (контроль) инфекционно активный ВГ в легких не обнаруживался, тогда как во 2-й группе (грипп) титр вируса составлял $6,27 \pm 0,15 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$, в 3-й группе (дротаверин + грипп) – $6,43 \pm 0,31 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$, а в 4-й группе (сакубитрил-валсартан + грипп) – $6,29 \pm 0,1 \lg \text{ЭИД}_{50}/\text{мл}$. Титр вируса во 2–4-й группах статистически не отличался. В свою очередь,

Таблица 1. Титры вируса гриппа А/СПб/48/16 (H1N1)pdm09 в гомогенатах легких и брыжейки крыс ($M \pm SD$)
Table 1. Titters of influenza A/Saint Petersburg/48/16 (H1N1)pdm09 virus in pulmonary and mesenteric homogenates of rats ($M \pm SD$)

Тип гомогената Type of homogenate	Инфекционный титр вируса гриппа через 1 сут после инфицирования (lg ЭИД ₅₀ /мл) Infectious titer of influenza virus at 1 day post infection (log10 EID ₅₀ /mL)			
	1-я группа (контроль) Group 1 (control) (n = 5)	2-я группа (грипп) Group 2 (IAV) (n = 5)	3-я группа (сакубитрил-валсартан + грипп) Group 3 (sacubitril/valsartan + IAV) (n = 5)	4-я группа (дротаверин + грипп) Group 4 (drotaverine + IAV) (n = 5)
Легкие Lungs	0,0 ± 0,0	6,27 ± 0,15*	6,43 ± 0,31*	6,29 ± 0,1*
Брыжейка Mesentery	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с 1-й группой (контроль), критерий Манна–Уитни ($n = 5$).
Note. * – $p < 0.05$ compared with group 1 (control), Mann–Whitney test ($n = 5$).

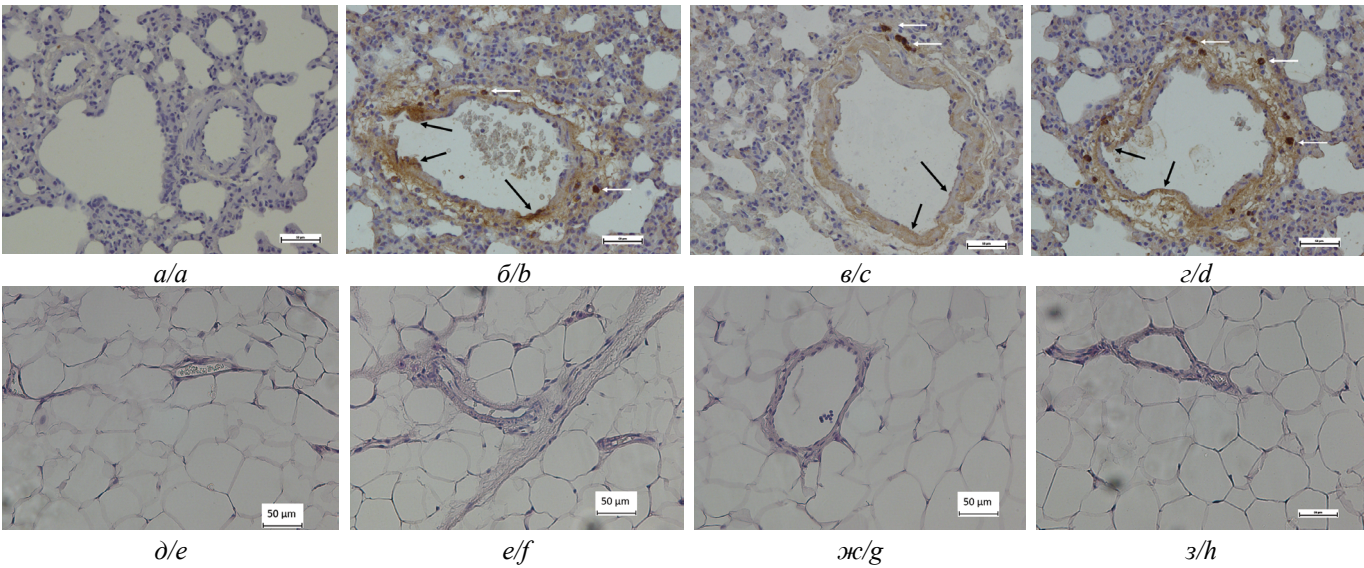


Рис. 1. Иммуногистохимический анализ экспрессии нуклеопротеина (NP) вируса гриппа А в тканях и кровеносных сосудах легких и брыжейки крыс (ув. 200).

Кровеносный сосуд легких крысы: а – 1-й группы (контроль); б – 2-й группы (грипп); в – 3-й группы (сакубитрил-валсартан + грипп); г – 4-й группы (дротаверин + грипп); кровеносный сосуд брыжейки крысы: д – 1-й группы (контроль); е – 2-й группы (грипп); ж – 3-й группы (сакубитрил-валсартан + грипп); з – 4-й группы (дротаверин + грипп). Черными стрелками обозначены NP-позитивные клетки эндотелия; белыми стрелками – NP-позитивные тучные клетки.

Fig. 1. Immunohistochemical assay of IAV NP expression in tissue and blood vessels of rat lungs and mesentery (magnification 200×). Pulmonary blood vessel of rat: a – group 1 (control); b – group 2 (IAV); c – group 3 (sacubitril/valsartan + IAV); d – group 4 (drotaverine + IAV); mesenteric blood vessel of rat: e – group 1 (control); f – group 2 (IAV); g – group 3 (sacubitril/valsartan + IAV); h – group 4 (drotaverine + IAV). Black arrows indicate NP-positive endothelial cells; white arrows denote NP-positive mast cells.

в гомогенатах брыжейки крыс ВГ не обнаруживался. Детекция нуклеопротеина вируса гриппа в кровеносных сосудах легких и брыжейки крыс методом иммуногистохимического анализа. Для подтверждения репродукции вируса в тканях и кровеносных сосудах легких и брыжейки крыс проводили детекцию белка NP ВГ (рис. 1).

Как видно из рис. 1, NP ВГ обнаруживался в кровеносных сосудах легких крыс 2–4-й групп. В свою очередь, иммуногистохимическое исследование не выявило присутствие NP-антигена в тканях и сосудах легких животных 1-й группы (контроль), а также в кровеносных сосудах и тканях брыжейки крыс всех

групп. Оценка гистопатологических изменений эндотелия кровеносных сосудов легких крыс. Наиболее выраженные изменения со стороны эндотелия легких регистрировали во 2-й группе (рис. 2 б).

На рис. 3 представлены результаты полуколичественной оценки гистопатологических изменений эндотелия кровеносных сосудов легких крыс. Так, наиболее выраженные изменения регистрировали во 2-й группе (грипп). В частности, выраженность гистопатологических изменений со стороны эндотелия легких в этой группе варьировала от слабой до умеренной и составляла для десквамации $1,5 \pm 0,11$ балла,

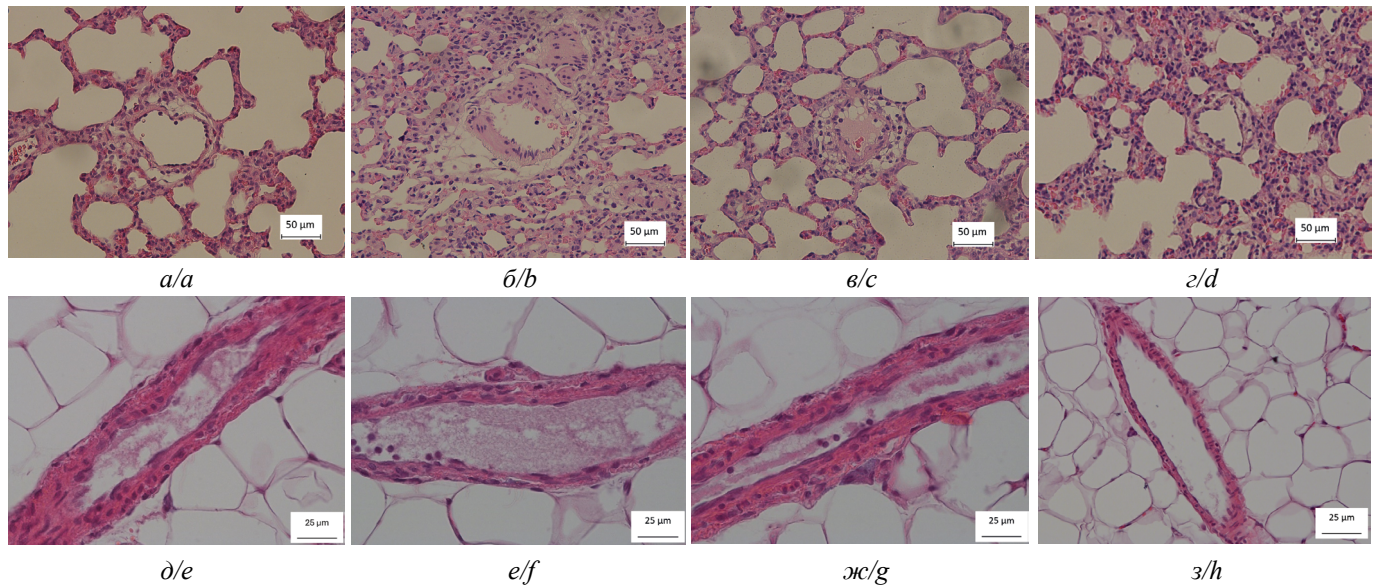


Рис. 2. Гистологическое исследование кровеносных сосудов легких крыс и брыжейки (ув. 200 для *a–d*, ув. 400 для *e–h*, окрашивание гематоксилином и эозином).

Кровеносный сосуд легких крысы: *a* – 1-й группы (контроль); *b* – 2-й группы (грипп); *c* – 3-й группы (сакубитрил-валсартан + грипп); *d* – 4-й группы (дотаверин + грипп); кровеносный сосуд брыжейки крысы: *e* – 1-й группы (контроль); *f* – 2-й группы (грипп); *g* – 3-й группы (сакубитрил-валсартан + грипп); *h* – 4-й группы (дотаверин + грипп).

Fig. 2. Histological examination of pulmonary and mesenteric blood vessels (magnification 200 × for *a–d*, magnification 400 × for *e–h*, hematoxylin & eosin staining).

Pulmonary blood vessel of rat: *a* – group 1 (control); *b* – group 2 (IAV); *c* – group 3 (sacubitril/valsartan + IAV); *d* – group 4 (drotaverine + IAV); mesenteric blood vessel of rat: *e* – group 1 (control); *f* – group 2 (IAV); *g* – group 3 (sacubitril/valsartan + IAV); *h* – group 4 (drotaverine + IAV).

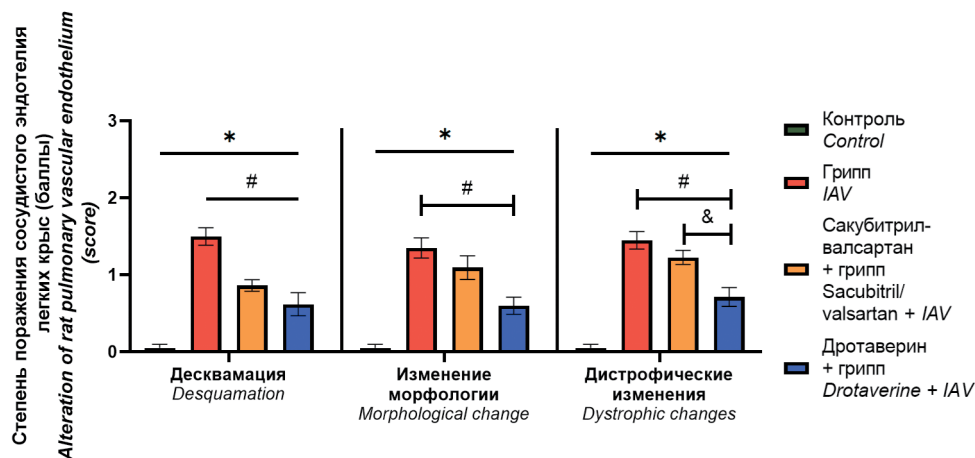


Рис. 3. Полуколичественная оценка поражения эндотелия кровеносных сосудов легких крыс ($M \pm SE$, баллы).

* – $p < 0,05$ по сравнению с 1-й группой (контроль); # – $p < 0,05$ по сравнению со 2-й группой (грипп); & – $p < 0,05$ по сравнению с 3-й группой (сакубитрил-валсартан + грипп), критерий Краскела–Уоллиса, 4–5 сосудов от каждого животного ($n = 5$).

Fig. 3. Histological alteration semi-quantitative score for pulmonary vascular endothelium in rats ($M \pm SE$, score).

* – $p < 0.05$ compared with group 1 (control); # – $p < 0.05$ compared with group 2 (IAV); & – $p < 0.05$ compared with group 3 (sacubitril/valsartan + IAV), Kruskal–Wallis test, 4–5 blood vessels from each animal ($n = 5$).

для дистрофических изменений – $1,45 \pm 0,11$ балла, и для изменения морфологии эндотелия – $1,35 \pm 0,13$ балла. Кроме того, также выявили слабую или умеренную степень разволокнения адвентиции и меди кровеносных сосудов.

В 3-й группе (сакубитрил-валсартан + грипп) наблюдали статистически значимое снижение выраженности степени десквамации по сравнению

со 2-й группой (грипп) – $0,86 \pm 0,35$ балла ($p < 0,05$), тогда как для двух других параметров (дистрофические изменения и изменения морфологии) наблюдали лишь тенденцию к снижению (в сравнении со 2-й группой).

В 4-й группе (дотаверин + грипп) регистрировали минимальные гистопатологические изменения среди экспериментальных групп (2–4-я). Так, степень

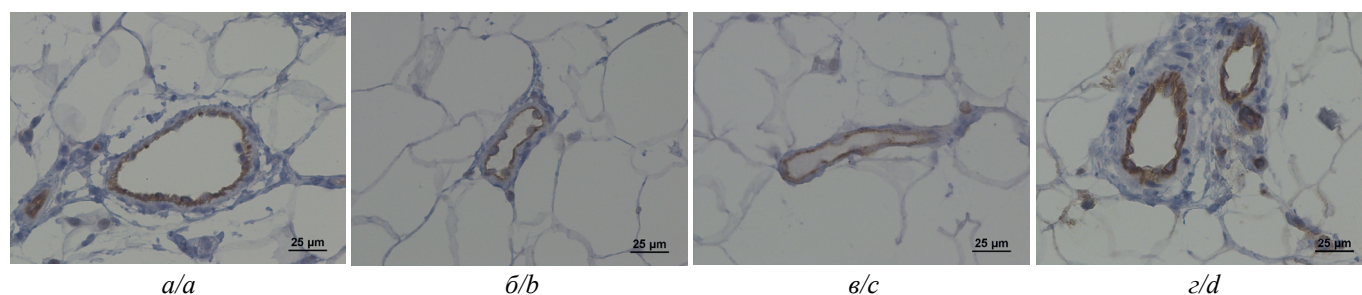


Рис. 4. Уровень экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс, 3–4 сосуда от каждого животного ($n = 5$). Кровеносный сосуд брыжейки крысы: *a* – 2-й группы (контроль); *b* – 2-й группы (грипп); *c* – 3-й группы (сакубитрил-валсартан + грипп); *d* – 4-й группы (дротаверин + грипп) (ув. 400).

Fig. 4. eNOS expression level in mesenteric endothelium of rats, 3–5 blood vessels from each animal ($n = 5$). Mesenteric blood vessel of rat: *a* – group 1 (control); *b* – group 2 (IAV); *c* – group 3 (sacubitril/valsartan + IAV); *d* – group 4 (drotaverine + IAV) (magnification 400 $\times$).

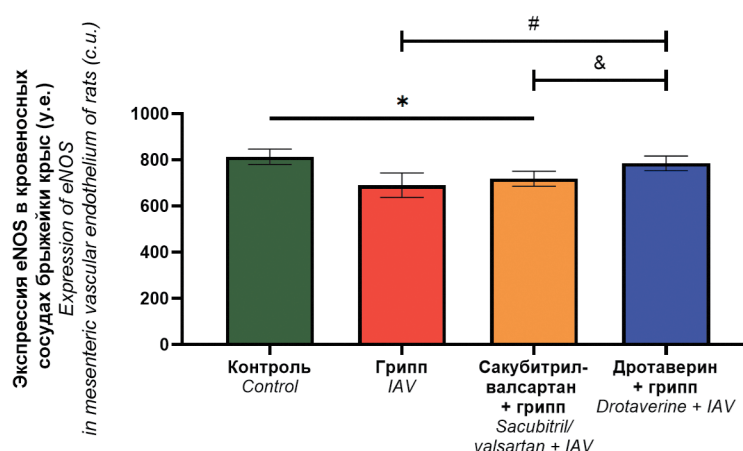


Рис. 5. Уровень экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс ($M \pm SD$, у.е.).

* – $p < 0,05$ по сравнению с 1-й группой (контроль); # – $p < 0,05$ по сравнению со 2-й группой (грипп), * – $p < 0,05$ по сравнению с 3-й группой (сакубитрил-валсартан + грипп), критерий Краскела–Уоллиса, 3–4 сосуда от каждого животного ($n = 5$).

Fig. 5. eNOS expression level in mesenteric endothelium of rats ($M \pm SD$, c.u.).

* – $p < 0.05$ compared with group 1 (control), # – $p < 0.05$ compared with group 2 (IAV), * – $p < 0.05$ compared with group 3 (sacubitril/valsartan + IAV), Kruskal–Wallis test, 3–4 blood vessels from each animal ($n = 5$).

выраженности всех трех параметров: десквамации ($0,62 \pm 0,15$ балла), изменений морфологии эндотелия ($0,6 \pm 0,11$ балла) и дистрофических изменений ($0,71 \pm 0,12$ балла) была значимо ниже, чем во 2-й группе (грипп) ($p < 0,05$).

В 1-й группе (контроль) гистопатологических изменений со стороны эндотелия кровеносных сосудов легких не было обнаружено ($0,05 \pm 0,05$ балла для всех трех параметров), так же как и со стороны эндотелия кровеносных сосудов брыжейки.

Определение уровня экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс. На **рис. 4** представлены результаты определения уровня eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс.

Проведенный морфометрический анализ уровня экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки у крыс из разных групп позволил выявить следующее (**рис. 5**): уровень экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс через 1 сут после инфицирования во 2-й группе (грипп)

и 3-й группе (сакубитрил-валсартан + грипп) составлял 690,8 и 718,6 у.е. соответственно и был значимо ниже – на 11,02% ($p < 0,05$) и 11,46% ($p < 0,05$) по сравнению с 1-й группой (контроль), где этот показатель составил 813,9 у.е. Экспрессия eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки крыс в 4-й группе (дротаверин + грипп) составляла 785,5 у.е. и оставалась на уровне контрольных значений 1-й группы ($p > 0,05$), а также была статистически значимо выше – на 8,52% ($p < 0,05$) и 12,06% ($p < 0,05$) по сравнению с 3-й группой (сакубитрил-валсартан + грипп) и 2-й группой (грипп) соответственно.

Изучение вазомоторной активности кровеносных сосудов крыс. Показатели вазомоторной активности артерий брыжейки крыс представлены в **табл. 2**.

Как видно из **табл. 2**, чувствительность артерий брыжейки (определяли по показателю $\log EC_{50}$ М) к вазоконстриктору ФЭ во 2-й группе (грипп) была выше на 0,18 М ($p < 0,05$) по сравнению с 1-й группой (контроль); чувствительность артерий брыжейки к вазоконстриктору в 3-й группе (сакубитрил-валсар-

Таблица 2. Показатели вазомоторной активности артерий брыжейки крыс ($M \pm SE$)**Table 2.** Vasomotor activity of mesenteric arteries of rats ($M \pm SE$)

Группа Group	Вазоконстриктор фенилэфрин (ФЭ) Vasoconstrictor phenylephrine (PE)		Вазодилататор ацетилхолин (АХ) Vasodilator acetylcholine (ACh)	
	Log EC ₅₀ , M	E _{max} , %	Log EC ₅₀ , M	E _{max} , %
1-я группа (контроль) Group 1 (control)	-5,54 ± 0,03	134,66 ± 8,11	-6,35 ± 0,16	47,62 ± 5,36
2-я группа (грипп) Group 2 (IAV)	-5,72 ± 0,04**	119,70 ± 4,91	-6,43 ± 0,17	26,81 ± 9,18
3-я группа (сакубитрил-валсартан + грипп) Group 3 (sacubitril/valsartan + IAV)	-5,71 ± 0,04**	117,54 ± 6,26	-6,07 ± 0,18	43,05 ± 7,29
4-я группа (дротаверин + грипп) Group 4 (drotaverine + IAV)	-5,10 ± 0,68	125,92 ± 6,29	-5,34 ± 0,37 [#]	66,36 ± 12,24 [#]

Примечание. ** – $p < 0,01$ по сравнению с 1-й группой (контроль); [#] – $p < 0,05$ по сравнению со 2-й группой (грипп), критерий Брауна–Форсайта, 3 сосуда от каждого животного ($n = 5$).

Note. ** – $p < 0.01$ compared with group 1 (control); [#] – $p < 0.05$ compared with group 2 (IAV), Brown–Forsythe test, 3 blood vessels from each animal ($n = 5$).

тан + грипп) была выше на 0,17 М ($p < 0,05$) по сравнению с 1-й группой (контроль) и на уровне 2-й группы (грипп). В 4-й группе (дротаверин + грипп) чувствительность артерий к вазоконстриктору статистически не отличалась от значений 1-й группы (контроль), но была отмечена тенденция к снижению данного параметра по сравнению с другими группами.

В свою очередь, максимальный ответ артерий брыжейки (определяли по показателю E_{max}, %) на вазоконстриктор во всех группах статистически не отличался.

Чувствительность артерий к вазодилататору АХ (log EC₅₀, М) во 2-й группе (грипп) была на уровне отрицательного контроля. В 3-й группе (сакубитрил-валсартан + грипп) отмечали тенденцию к снижению чувствительности артерий к вазодилататору, тогда как в 4-й группе (дротаверин + грипп) этот показатель был статистически значимо ниже – на 1,01 lg М ($p < 0,05$) по сравнению с 1-й группой (контроль).

Наиболее низкие значения максимального ответа сосудов (E_{max}) на вазодилататор регистрировали во 2-й группе (грипп). В 3-й группе (сакубитрил-валсартан + грипп) максимальный ответ артерий на АХ находился на уровне контрольных значений 1-й группы. У животных в 4-й группе (дротаверин + грипп) выявляли тенденцию к повышению максимального ответа сосудов на вазодилататор по сравнению с 1-й группой (контроль), а также регистрировали статистически значимое повышение ответа – на 59,6% ($p < 0,05$) по сравнению со 2-й группой (грипп).

Результаты кумулятивного дозозависимого ответа артерий брыжейки крыс при введении сакубитрил-валсартана и дротаверина на фоне инфицирования ВГ А(H1N1)pdm09 представлены на **рис. 6**.

Дозозависимые кривые ответа артерий брыжейки крыс на вазоконстриктор ФЭ во всех группах статистически не различались. Однако следует отметить, что на средние концентрации ФЭ (–6 lg М) регистрировали тенденцию к увеличению ответа артерий брыжейки во всех экспериментальных группах по сравнению с 1-й группой (контроль) (**рис. 6 а**).

В свою очередь, со стороны артерий брыжейки крыс 2-й группы (грипп) на вазодилататор АХ регистрировали статистически значимое снижение ответа на предмаксимальную концентрацию вазодилататора (–5,3 lg М) по сравнению с 1-й группой (контроль) (**рис. 6 б**).

Таким образом, на основании данных из табл. 2 и **рис. 6**, можно сделать вывод о том, что дротаверин, но не сакубитрил-валсартан способен восстанавливать чувствительность артерий брыжейки к вазоконстриктору ФЭ и снижать чувствительность к вазодилататору АХ на фоне повышения эндотелий-зависимого максимального ответа кровеносных сосудов брыжейки на АХ.

Результаты изучения интегрального ответа артерий брыжейки крыс представлены на **рис. 7**.

Как видно из **рис. 7**, была выявлена тенденция к снижению интегрального ответа во 2-й группе (грипп) на вазодилататор, тогда как статистически значимых отличий в отношении сосудов брыжейки на вазоконстриктор не регистрировали.

Обсуждение

В качестве экспериментальной модели гриппозной инфекции использовали крыс стока Wistar. Эти животные являются чувствительными по отношению к ВГ А(H1N1)pdm09 после их предварительной адаптации [30]. Помимо этого, у крыс этого стока после инфицирования ВГ регистрируются выраженные морфофункциональные изменения со стороны эндотелия кровеносных сосудов легких и брыжейки на ранних сроках инфекции [23, 24].

В настоящем исследовании изучали эндотелиопротективную активность сакубитрил-валсартана и дротаверина через 24 ч после инфицирования крыс ВГ А(H1N1)pdm09, так как именно на этом временном интервале наблюдается наиболее выраженное поражение эндотелия кровеносных сосудов [23, 24]. В эксперименте изучали влияние в лечебно-профилактической схеме сакубитрил-валсартана и дротаверина на: 1) инфекционную активность вируса в гомогенате

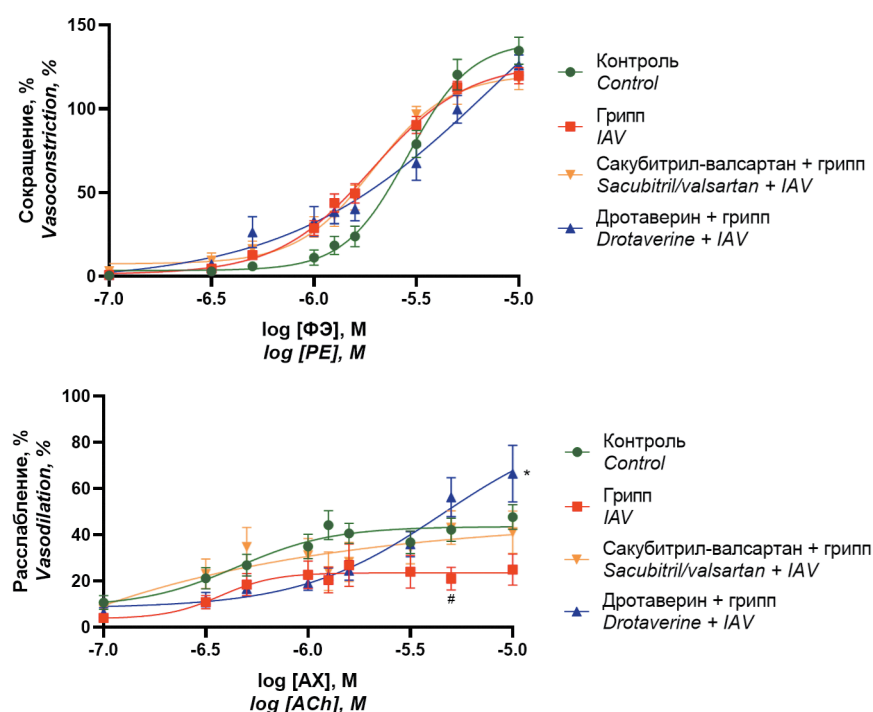


Рис. 6. Дозозависимые кривые «концентрация-ответ» артерий брыжейки крыс ($M \pm SE$).

a – фенилэфрин-зависимое сокращение кровеносных сосудов; *b* – ацетилхолин-зависимое расслабление кровеносных сосудов. * – $p < 0,05$ по сравнению с 1-й группой (контроль); # – $p < 0,05$ по сравнению со 2-й группой (грипп), критерий Брауна–Форсайта, 3 сосуда от каждого животного ($n = 5$).

Fig. 6. Dose-dependent response curves of mesenteric arteries of rats ($M \pm SE$).

a – dose-dependent response to phenylephrine; *b* – dose-dependent response to acetylcholine. * – $p < 0,05$ compared with group 1 (control); # – $p < 0,05$ compared with group 2 (IAV), Brown-Forsythe test, 3 blood vessels from each animal ($n = 5$).

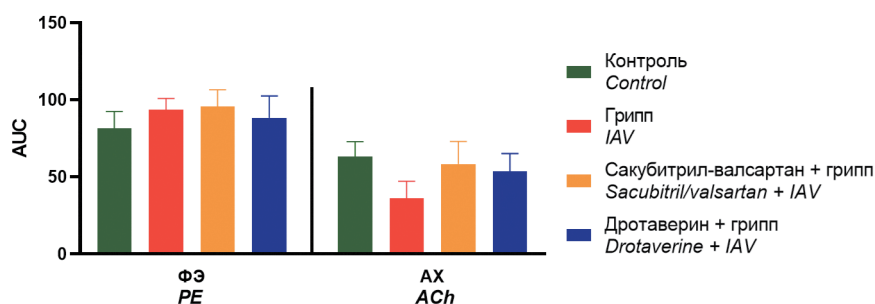


Рис. 7. Интегральный ответ артерий брыжейки крыс ($M \pm SE$).

$p > 0,05$ по сравнению с 1-й группой (контроль), критерий Брауна–Форсайта, 3 сосуда от каждого животного ($n = 5$).

Fig. 7. Integral response of mesenteric arteries of rats ($M \pm SE$).

$p > 0,05$ compared with group 1 (control), Brown-Forsythe test, 3 blood vessels from each animal ($n = 5$).

тах легких и брыжейки крыс, 2) выраженность гистопатологических изменений эндотелия кровеносных сосудов легких, 3) уровень экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки, 4) вазомоторную активность кровеносных сосудов брыжейки при инфицировании ВГ A(H1N1)pdm09.

Необходимо отметить, что гистологические исследования проводили в кровеносных сосудах легких, а вазомоторную активность и уровень экспрессии eNOS изучали в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки. Известно, что ВГ A(H1N1)pdm09 инфицирует

эндотелий кровеносных сосудов легких крыс, что опосредует прямое цитопатическое действие и вызывает изменение морфологических и функциональных свойств данных клеток. Однако на фоне гриппозной инфекции у животных репродукция вируса в клетках эндотелия кровеносных сосудов брыжейки не происходит, что выражается в отсутствии каких-либо гистопатологических изменений [14]. Вместе с тем поражение ВГ эндотелиоцитов сосудов легких крыс вызывает системное поражение кровеносных сосудов, вероятно, за счет оксидативного стресса, гипок-

сии и/или цитокинемии [11, 31–33]. Кроме того, сосу́ды бры́жейки являются общепризнанной моделью изучения функциональной активности кровеносных сосудов на системном уровне.

Так, титр исследуемого ВГ в гомогенатах легких крыс 3-й групп (сакубитрил-валсартан + грипп) и 4-й группы (дротаверин + грипп) статистически не отличался от 2-й группы (грипп), что указывает на отсутствие у препаратов противовирусной активности. Репродукция ВГ была подтверждена с помощью детекции NP ВГ в тканях и кровеносных сосудах легких. Необходимо отметить, что вирус не обнаруживался в тканях брыжейки, что подтверждается данными предыдущих исследований [14].

При изучении гистопатологических изменений со стороны кровеносных сосудов легких животных было установлено, что дротаверин значительно снижает степень выраженности десквамации, дистрофических изменений и изменений морфологии эндотелия по сравнению со 2-й группой (грипп). В свою очередь, применение сакубитрил-валсартана статистически значимо снижало степень выраженности десквамации эндотелия, но не дистрофических изменений и изменений морфологии эндотелия. Можно предположить, что изменения морфологии и дистрофические изменения эндотелия являются следствием миграции клеток иммунной системы в очаг воспаления, тогда как десквамация возникает в результате гибели эндотелиоцитов и отражает, как правило, крайнюю степень поражения эндотелия. Стоит отметить, что выраженность отека легочной ткани (отношение массы легких к массе тела) во всех группах статистически не различалась (данные не представлены).

При изучении уровня экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки было установлено, что дротаверин восстанавливает экспрессию этого эндотелиального фактора до значений 1-й группы (контроль). В свою очередь, экспрессия eNOS на фоне применения сакубитрил-валсартана остается на уровне значений 2-й группы (грипп).

Кроме того, полученные данные указывают на увеличение максимального ответа и снижение чувствительности кровеносных сосудов брыжейки на вазодилатор АХ, а также восстановления чувствительности к вазоконстриктору ФЭ на фоне применения дротаверина. В свою очередь, сакубитрил-валсартан восстанавливает максимальный ответ артерий брыжейки на вазодилатор и не влияет на чувствительность кровеносных сосудов брыжейки к нему, тогда как чувствительность к вазоконстриктору значимо выше контрольных значений. Необходимо отметить, что уровень экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки в целом соотносится с максимальным ответом кровеносных сосудов брыжейки на вазодилатор АХ.

Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод о том, что дротаверин обладает более выраженными эндотелиопротективными свойствами по сравнению с сакубитрил-валсартаном. Это можно объяснить тем, что дротаверин в большей степени снижает

выраженность гистопатологических изменений сосу́дистого эндотелия легких. Так, выраженное поражение клеток эндотелия кровеносных сосудов легких (локальный уровень), возникающее на фоне прямого цитопатического действия ВГ, опосредует активацию эндотелиоцитов, которые становятся основными продуцентами провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли- α , интерлейкин-1 β и интерлейкин-6), а также хемокинов (CXCL10, RANTES) [11]. В свою очередь, высокие концентрации провоспалительных цитокинов, циркулирующих в крови, обуславливают активацию клеток сосу́дистого эндотелия кровеносных сосудов на системном уровне (включая сосу́ды брыжейки).

Заключение

Дротаверин и сакубитрил-валсартан обладают эндотелиопротективными свойствами при их применении в лечебно-профилактической схеме у крыс при экспериментальной инфекции, вызванной ВГ A(H1N1)pdm09. При этом дротаверин обладает более выраженной эндотелиопротективной активностью, чем сакубитрил-валсартан, обуславливая: 1) снижение выраженности поражения эндотелия кровеносных сосудов легких, 2) повышение максимального ответа со стороны кровеносных сосудов брыжейки на АХ, 3) нормализацию экспрессии eNOS в эндотелии кровеносных сосудов брыжейки. Оба препарата не обладают противовирусной активностью *in vivo*.

Таким образом, эндотелиопротективный эффект дротаверина и сакубитрил-валсартана связан с их системным вазодилатирующим и гипотензивным действием.

Полученные данные могут лечь в основу дальнейших доклинических исследований по изучению эндотелиопротективных свойств данных препаратов в терапевтической схеме, а также последующих клинических исследований с целью оптимизации патогенетической терапии гриппа.

Настоящее исследование является продолжением работ по изучению дисфункции эндотелия кровеносных сосудов, индуцированной вирусом гриппа A(H1N1)pdm09, начатых в 2020 г. группой ученых ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

ЛИТЕРАТУРА

1. WHO. Global Influenza Strategy 2019–2030; 2019. Available at: <https://apo.org.au/node/224416>
2. Tenforde M.W., Noah K.P., O'Halloran A.C., Kirley P.D., Hoover C., Alden N.B., et al. Timing of influenza antiviral therapy and risk of death in adults hospitalized with influenza-associated pneumonia, influenza hospitalization surveillance network (FluSurv-NET), 2012–2019. *Clin. Infect. Dis.* 2025; 80(2): 461–8. <https://doi.org/10.1093/cid/ciae427>
3. Lampejo T. Influenza and antiviral resistance: an overview. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 39(7): 1201–8. doi:10.1007/s10096-020-03840-9
4. Fage C., Loison S., Zwiygart A.C., Poli R., Rosset S., Medaglia C., et al. Influenza A(H1N1)pdm09 virus resistance to baloxavir, oseltamivir and sialic acid mimetics in single and dual therapies: Insights from human airway epithelia and murine models. *Antiviral. Res.* 2025; 239: 106174. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2025.106174>
5. Barber H. A case of influenzal myocarditis. *Clin J.* 1947; 76(5): 181–3.

6. Skaarup K.G., Modin D., Nielsen L., Jensen J.U.S., Biering-Sørensen T. Influenza and cardiovascular disease pathophysiology: strings attached. *Eur. Heart J. Suppl.* 2023; 25(Suppl. A): A5–11. <https://doi.org/10.1093/eurheartjsupp/suac117>
7. Jeyanathan T., Overgaard C., McGeer A. Cardiac complications of influenza infection in 3 adults. *CMAJ.* 2013; 185(7): 581–4. <https://doi.org/10.1503/cmaj.110807>
8. Гольдштейн Э.М. Смертность от болезней системы кровообращения и болезней органов дыхания, ассоциированная с гриппом, в российской федерации во время сезонов гриппа с 2013-2014 до 2018-2019. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2019; (12): 9–16. <https://doi.org/10.17513/mjpf.12945> <https://elibrary.ru/dhthqt>
9. Cioffi D.L., Pandey S., Alvarez D.F., Cioffi E.A. Terminal sialic acids are an important determinant of pulmonary endothelial barrier integrity. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2012; 302(10): L1067–77. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00190.2011>
10. Власов Т.Д., Петрищев Н.Н., Лазовская О.А. Дисфункция эндотелия. Правильно ли мы понимаем этот термин? *Вестник анестезиологии и реаниматологии.* 2020; 17(2): 76–84. <https://doi.org/10.21292/2078-5658-2020-17-2-76-84> <https://elibrary.ru/eqepoi>
11. Марченко В.А., Жилинская И.Н. Активация и дисфункция эндотелия кровеносных сосудов при инфекции, вызванной вирусами гриппа типа А (Alphainfluenzavirus influenzae). *Вопросы вирусологии.* 2024; 69(6): 465–78. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-264> <https://elibrary.ru/zujoza>
12. Loscalzo J., Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 1995; 38(2): 87–104. [https://doi.org/10.1016/s0033-0620\(05\)80001-5](https://doi.org/10.1016/s0033-0620(05)80001-5)
13. Марченко В.А., Барашкова С.В., Зелинская И.А., Торопова Я.Г., Рэмзи Э.С., Жилинская И.Н. Экспрессия эндотелиальных факторов в клетках эндотелия человека при инфекции, вызванной вирусом гриппа А(H1N1)pdm09 (Orthomyxoviridae; Alphainfluenzavirus). *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(3): 198–210. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-48> <https://elibrary.ru/vsxlvb>
14. Марченко В.А., Зелинская И.А., Торопова Я.Г., Мухаметдинова Д.В., Галагудза М.М., Лioznov Д.А. и др. Длительность системных нарушений вазомоторной функции эндотелия микрососудов, вызванных вирусом гриппа А(H1N1)pdm09. *Регионарное кровообращение и микроциркуляция.* 2023; 22(4): 74–86. <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2023-22-4-74-86> <https://elibrary.ru/mmwnsf>
15. Роганова И.В. Сравнительная характеристика нарушений мозгового кровообращения при гриппе в разных возрастных группах. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки.* 2011; (1): 108–15. <https://elibrary.ru/oetuod>
16. Бойцов С.А. Грипп, новая коронавирусная инфекция и сердечно-сосудистые заболевания. *Кардиологический вестник.* 2021; 16(1): 5–9. <https://doi.org/10.17116/Cardiobulletin2021160115> <https://elibrary.ru/zgvxkg>
17. Choudhary A., Rawat U., Kumar P., Mittal P. Pleotropic effects of statins: the dilemma of wider utilization of statin. *Egypt. Heart J.* 2023; 75(1): 1. <https://doi.org/10.1186/s43044-023-00327-8>
18. Radigan K.A., Ulrich D., Misharin A.V., Chiarella S.E., Soberanes S., Gonzalez A., et al. The effect of rosuvastatin in a murine model of influenza A infection. *PLoS One.* 2012; 7(4): e35788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035788>
19. Wu F., Wang C., Li S., Ye Y., Cui M., Liu Y., et al. Association between statins administration and influenza susceptibility: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Viruses.* 2024; 16(2): 278. <https://doi.org/10.3390/v16020278>
20. Caldeira D., Alarcão J., Vaz-Carneiro A., Costa J. Risk of pneumonia associated with use of angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2012; 345: e4260. <https://doi.org/10.1136/bmj.e4260>
21. Henry C., Zaizafoun M., Stock E., Ghamande S., Arroliga A.C., White H.D. Impact of angiotensin-converting enzyme inhibitors and statins on viral pneumonia. *Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent.).* 2018; 31(4): 419–23. <https://doi.org/10.1080/08998280.2018.1499293>
22. Sribhutor A., Phrommintikul A., Wongcharoen W., Chaikledkaew U., Eakanunkul S., Sukonthasarn A. The modification effect of influenza vaccine on prognostic indicators for cardiovascular events after acute coronary syndrome: observations from an influenza vaccination trial. *Cardiol. Res. Pract.* 2016; 2016: 4097471. <https://doi.org/10.1155/2016/4097471>
23. Marchenko V., Zelinskaya I., Toropova Y., Shmakova T., Podyacheva E., Lioznov D., et al. Influenza A virus causes histopathological changes and impairment in functional activity of blood vessels in different vascular beds. *Viruses.* 2022; 14(2): 396. <https://doi.org/10.3390/v14020396>
24. Marchenko V., Mukhametdinova D., Amosova I., Lioznov D., Zhilinskaya I. Influenza A(H1N1)pdm09 virus alters expression of endothelial factors in pulmonary vascular endothelium in rats. *Viruses.* 2022; 14(11): 2518. <https://doi.org/10.3390/v14112518>
25. Mazza A., Townsend D.M., Torin G., Schiavon L., Camerotto A., Rigatelli G., et al. The role of sacubitril/valsartan in the treatment of chronic heart failure with reduced ejection fraction in hypertensive patients with comorbidities: From clinical trials to real-world settings. *Biomed. Pharmacother.* 2020; 130: 110596. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110596>
26. Cassano V., Armentaro G., Magurno M., Aiello V., Borrello F., Miceli S., et al. Short-term effect of sacubitril/valsartan on endothelial dysfunction and arterial stiffness in patients with chronic heart failure. *Front. Pharmacol.* 2022; 13: 1069828. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1069828>
27. Hellmann M., Dąbrowska E., Zarczyńska-Buchowiecka M., Romanowska-Kocejko M., Narkiewicz K., Gruchała M., et al. Sacubitril/valsartan improved microvascular endothelial function in a young patient with COVID-19-related mild left ventricular dysfunction. *Kardiologia Pol.* 2022; 80(5): 614–5. <https://doi.org/10.33963/kp.a2022.0063>
28. Ramakrishnan M.A. Determination of 50 % endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* 2016; 5(2): 85–6. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>
29. Taylor C.R., Levenson R.M. Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology.* 2006; 49(4): 411–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02513.x>
30. Марченко В.А., Барашкова С.В., Зелинская И.А., Торопова Я.Г., Сорокин Е.В., Жилинская И.Н. Моделирование гриппозной инфекции у половозрелых крыс стока Wistar. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(3): 159–66. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-159-166> <https://elibrary.ru/ufdacp>
31. Janaszak-Jasiecka A., Siewkierzycka A., Płoska A., Dobrucki I.T., Kalinowski L. Endothelial dysfunction driven by hypoxia – the influence of oxygen deficiency on bioavailability. *Biomolecules.* 2021; 11(7): 982. <https://doi.org/10.3390/biom11070982>
32. Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Res. Cardiol.* 2008; 103(5): 398–406. <https://doi.org/10.1007/s00395-008-0733-0>
33. Shaito A., Aramouni K., Assaf R., Parenti A., Orekhov A., Yazbi A.E., et al. Oxidative stress-induced endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. *Front. Biosci. (Landmark Ed).* 2022; 27(3): 105. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2703105>

REFERENCES

1. WHO. Global Influenza Strategy 2019–2030; 2019. Available at: <https://apo.org.au/node/224416>
2. Tenforde M.W., Noah K.P., O'Halloran A.C., Kirley P.D., Hoover C., Alden N.B., et al. Timing of influenza antiviral therapy and risk of death in adults hospitalized with influenza-associated pneumonia, influenza hospitalization surveillance network (FluSurv-NET), 2012–2019. *Clin. Infect. Dis.* 2025; 80(2): 461–8. <https://doi.org/10.1093/cid/ciae427>
3. Lampejo T. Influenza and antiviral resistance: an overview. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 39(7): 1201–8. doi:10.1007/s10096-020-03840-9
4. Fage C., Loison S., Zwygart A.C., Poli R., Rosset S., Medaglia C., et al. Influenza A(H1N1)pdm09 virus resistance to baloxavir, oseltamivir and sialic acid mimetics in single and dual therapies: Insights from human airway epithelia and murine models. *Antiviral Res.* 2025; 239: 106174. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2025.106174>
5. Barber H. A case of influenzal myocarditis. *Clin J.* 1947; 76(5): 181–3.
6. Skaarup K.G., Modin D., Nielsen L., Jensen J.U.S., Biering-Sørensen T. Influenza and cardiovascular disease pathophysiology: strings attached. *Eur. Heart J. Suppl.* 2023; 25(Suppl. A): A5–11. <https://doi.org/10.1093/eurheartjsupp/suac117>
7. Jeyanathan T., Overgaard C., McGeer A. Cardiac complications of influenza infection in 3 adults. *CMAJ.* 2013; 185(7): 581–4. <https://doi.org/10.1503/cmaj.110807>

8. Goldsteyn E.M. Influenza-associated mortality for circulatory and respiratory causes during the 2013-2014 through the 2018-2019 influenza seasons in Russia. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy*. 2019; (12): 9–16. <https://doi.org/10.17513/mjpf.12945> <https://elibrary.ru/dhthqt> (in Russian)
9. Cioffi D.L., Pandey S., Alvarez D.F., Cioffi E.A. Terminal sialic acids are an important determinant of pulmonary endothelial barrier integrity. *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* 2012; 302(10): L1067–77. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00190.2011>
10. Vlasov T.D., Petrishev N.N., Lazovskaya O.A. Endothelial dysfunction. Do we understand this term properly? *Vestnik anesteziologii i reanimatologii*. 2020; 17(2): 76–84. <https://doi.org/10.21292/2078-5658-2020-17-2-76-84> <https://elibrary.ru/eqepoi> (in Russian)
11. Marchenko V.A., Zhilinskaya I.N. Endothelial activation and dysfunction caused by influenza A virus (Alphainfluenzavirus influenzae). *Voprosy virusologii*. 2024; 69(6): 465–78. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-264> <https://elibrary.ru/zujoza> (in Russian)
12. Loscalzo J., Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 1995; 38(2): 87–104. [https://doi.org/10.1016/s0033-0620\(05\)80001-5](https://doi.org/10.1016/s0033-0620(05)80001-5)
13. Marchenko V.A., Barashkova S.V., Zelinskaya I.A., Toropova Ya.G., Ramsay E.S., Zhilinskaya I.N. Modulation of endothelial factors activity in human endothelial cells in influenza A(H1N1)pdm09 virus infection. *Voprosy virusologii*. 2021; 66(3): 198–210. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-48> <https://elibrary.ru/wslvbl> (in Russian)
14. Marchenko V.A., Zelinskaya I.A., Toropova Ya.G., Mukhametdinova D.V., Galagudza M.M., Lioznov D.A., et al. Duration of systemic alteration in vasomotor function of microvascular endothelium caused by the influenza A(H1N1)pdm09 virus. *Regionarnoe krovoobrashchenie i mikrotsirkulyatsiya*. 2023; 22(4): 74–86. <https://doi.org/10.24884/1682-6655-2023-22-4-74-86> <https://elibrary.ru/mmwnsf> (in Russian)
15. Roganova I.V. Comparative characteristics of cerebral circulation dysfunction in different age groups of patients with influenza virus infection. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedenii. Povolzhskii region. Meditsinskie nauki*. 2011; (1): 108–15. <https://elibrary.ru/oetud> (in Russian)
16. Boytsov S.A. Influenza, novel Coronavirus infection and cardiovascular diseases. *Kardiologicheskii vestnik*. 2021; 16(1): 5–9. <https://doi.org/10.17116/Cardiobulletin2021160115> <https://elibrary.ru/zg-vxkg> (in Russian)
17. Choudhary A., Rawat U., Kumar P., Mittal P. Pleotropic effects of statins: the dilemma of wider utilization of statin. *Egypt. Heart J.* 2023; 75(1): 1. <https://doi.org/10.1186/s43044-023-00327-8>
18. Radigan K.A., Ulrich D., Misharin A.V., Chiarella S.E., Soberanes S., Gonzalez A., et al. The effect of rosvastatin in a murine model of influenza A infection. *PLoS One*. 2012; 7(4): e35788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035788>
19. Wu F., Wang C., Li S., Ye Y., Cui M., Liu Y., et al. Association between statins administration and influenza susceptibility: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Viruses*. 2024; 16(2): 278. <https://doi.org/10.3390/v16020278>
20. Caldeira D., Alarcão J., Vaz-Carneiro A., Costa J. Risk of pneumonia associated with use of angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2012; 345: e4260. <https://doi.org/10.1136/bmj.e4260>
21. Henry C., Zaizafoun M., Stock E., Ghamande S., Arroliga A.C., White H.D. Impact of angiotensin-converting enzyme inhibitors and statins on viral pneumonia. *Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent.)*. 2018; 31(4): 419–23. <https://doi.org/10.1080/08998280.2018.1499293>
22. Srihuthorn A., Phrommintikul A., Wongcharoen W., Chaikledkaew U., Eakanunkul S., Sukonthasarn A. The modification effect of influenza vaccine on prognostic indicators for cardiovascular events after acute coronary syndrome: observations from an influenza vaccination trial. *Cardiol. Res. Pract.* 2016; 2016: 4097471. <https://doi.org/10.1155/2016/4097471>
23. Marchenko V., Zelinskaya I., Toropova Y., Shmakova T., Podyacheva E., Lioznov D., et al. Influenza A virus causes histopathological changes and impairment in functional activity of blood vessels in different vascular beds. *Viruses*. 2022; 14(2): 396. <https://doi.org/10.3390/v14020396>
24. Marchenko V., Mukhametdinova D., Amosova I., Lioznov D., Zhilinskaya I. Influenza A(H1N1)pdm09 virus alters expression of endothelial factors in pulmonary vascular endothelium in rats. *Viruses*. 2022; 14(11): 2518. <https://doi.org/10.3390/v14112518>
25. Mazza A., Townsend D.M., Torin G., Schiavon L., Camerotto A., Rigatelli G., et al. The role of sacubitril/valsartan in the treatment of chronic heart failure with reduced ejection fraction in hypertensive patients with comorbidities: From clinical trials to real-world settings. *Biomed. Pharmacother.* 2020; 130: 110596. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110596>
26. Cassano V., Armentaro G., Magurno M., Aiello V., Borrello F., Miceli S., et al. Short-term effect of sacubitril/valsartan on endothelial dysfunction and arterial stiffness in patients with chronic heart failure. *Front. Pharmacol.* 2022; 13: 1069828. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1069828>
27. Hellmann M., Dąbrowska E., Zarczyńska-Buchowiecka M., Romanowska-Kociejko M., Narkiewicz K., Gruchała M., et al. Sacubitril/valsartan improved microvascular endothelial function in a young patient with COVID-19-related mild left ventricular dysfunction. *Kardiol. Pol.* 2022; 80(5): 614–5. <https://doi.org/10.33963/kp.a2022.0063>
28. Ramakrishnan M.A. Determination of 50 % endpoint titer using a simple formula. *World J. Virol.* 2016; 5(2): 85–6. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i2.85>
29. Taylor C.R., Levenson R.M. Quantification of immunohistochemistry-issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment II. *Histopathology*. 2006; 49(4): 411–24. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02513.x>
30. Marchenko V.A., Barashkova S.V., Zelinskaya I.A., Toropova Ya.G., Sorokin E.V., Zhilinskaya I.N. Modeling influenza virus infection in mature Wistar rats. *Voprosy virusologii*. 2020; 65(3): 159–66. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-159-166> <https://elibrary.ru/ufdacp> (in Russian)
31. Janaszak-Jasiecka A., Siewkierzycka A., Płoska A., Dobrucki I.T., Kalinowski L. Endothelial dysfunction driven by hypoxia – the influence of oxygen deficiency on bioavailability. *Biomolecules*. 2021; 11(7): 982. <https://doi.org/10.3390/biom11070982>
32. Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Res. Cardiol.* 2008; 103(5): 398–406. <https://doi.org/10.1007/s00395-008-0733-0>
33. Shaito A., Aramouni K., Assaf R., Parenti A., Orekhov A., Yazbi A.E., et al. Oxidative stress-induced endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*. 2022; 27(3): 105. <https://doi.org/10.31083/j.fbl2703105>

Информация об авторах:

Марченко Владимир Александрович ✉ – канд. мед. наук, доцент кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: vmarcenco@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6870-3157>

Зелинская Ирина Александровна – научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории биопротезирования и кардиопротекции Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: irina.selinskaja@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-1971-3444>

Мухаметдинова Дарья Владимировна – лаборант-исследователь научно-исследовательской группы экспериментальной патоморфологии Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: mukh.dv@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7109-1187>

Торопова Яна Геннадьевна – д-р биол. наук, зав. научно-исследовательской лабораторией биопротезирования и кардиопротекции Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: toropova@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-1629-7868>

Галагудза Михаил Михайлович – д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: galagoudza@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5129-9944>

Жилинская Ирина Николаевна – д-р биол. наук, профессор кафедры медицинской микробиологии ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И.И. Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия. E-mail: s_zhilinskaya@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0084-1323>

Участие авторов: Марченко В.А. – проведение экспериментов на лабораторных животных, анализ и интерпретация результатов, написание и научное редактирование текста рукописи; Зелинская И.А. – проведение и обработка данных проволочной миографии, написание и научное редактирование текста рукописи; Мухаметдинова Д.В. – проведение гистологических и иммуногистохимических исследований; Торопова Я.Г., Галагудза М.М., Жилинская И.Н. – формирование концепции и дизайна работы, интерпретация результатов, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Поступила 23.06.2025
Принята в печать 20.08.2025
Опубликована 30.08.2025

Information about authors:

Vladimir A. Marchenko✉ – Ph. D. in medicine, Associate Professor of Medical Microbiology Department, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia. E-mail: vmarcenco@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6870-3157>

Irina A. Zelinskaya – Researcher of Laboratory of Bioprosthesis and Cardiac Protection, Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Institute, Saint Petersburg, Russia. E-mail: irina.selinskaja@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-1971-3444>

Darya V. Mukhametdinova – Research Assistant of Experimental Pathomorphology Group, Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Institute, Saint Petersburg, Russia. E-mail: mukh.dv@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-7109-1187>

Yana G. Toropova – Sc. D., Head of Laboratory of Bioprosthesis and Cardiac Protection, Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Institute, Saint Petersburg, Russia. E-mail: [yana.toropova@mail.ru](mailto: yana.toropova@mail.ru); <https://orcid.org/0000-0003-1629-7868>

Michael M. Galagudza – MD, Sc. D., Professor and Corresponding member of the Russian Academy of Sciences, Director of the Institute of Experimental Medicine, V.A. Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia. E-mail: galagoudza@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-5129-9944>

Irina N. Zhilinskaya – Sc. D., Professor of Medical Microbiology Department, North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov, St Petersburg, Russia. E-mail: s_zhilinskaya@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0084-1323>

Contribution: Marchenko V.A. – conducted experiments on laboratory animals, analysed and interpreted the study results, drafted and edited the manuscript; Zelinskaya I.A. – conducted and analysed results of wire myography, drafted and edited the manuscript; Mukhametdinova D.V. – conducted histological and immunohistochemistry assay; Toropova Ya.G., Galagudza M.M., Zhilinskaya I.N. – conceptualised and designed the study, interpreted the study results and approved the final version of the manuscript for publication.

Received 23 June 2025
Accepted 20 August 2025
Published 30 August 2025

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-331>

© ЧАНЫШЕВ М.Д., ЧЕРНЫШОВА А.С., ГЛУЩЕНКО А.Г., ГРИШАЕВА А.А., МАКАШОВА В.В., ПОНЕЖЕВА Ж.Б., ХАФИЗОВ К.Ф., АКИМКИН В.Г., 2025



Амплификационная панель NGS HCV-seq для таргетного секвенирования РНК вируса гепатита С (*Flaviviridae: Hepacivirus*)

Чанышев М.Д.^{1✉}, Чернышова А.С.^{1,2}, Глущенко А.Г.^{1,2}, Гришаева А.А.¹, Макашова В.В.¹, Понежева Ж.Б.¹, Хафизов К.Ф.¹, Акимкин В.Г.¹

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

²ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», 141701, г. Долгопрудный, Россия

Резюме

Введение. Гепатит С является актуальной проблемой здравоохранения во всем мире. Высокая вариабельность вируса гепатита С (ВГС) осложняет его полногеномное секвенирование, в большинстве исследований секвенированы только отдельные регионы генома. Существует необходимость в простом и надежном методе секвенирования полного генома ВГС.

Цель работы. Создание и апробация панели NGS для полногеномного секвенирования ВГС.

Материалы и методы. В работе представлена амплификационная панель NGS для секвенирования генома ВГС генотипов 1, 2 и 3. В зависимости от генотипа использован набор, состоящий из 79, 67 или 89 праймеров, при помощи которых осуществляется амплификация перекрывающихся участков генома ВГС.

Результаты. Панель была апробирована на 153 образцах РНК ВГС, выделенных из крови (93/6/54 образца генотипов 1/2/3 соответственно). Анализ энтропии Шеннона показал, что в пределах гена *E2* генетическая неоднородность значительно выше, чем в остальной части генома. Была определена частота встречаемости мутаций, ассоциированных с лекарственной резистентностью. В частности, для генотипа 1 была отмечена следующая частота встречаемости мутаций в NS3: Y56F – 37,6%, V170I – 23,7%; в NS5a: R30Q – 8,6%, P58L/S/T – 6,5%, A92T – 4,3%; в NS5b: L159F – 45,2%, S556G/N – 33,3%.

Заключение. В работе изложен способ полногеномного секвенирования генома ВГС генотипов 1, 2 и 3. Панель для секвенирования ВГС обладает большим потенциалом для использования в научных исследованиях и эпидемиологическом мониторинге.

Ключевые слова: ВГС; NGS; полногеномное секвенирование; мутации

Для цитирования: Чанышев М.Д., Чернышова А.С., Глущенко А.Г., Гришаева А.А., Макашова В.В., Понежева Ж.Б., Хафизов К.Ф., Акимкин В.Г. Амплификационная панель NGS HCV-seq для таргетного секвенирования РНК вируса гепатита С (*Flaviviridae: Hepacivirus*). *Вопросы вирусологии*. 2025; 70(4): 363–373. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-331> EDN: <https://elibrary.ru/fbgobh>

Финансирование. Исследование выполнено за счет гранта ЦНИИЭ (ЕГИСУ НИОКТР №125012900953-9).

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 Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии (Протокол № 133 от 2 марта 2023 г.).

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-331>

NGS Amplification Panel HCV-seq for Sequencing Hepatitis C Virus RNA (*Flaviviridae: Hepacivirus*)

Mikhail D. Chanyshv^{1✉}, Anastasia S. Chernyshova^{1,2}, Albina G. Glushchenko^{1,2}, Antonina A. Grishaeva¹, Vera V. Makashova¹, Zhanna B. Ponezheva¹, Kamil F. Khafizov¹, Vasily G. Akimkin¹

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

²Moscow Institute of Physics and Technology, 141701, Dolgoprudny, Russia

Abstract

Introduction. Hepatitis C is a pressing global public health issue. The high variability of the hepatitis C virus (HCV) complicates its whole-genome sequencing; most studies sequence only specific regions of the genome. There is a need for a simple and reliable method for sequencing the whole genome of HCV.

Objective. Development and validation of NGS panel for whole-genome sequencing of HCV.

Materials and methods. This study presents NGS amplification panel for sequencing the genomes of HCV genotypes 1, 2, and 3. Depending on the genotype, a set of 79, 67, or 89 primers is used. These primers enable amplification of overlapping regions of the HCV genome.

Results. The panel was tested on 153 HCV RNA samples isolated from blood plasma specimens (93/6/54 samples of genotypes 1/2/3, respectively). Shannon entropy analysis showed that genetic heterogeneity within the E2 gene is significantly higher than in other parts of viral genome. The frequency of mutations associated with drug resistance was determined. Specifically, for genotype 1, the following mutation detection rates were observed in NS3: Y56F – 37.6%, V170I – 23.7%; in NS5a: R30Q – 8.6%, P58L/S/T – 6.5%, A92T – 4.3%; in NS5b: L159F – 45.2%, S556G/N – 33.3%.

Conclusion. The current study describes a method for whole-genome sequencing of HCV genotypes 1, 2, and 3. The HCV sequencing panel shows great potential for use in scientific research and epidemiological monitoring.

Keywords: HCV; NGS; whole-genome sequencing; mutations

For citation: Chanyshv M.D., Chernyshova A.S., Glushchenko A.G., Grishaeva A.A., Makashova V.V., Ponezheva Zh.B., Khafizov K.F., Akimkin V.G. NGS Amplification Panel HCV-seq for Sequencing Hepatitis C Virus RNA (*Flaviviridae: Hepacivirus*). *Problems of Virology (Voprosy Virosoologii)*. 2025; 70(4): 363–373.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-331> EDN: <https://elibrary.ru/fbgobh>

Funding. The study was funded by a grant from the Central Research Institute of Epidemiology (EGISU R&D №125012900953-9).

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

Ethical Statement. The study was conducted with informed consent from patients. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Central Research Institute of Epidemiology (Protocol 133 dated March 2, 2023).

Введение

Вирусный гепатит С представляет собой серьезную проблему для здравоохранения как в России, так и во всем мире. По оценкам Всемирной организации здравоохранения, в 2022 г. в мире было зарегистрировано около 50 млн человек, страдающих хроническим гепатитом С (ХГС), и 1,0 млн новых случаев инфицирования. В 2020 г. в России было зарегистрировано 24,5 тыс. пациентов с диагнозом ХГС, а уровень заболеваемости составил 16,7 на 100 тыс. человек [1]. По состоянию на 2024 г. предположительно 2,9% населения Российской Федерации инфицированы вирусом гепатита С (ВГС). В среднем у 70% инфицированных развивается хроническая форма заболевания, способная привести к циррозу печени (ЦП) и гепатоцеллюлярной карциноме (ГЦК). Согласно результатам анализа заболеваемости, распространенности и смертности ВГС, в 2015 г. было зарегистрировано 16 427 летальных исходов в результате осложнений ХГС в России [2].

Возбудителем заболевания является РНК-содержащий вирус из семейства *Flaviviridae* (*Flaviviridae: Hepacivirus: Hepacivirus hominis*). Геном ВГС представлен одноцепочечной РНК и демонстрирует высокую вариабельность. Известно 7 основных генотипов ВГС, различия нуклеотидных последовательностей между генотипами составляют 30–35%. Частота встречаемости генотипов отличается для разных регионов мира: генотип 1 преобладает в Европе, Северной и Южной Америке, генотип 3 – в Индии и ряде стран Юго-Восточной Азии. На территории РФ практически все типированные образцы относятся к генотипу 1 (примерно 70% случаев), 2 (~ 5%) и 3 (~ 20%) [3, 4].

Многочисленные исследования показывают, что различные генетические варианты ВГС и мутации в разных участках вирусного генома могут быть связаны с клиническими особенностями течения заболевания и его исходами, а также резистентностью к терапии. Например, отмечалось, что генотип

1b характеризовался высоким риском ЦП и ГЦК [5]. Аминокислотные замены, обуславливающие лекарственную устойчивость ВГС, расположены преимущественно в генах, кодирующих вирусные ферменты, таких как *NS3*, *NS5a* и *NS5b* [6]. Устойчивые к ВГС варианты встречаются у большинства пациентов, не достигших устойчивого вирусологического ответа, из-за отбора и роста устойчивых к ВГС вариантов в организме конкретного носителя. Эти мутации, связанные с устойчивостью, зависят от класса используемых противовирусных препаратов прямого действия (ПППД), а также варьируются в зависимости от генотипа и подтипа ВГС [7]. Представляют интерес и другие регионы вирусного генома. Делеция в *NS2* может быть ассоциирована с ЦП [8]. В исследовании S. Fishman и соавт. мутации в core 36G/C, 209A, 271U/C, 309A/C, 435A/C, 481A и 546A/C были связаны с высоким риском ГЦК [9].

В большинстве исследований, включающих секвенирование РНК ВГС, определяли отдельные регионы вирусного генома [9–11]. На настоящий момент опубликовано небольшое число работ, в которых был определен полный геном ВГС, что может быть связано с высокой генетической вариабельностью этого вируса. Так, одна из работ за 2019 г. включала всего 2 образца и представляла собой первые полные прочтения ВГС на территории Латинской Америки. В ходе работы был использован метод вложенной полимеразной цепной реакции (ПЦР) (nested PCR) с последующим секвенированием амплифицированных участков по Сэнгеру [12]. Похожий подход для амплификации был использован в работе для сравнения чувствительности секвенирования полногеномных геномов ВГС на платформах PacBio и Illumina для обнаружения низкочастотных мутаций [13]. Аналогичная пробоподготовка и секвенирование на Illumina MiSeq были произведены для 88 образцов с целью получения данных о распределении генотипов в лондонской выборке [14].

В России секвенирование ВГС проводится преимущественно для определения вирусного генотипа, анализируются лишь отдельные гены ферментов методом секвенирования по Сэнгеру. Например, В.О. Котова и соавт. определяли нуклеотидную последовательность гена *NS5b* в 60 образцах ВГС [15]. В работе Д.Э. Рейнгардт и соавт. были секвенированы гены *NS3*, *NS5a*, *NS5b* в 31 образце [16]. В.А. Исаков и соавт. анализировали встречаемость замен в генах *NS3*, *NS5a*, *NS5b*, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, в образцах российской популяции, при этом секвенирование на базе Illumina MiSeq выполнялось в США [17]. По нашим оценкам, на сегодняшний день в мире существует крайне ограниченное число работ, в которых авторы секвенировали полный геном ВГС с помощью NGS. На территории Российской Федерации такие публикации нами не были обнаружены.

Цель работы – разработать амплификационную панель NGS для полногеномного секвенирования ВГС генотипов 1, 2 и 3 и провести ее тестирование.

Материалы и методы

Образцы

Для работы были отобраны 153 образца плазмы крови, полученных от участников клинического исследования (протокол № 133 от 2 марта 2023 г. ЛЭК ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) с ВГС. Все участники исследования предоставили добровольное информированное согласие на использование образцов. РНК ВГС выделяли из плазмы при помощи набора «РИБО-преп» («АмплиСенс», Россия). Наличие РНК ВГС и генотип определяли с использованием набора реагентов «HCV-Monitor-FL» и «АмплиСенс HCV-1/2/3-FL» («АмплиСенс», Россия). Из них 93 образца были определены как генотип 1, 6 – как генотип 2, 54 – как генотип 3.

Подбор праймеров

Выполненный биоинформатический анализ показал невозможность подбора универсальных праймерных последовательностей для полногеномной амплификации ВГС одновременно для всех трех основных генотипов вируса, циркулирующих в России. В то же время возможно подобрать три набора праймеров, которые были бы применимы для каждого из трех генотипов по отдельности. Для каждого генотипа праймеры подбирали в полуавтоматическом режиме, как было описано ранее для разработки амплификационной панели для секвенирования генома ВГС [18]. В результате были подобраны 79/67/89 праймеров для генотипов 1/2/3 соответственно. Три контрольных образца, соответствующие генотипам 1, 2 и 3 ВГС (HCV1_01, HCV2_01, HCV3_01), были последовательно секвенированы несколько раз, в результате были подобраны оптимальные условия ПЦР и концентрация каждого праймера в реакционной смеси. Праймерные последовательности приведены в **табл. S1**, представленной в дополнительных материалах.

Секвенирование ВГС

Для обратной транскрипции использовали набор «РЕВЕРТА-Л» («АмплиСенс», Россия). Для амплификации генома ВГС использовали три набора праймеров, каждый соответствовал генотипу 1, 2 или 3. Генотипы образцов были определены заранее. Для каждого образца осуществляли 5 отдельных мультиплексных ПЦР, каждая реакция содержала 10 мкл комплементарной ДНК (кДНК), 10 мкл смеси для ПЦР PCR-mix-2-blue («АмплиСенс», Россия), 1,4 мкл dNTP 4,4 mM («АмплиСенс», Россия), праймеры одного из 5 пулов и воду mQ в конечном объеме 25 мкл. Таблица S1 в дополнительных материалах содержит информацию о нуклеотидной последовательности, концентрации в реакционной смеси и номере пула для каждого праймера. Стадии ПЦР: 1) 95 °C 3 мин; 2) 20 циклов: 95 °C 30 с, 55 °C 30 с, 72 °C 40 с; 3) 72 °C 3 мин. Далее продукты 5 параллельных реакций ПЦР смешивали по 5 мкл и производили их очистку при помощи AMPure XP Beads (Beckman Coulter, США), соотношение AMPure XP Beads/продукт ПЦР как 0,8 : 1.

Затем осуществляли ПЦР-индексацию, каждая реакция содержала 5 мкл очищенных продуктов ПЦР, 10 мкл смеси для ПЦР PCR-mix-2-blue («АмплиСенс», Россия), 1,4 мкл dNTP 4,4 mM («АмплиСенс», Россия), стандартные адаптеры Nextera index (концентрация в реакционной смеси 200 нМ) и воду mQ в конечном объеме 25 мкл. Стадии ПЦР: 1) 95 °C 3 мин; 2) 25 циклов: 95 °C 20 с, 55 °C 30 с, 72 °C 40 с; 3) 72 °C 3 мин. Индексированные продукты ПЦР смешивали и далее производили их очистку при помощи AMPure XP Beads 0,8/1. Для измерения концентрации полученной библиотеки использовали Qubit dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, США). Секвенирование осуществляли с использованием набора MiSeq v. 3 (600 циклов) на Illumina MiSeq.

Биоинформатика

Для оценки качества полученных прочтений использовали программу FastQC. Адаптерные последовательности удаляли с помощью программы Trimmomatic. Для удаления праймерных последовательностей применяли программу Cutadapt. Обработанные таким образом прочтения картировали на соответствующие референсы (M58335.1/NC_009823.1/D17763.1 для генотипов 1/2/3) при помощи программы BWA-MEM. Консенсусные последовательности были получены из bam-файлов с использованием iVar. Для построения филогенетического дерева были использованы 42 референсных генома ВГС из базы данных euHCVdb, представляющих генотипы с 1-го по 7-й. Множественное выравнивание последовательностей производили с использованием MAFFT v. 7.505. Филогенетическое дерево было построено в MEGA v. 12.0.11 с использованием алгоритма присоединения соседей и укоренено при помощи метода средней точки. Визуализация выполнена с использованием программы iTOL.

Валидация панели

Для валидации HCV-seq секвенировали три контрольных образца разных генотипов (HCV1_01, HCV2_01, HCV3_01), используя альтернативный подход. Обратную транскрипцию проводили при помощи набора SuperScript IV Reverse Transcriptase (ThermoFisher, США) согласно рекомендациям производителя. Для амплификации РНК ВГС для каждого образца использовали отдельный набор праймеров (приведены в **табл. S2** в дополнительных материалах). ПЦР-смесь содержала 10 мкл матричной кДНК, 12,5 мкл Q5 High-Fidelity DNA Polymerase MasterMix 2x (NEB, США), праймеры в конечной концентрации 200 нМ и воду mQ в конечном объеме 25 мкл. Стадии ПЦР: 1) 98 °C 1 мин; 2) 40 циклов: 98 °C 10 с, 60 °C 30 с, 72 °C 2 мин; 3) 72 °C 3 мин. Продукты ПЦР были проверены при помощи электрофореза в 1% агарозном геле. Очистку продуктов ПЦР производили с использованием AMPure XP Beads в соотношении 0,5 : 1. Концентрации продуктов ПЦР определяли при помощи dsDNA HS Assay Kit (Invitrogen, США). Далее для каждого образца продукты ПЦР разводили

до 1 нг/мкл и смешивали эквимоллярно. Библиотеки для секвенирования готовили при помощи набора Nextera XT DNA (Illumina) согласно рекомендациям производителя. Секвенирование на платформе Illumina и сборку геномов осуществляли, как описано выше. Кроме того, для образца HCV2_01 (генотип 2) геномная последовательность была также подтверждена секвенированием по Сэнгеру. Результаты секвенирования образцов при помощи HCV-seq, Nextera и по Сэнгеру совпадали практически полностью. Файлы сырых прочтений NGS при помощи HCV-seq и Nextera для всех трех образцов, а также данные секвенирования по Сэнгеру образца HCV2_01 могут быть загружены по <https://doi.org/10.5281/zenodo.15846624> ссылке.

Результаты

В рамках настоящей работы было секвенировано и проанализировано 153 генома ВГС. Полученные геномы представлены в виде HCV_SAMPLES.fasta по <https://doi.org/10.5281/zenodo.15846624> ссылке. Среднее покрытие вирусного генома составило 96,2% от области, ограниченной праймерами (**рис. 1**). Глубина прочтения ампликонов для трех генотипов представлена на **рис. 2**. Неполное покрытие образцов может быть связано с высокой вариабельностью ВГС и наличием мутаций на местах посадки праймеров, а также с недостаточным количеством и качеством РНК ВГС.

Филогенетический анализ (**рис. 3**) подтвердил точное разделение всех исследованных образцов по генотипам: образцы генотипа 1 (красный), генотипа 2 (синий) и генотипа 3 (зеленый) образовали устойчивые, хорошо различимые кластеры. Все секвенированные изоляты достоверно группировались с референсными последовательностями своих генотипов, что подтверждает корректность предварительного генотипирования. При этом наблюдалась четкая кластеризация по субтипам: генотип 1 с подтипом 1b, генотип 2 с подтипами 2a и 2c, а генотип 3 с подтипом 3a.

Для оценки нуклеотидной вариабельности был проведен анализ энтропии Шеннона, отражающей степень неопределенности в распределении нуклеотидов по позициям. На **рис. 4** показаны средние значения энтропии Шеннона, рассчитанные для каждого генотипа по неперекрывающимся блокам длиной 40 нуклеотидов. Статистический анализ показал, что среднее значение энтропии Шеннона в пределах гена E2 значительно больше, чем в остальной части генома во всех трех проанализированных генотипах ВГС ($p < 0,0001$ по критерию Манна–Уитни). Это подтверждает наблюдаемый пик вариабельности в данной области особенно в 5'-регионе гена E2. Повышенная энтропия в регионах E1 и особенно E2 отражает адаптацию вируса к иммунному давлению. Известно, что область 5'-конца гена E2 кодирует N-концевой гипервариабельный регион HVR1, который связан с ускользанием от нейтрализующих антител и взаимодействием с рецепторами клетки-хозяина [19].

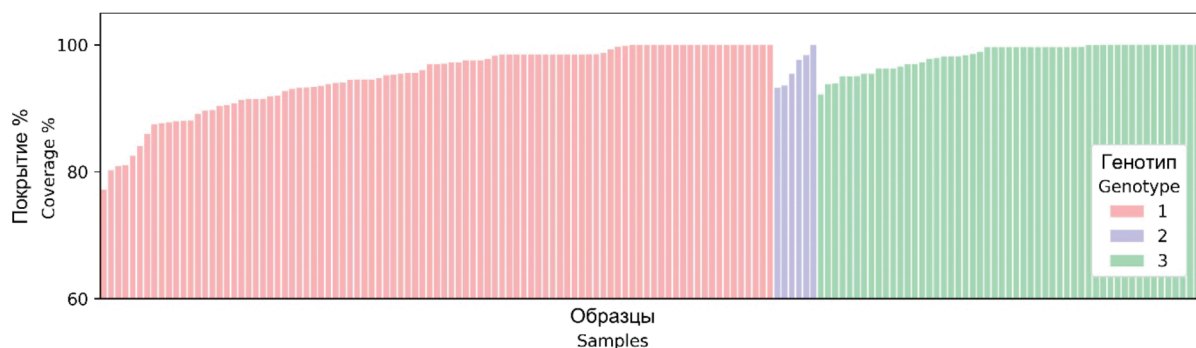


Рис. 1. Покрывтие 153 образцов.

Область генома считали прочитанной при глубине не менее 10 прочтений. Процент покрытия считали от области, ограниченной праймерами. Образцы отсортированы по проценту покрытия и генотипу.

Fig. 1. Coverage of 153 samples.

The genome region was considered as read when coverage was at least 10 reads. The coverage percentage was calculated for the region flanked by primers. Samples are sorted by coverage percentage and genotype.

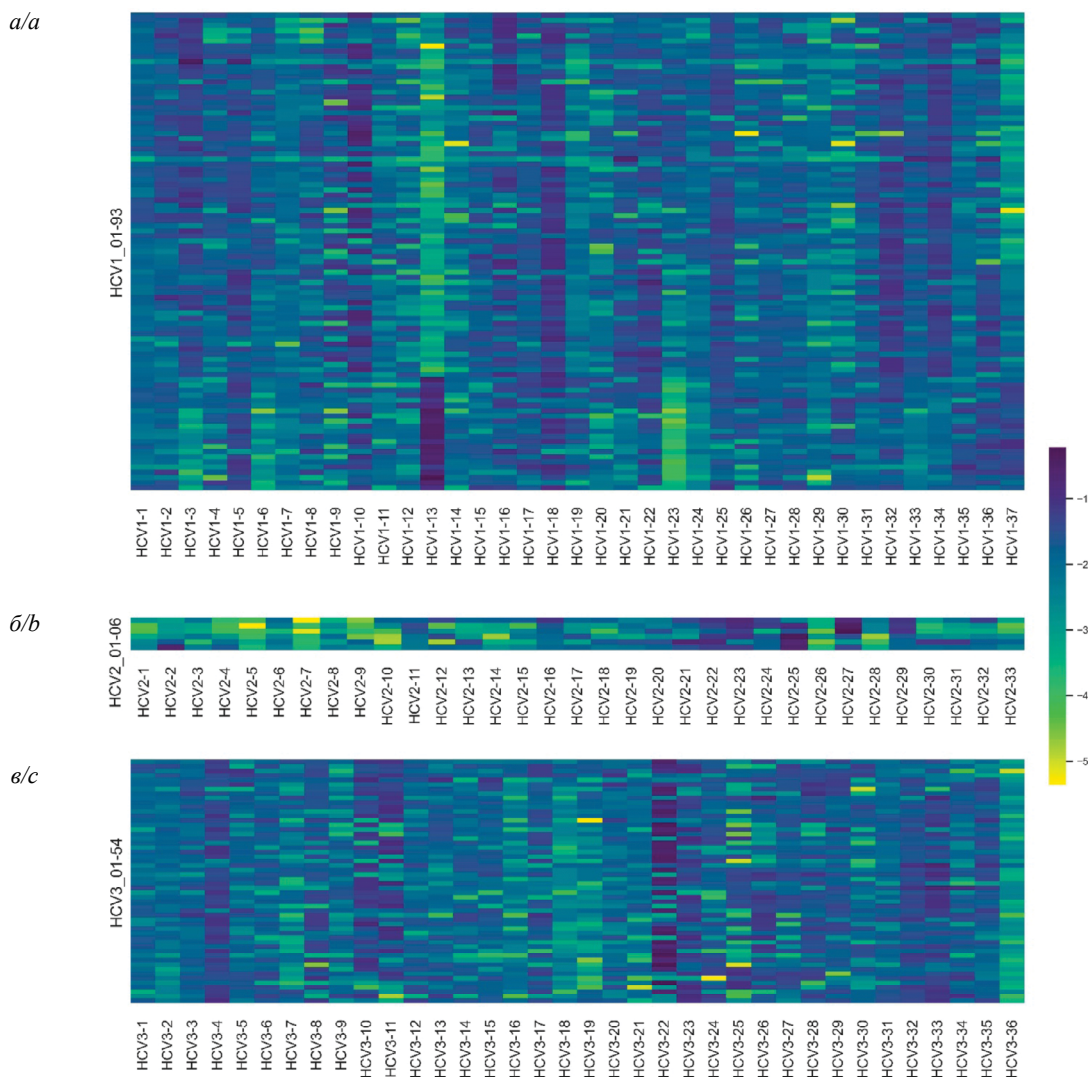


Рис. 2. Log10 глубины прочтения для каждого ампликона, нормированной на общее количество прочтений на образец.

a – генотип 1, *b* – генотип 2, *c* – генотип 3. По оси X отмечены ампликоны, по оси Y – образцы. Непрочитанные (желтые) участки единично распределены по геномам и образцам и связаны с множественными мутациями на местах отжига праймера в конкретном образце.

Fig. 2. Log10 of the reads per amplicon normalized by total reads per sample.

a – genotype 1, *b* – genotype 2, *c* – genotype 3. The X-axis shows the amplicons, the Y-axis shows the samples. Unread (yellow) regions, singly distributed across genomes and samples, are associated with multiple mutations at the primer annealing sites in a given samples.

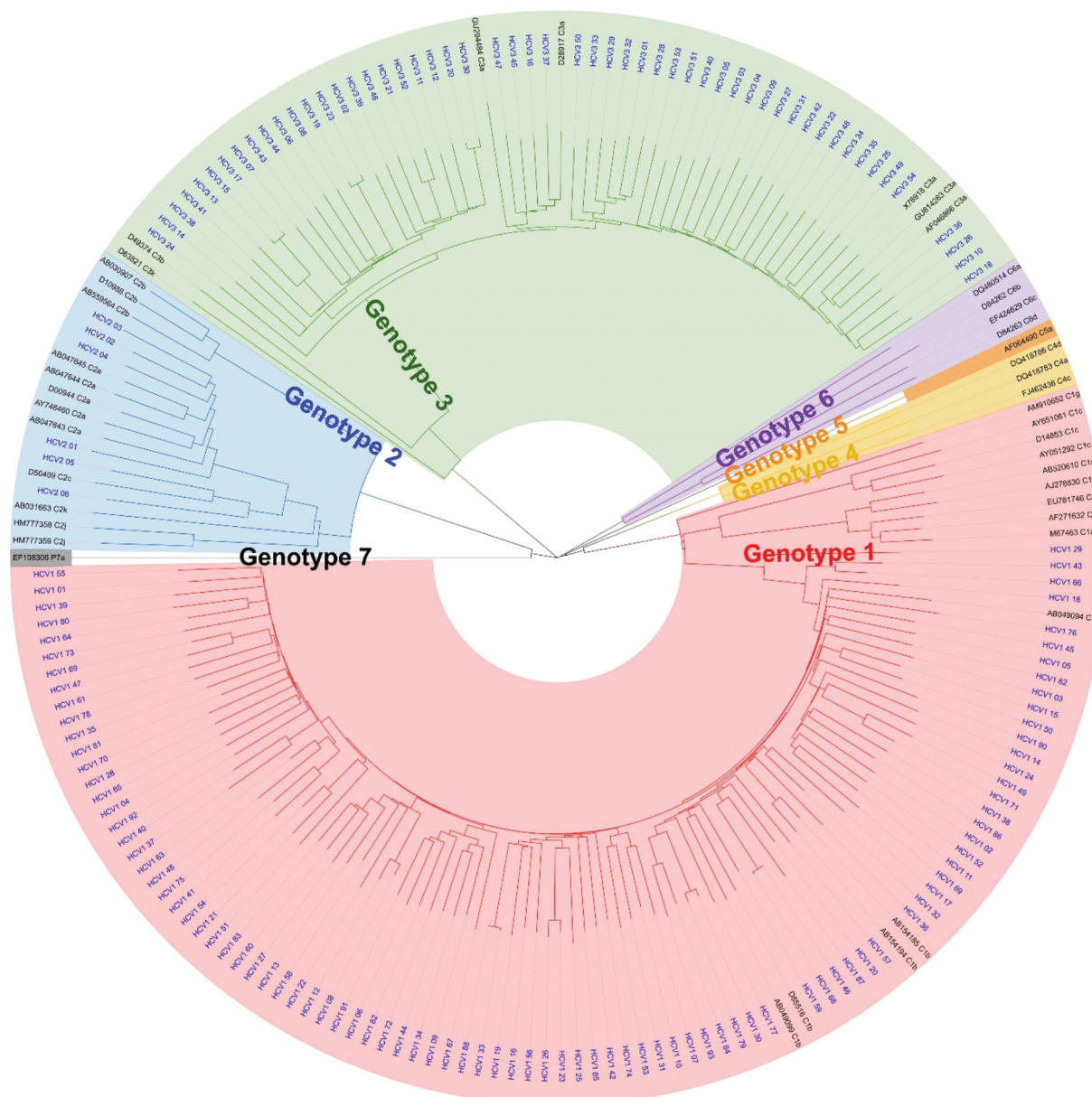


Рис. 3. Филогенетическое дерево секвенированных образцов ВГС.

Цвета генотипов соответствуют [3]. Референсные последовательности отмечены черным цветом, а секвенированные в данной работе – синим.

Fig. 3. Phylogenetic tree of sequenced HCV samples.

The genotype colors correspond to [3]. Reference sequences are labeled in black, while sequences obtained in this study are highlighted in blue.

Далее была произведена оценка встречаемости мутаций ВГС, связанных с лекарственной резистентностью. Соответствие мутаций и препаратов осуществлялось согласно работе¹. Обнаруженные мутации представлены в виде диаграммы на **рис. 5**. Для генотипа 1 была отмечена следующая частота встречаемости мутаций в NS3: Y56F – 37,6%, V170I – 23,7%; в NS5a: R30Q – 8,6%, P58L/S/T – 6,5%, A92T – 4,3%; в NS5b: L159F – 45,2%, S556G/N – 33,3%. Для образцов генотипа 2 были отмечены характерные для дан-

ного генотипа мутации – V36L и V170I в NS3, L28C/F, R30K и A92C/S в NS5a и C289M, M414Q, A553V и S556G в NS5b. Кроме того, встречались замены Y56F в NS3, L31M в NS5a и G554S в NS5b. Для образцов генотипа 3 также были выявлены характерные для данного генотипа мутации: V36L, D168Q и V170I в NS3, L28M, R30A и A92E в NS5a, C289F, A553V и S556G в NS5b. Для генотипа 3 была отмечена следующая частота встречаемости мутаций в NS5a: R30K/S/T – 14,8%, L31I – 1,9% и Y93N – 5,6%. Во всех образцах не было обнаружено мутаций резистентности к препаратам группы ингибиторов NS3/4A глекапревиру и паритапревиру. В то же время образцы ВГС

¹<https://hcv.gen2pheno.org>

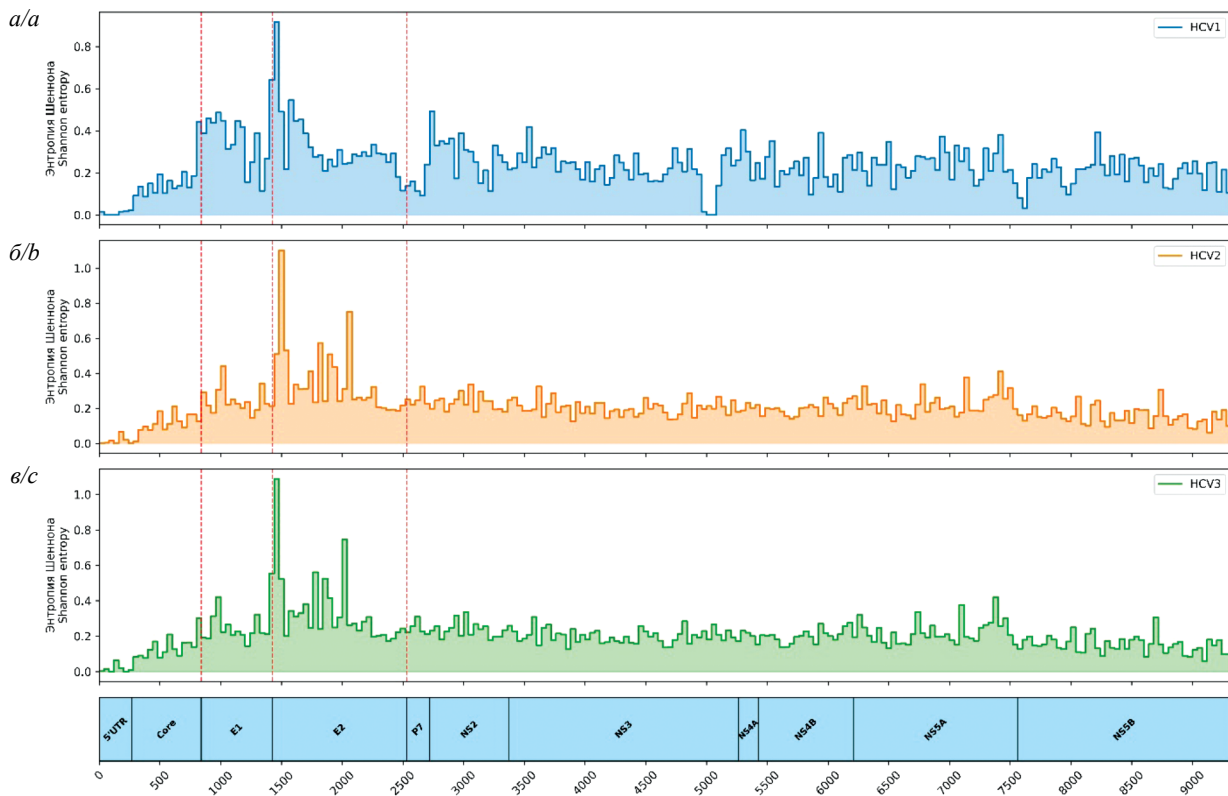


Рис. 4. Среднее значение энтропии Шеннона для неперекрывающихся участков генома длиной 40 нуклеотидов.

a – профиль энтропии Шеннона для генотипа 1, *b* – профиль энтропии Шеннона для генотипа 2, *c* – профиль энтропии Шеннона для генотипа 3, D – схематическое представление генома ВГС с обозначением границ генов. Пунктирные линии обозначают границы генов E1 и E2.

Fig. 4. Average Shannon entropy for non-overlapping 40-nucleotide regions of the genome.

a – Shannon entropy profile for genotype 1, *b* – Shannon entropy profile for genotype 2, *c* – Shannon entropy profile for genotype 3. D – Schematic representation of the HCV genome with genome region boundaries indicated. Dashed lines indicate the boundaries of the E1 and E2 regions.

генотипа 1 содержали возможные мутации резистентности к препаратам группы ингибиторов NS5A (деклатасвир, элбасвир, ледипасвир, велпатасвир), которые обнаружены в 95,7% образцов, а для группы ингибиторов NS5B (досабувир и софасбувир) частота мутаций составила 45,1%. Образцы ВГС генотипа 2 содержали возможные мутации резистентности к препаратам группы ингибиторов NS5A в 66,7% образцов, а для препаратов группы ингибиторов NS5B не были обнаружены мутации резистентности. Образцы ВГС генотипа 3 содержали возможные мутации резистентности к препаратам группы ингибиторов NS5A в 15,1% образцов, а для препаратов группы ингибиторов NS5B мутации резистентности не определялись.

Обсуждение

В настоящей работе представлен метод полногеномного секвенирования ВГС, основанный на ПЦР-обогащении сравнительно коротких ампликонов. Существует небольшое количество работ, включающих полногеномное секвенирование ВГС. В работе N. Spitz и соавт. была использована вложенная ПЦР, длина ампликонов составляла примерно 4,5 т.п.н. Далее полученные ампликоны были секвенированы по Сэнгеру с использованием внутренних прайме-

ров [12]. В исследованиях R. Bull и соавт. и D. Aisyah и соавт. праймеры были подобраны так, чтобы амплифицировать полный вирусный геном, ампликоны далее тагментировали и секвенировали на платформе Illumina [13, 14]. Следует отметить, что данный подход подразумевает получение протяженных ампликонов 4–9 т.п.н., что требует наличия достаточного количества полноразмерных копий вирусного генома в образце, в то время как многие образцы содержат фрагментированную РНК. Использование коротких ампликонов позволяет секвенировать большую часть клинических образцов. Интересно отметить, что для рутинного секвенирования миллионов геномов SARS-CoV-2 в мире использовали способы с амплификацией сравнительно коротких участков вирусного генома ARTIC и Midnight [20, 21]. Представленный в настоящей работе способ также имеет недостатки. Независимая амплификация коротких участков вирусного генома не позволяет детектировать протяженные делеции фракции вирусных геномов, которые были отмечены в работе K. Yamauchi и соавт. [8].

Полученные в настоящем исследовании данные о генотипическом разнообразии ВГС в выборке российской популяции в целом согласуются с многочисленными опубликованными результатами других научных групп. Например, в исследовании

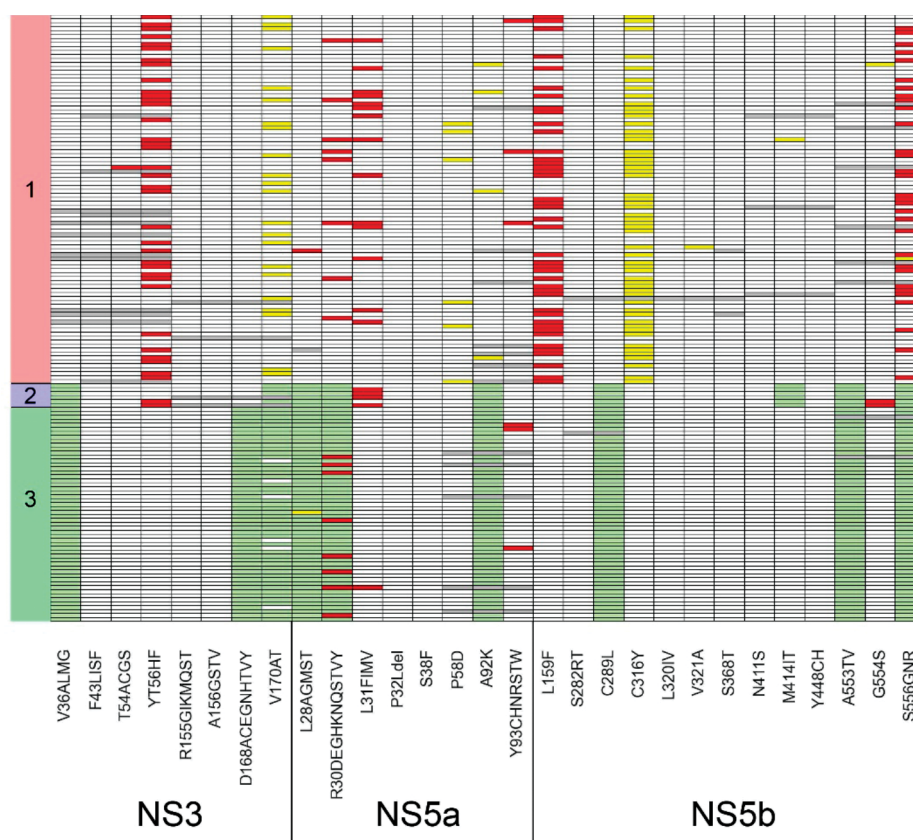


Рис. 5. Встречаемость мутаций в генах *NS3*, *NS5a*, *NS5b*, ассоциированных с резистентностью к терапии.

Серые поля представляют собой неопределенные области, белые – дикий тип, зеленые – мутации, характерные для данного генотипа, желтые – замены, не описанные в литературе, красные – мутации, описанные в литературе как мутации устойчивости к противовирусной терапии. По оси X отмечены мутации и гены, по оси Y – образцы и генотипы.

Fig. 5. The detection rates of mutations in the *NS3*, *NS5a*, and *NS5b* coding regions associated with resistance to therapy.

Gray fields represent undefined areas, white – wild type, green – mutations characteristic of the genotype, yellow – substitutions not described in the literature, and red – mutations described in the literature as mutations of resistance to antiviral therapy. The X-axis shows mutations and genome regions, the Y-axis shows samples and genotypes.

Н.Н. Пименова и соавт., проведенном на 10 107 образцах, частота встречаемости генотипов ВГС 1/2/3 на территории РФ составила 53,6, 7,6 и 35,4% случаев соответственно [4]. Частота встречаемости генотипов 1/2/3 в нашей относительно небольшой выборке из 153 образцов составила 60,8/3,9/35,3% случаев. Д.Э. Рейнгардт и соавт. определяли нуклеотидную последовательность генов *NS3*, *NS5a*, *NS5b* в 31 образце [16]. В целом набор и частота обнаруженных мутаций в их исследовании соотносятся с полученными нами результатами. Для ряда мутаций частота встречаемости в работе Д.Э. Рейнгардт и соавт. была значительно больше. Возможно, это связано с тем, что материалом исследования служил 31 образец плазмы крови от пациентов с ХГС с рецидивом заболевания на фоне терапииПППД, в то время как значительную часть нашей выборки составляли пациенты с впервые выявленным ВГС. Например, частота встречаемости *NS5a* Y93H составила 3,9% в настоящем исследовании и 41,9% в работе Д.Э. Рейнгардт и соавт.

В настоящем исследовании наибольшая частота мутаций резистентности к терапии определялась

к препаратам из группы ингибиторов белка *NS5A* ВГС. Данное наблюдение согласуется с результатами многочисленных опубликованных исследований. Так, известно, что ингибиторы белка *NS5A* ВГС наиболее подвержены формированию мутаций резистентности. Исследования показывают, что мутации в гене *NS5A* встречаются у значительной части пациентов (до 30% у наивных пациентов с генотипом 1b) [22]. Также следует отметить значительную перекрестную резистентность между доступными в настоящее время ингибиторами *NS5A* [23]. Мутации резистентности к ингибиторам *NS5A* и *NS3* часто накапливаются у пациентов без устойчивого вирусологического ответа после лечения с применением препаратов этих групп. В то же время ингибиторы *NS3/4A* и *NS5B* также используются в терапии, но частота мутаций резистентности к ним ниже. Например, ингибитор *NS5B* софосбувир обладает самым высоким барьером к резистентности и мутации к нему выявляются крайне редко. Ингибиторы *NS3/4A* могут вызывать мутации резистентности, но они менее устойчивы по сравнению с *NS5A*-ингибиторами [22]. Мутации резистентности к ингибиторам *NS5B*, по данным раз-

ных источников, обнаруживаются редко (1% случаев) даже после применения неэффективного режимаПППД, содержащего препараты из данной группы². В исследованных нами образцах не было обнаружено мутаций резистентности к препаратам из группы ингибиторов NS3/4A, мутации резистентности к препаратам из группы ингибиторов NS5B встречались только среди пациентов с генотипом 1 ВГС. Таким образом, интеграция тестирования на лекарственную устойчивость в клиническую практику может повысить эффективность лечения гепатита С. Тестирование на устойчивость, в особенности к ингибиторам NS5A, может быть рекомендовано всем пациентам, не достигшим устойчивого вирусологического ответа после применения схем терапии, содержащих препараты данной группы.

Заключение

В настоящей работе представлена амплификационная панель, позволяющая осуществлять полногеномное секвенирование генотипов 1, 2 и 3 ВГС. Панель основана на амплификации относительно коротких участков вирусного генома, что позволяет секвенировать даже высокофрагментированные образцы, и обладает большим потенциалом для научных и практических целей. Широкое применение комбинированных безинтерфероновых схем позволило достигнуть существенных успехов в лечении ВГС. Несмотря на то чтоПППД обеспечивают устойчивый вирусологический ответ более чем в 90% случаев, проблема лекарственной устойчивости становится все более актуальной. Высокая скорость размножения ВГС и низкая точность работы его РНК-полимеразы приводят к значительной генетической изменчивости вирусной популяции, что способствует быстрому появлению и отбору вариантов, устойчивых к терапии. Мониторинг лекарственной устойчивости ВГС имеет важное значение для успешного лечения пациентов с ХГС. Определение мутаций, вызывающих резистентность кПППД, позволяет подобрать наиболее эффективную схему терапии и значительно повысить шансы пациента на полное излечение.

ЛИТЕРАТУРА

- Isakov V., Nikityuk D. Elimination of HCV in Russia: Barriers and perspective. *Viruses*. 2022; 14(4): 790. <https://doi.org/10.3390/v14040790>
- Пименов Н.Н., Комарова С.В., Карандашова И.В., Цапкова Н.Н., Волчкова Е.В., Чуланов В.П. Гепатит С и его исходы в России: анализ заболеваемости, распространенности и смертности до начала программы ликвидации инфекции. *Инфекционные болезни*. 2018; 16(3): 37–45. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2018-3-37-45> <https://elibrary.ru/ysjrqt>
- Messina J.P., Humphreys I., Flaxman A., Brown A., Cooke G.S., Pybus O.G., et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2015; 61(1): 77–87. <https://doi.org/10.1002/hep.27259>
- Pimenov N., Kostyushev D., Komarova S., Fomicheva A., Urtikov A., Belaia O., et al. Epidemiology and genotype distribution of hepatitis C virus in Russia. *Pathogens*. 2022; 11(12): 1482. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121482>
- Raimondi S., Bruno S., Mondelli M.U., Maisonneuve P. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *J. Hepatol*. 2009; 50(6): 1142–54. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.01.019>
- Kalaghatgi P., Sikorski A.M., Knops E., Rupp D., Sierra S. Geno2pheno[HCV] – a Web-based interpretation system to support hepatitis C treatment decisions in the era of direct-acting antiviral agents. *PLoS One*. 2016; 11(5): e0155869. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155869>
- Ahmed A., Felmlee D.J. Mechanisms of hepatitis C viral resistance to direct acting antivirals. *Viruses*. 2015; 7(12): 6716–29. <https://doi.org/10.3390/v7122968>
- Yamauchi K., Maekawa S., Osawa L., Komiyama Y., Nakakuki N., Takada H., et al. Single-molecule sequencing of the whole HCV genome revealed envelope deletions in decompensated cirrhosis associated with NS2 and NS5A mutations. *J. Gastroenterol*. 2024; 59(11): 1021–36. <https://doi.org/10.1007/s00535-024-02146-3>
- Fishman S.L., Factor S.H., Balestrieri C., Fan X., Dibisceglie A.M., Desai S.M., et al. Mutations in the hepatitis C virus core gene are associated with advanced liver disease and hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res*. 2009; 15(9): 3205–13. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-2418>
- Costantino A., Spada E., Equestre M., Bruni R., Tritarelli E., Coppola N., et al. Naturally occurring mutations associated with resistance to HCV NS5B polymerase and NS3 protease inhibitors in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C. *J. Virol*. 2015; 12: 186. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0414-1>
- Iio E., Shimada N., Abe H., Atsukawa M., Yoshizawa K., Takaguchi K., et al. Efficacy of daclatasvir/asunaprevir according to resistance-associated variants in chronic hepatitis C with genotype 1. *J. Gastroenterol*. 2017; 52(1): 94–103. <https://doi.org/10.1007/s00535-016-1225-x>
- Spitz N., Barros J.J., do Ó K.M., Brandão-Mello C.E., Araujo N.M. The first complete genome sequences of hepatitis C virus subtype 2b from Latin America: molecular characterization and phylogeographic analysis. *Viruses*. 2019; 11(11): 1000. <https://doi.org/10.3390/v11111000>
- Bull R.A., Eltahla A.A., Rodrigo C., Koekkoek S.M., Walker M., Pirozyan M.R., et al. A method for near full-length amplification and sequencing for six hepatitis C virus genotypes. *BMC Genomics*. 2016; 17: 247. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2575-8>
- Aisyah D.N., Story A., Kremyda-Vlachou M., Kozlakidis Z., Shalcross L., Hayward A. Assessing hepatitis C virus distribution among vulnerable populations in London using whole genome sequencing: results from the TB-REACH study. *WellcomeOpenRes*. 2021; 6: 229. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.16907.1>
- Котова В.О., Балахонцева Л.А., Базыкина Е.А., Троценко О.Е., Бельды В.Н., Кирдяшова С.Е. Генетическое разнообразие вируса гепатита С среди населения Нанайского района Хабаровского края. *Инфекция и иммунитет*. 2021; 11(1): 148–56. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-GDO-1265> <https://elibrary.ru/enfery>
- Рейнгардт Д.Э., Останкова Ю.В., Лялина Л.В., Ануфриева Е.В., Семенов А.В., Тотолян А.А. Распространенность мутаций лекарственной устойчивости вируса гепатита С среди пациентов с рецидивом заболевания на терапии препаратами прямого противовирусного действия. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии*. 2023; 15(4): 86–93. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2023-15-4-86-93>
- Isakov V., Hedskog C., Wertheim J.O., Hostager R.E., Parhy B., Schneider A.B., et al. Prevalence of resistance-associated substitutions and phylogenetic analysis of hepatitis C virus infection in Russia. *Int. J. Infect. Dis*. 2021; 113: 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.09.041>
- Чанышев М.Д., Власенко Н.В., Роев Г.В., Котов И.А., Глушенко А.Г., Макашова В.В. и др. Амплификационная панель NGS для секвенирования ДНК вируса гепатита В (Hepadnaviridae: Orthohepa DNA virus). *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(1): 65–75. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-212>
- Cheng X.D., Xu H.F., Wei X.M., Zhou H.Z. Variation analysis of E1 and E2 in HCV subtypes. *Arch. Virol*. 2015; 160(10): 2479–82. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2533-9>
- Kandel S., Hartzell S.L., Ingold A.K., Turner G.A., Kennedy J.L., Ussery D.W. Genomic surveillance of SARS-CoV-2 using long-range PCR primers. *Front. Microbiol*. 2024; 15: 1272972. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1272972>

²AASLD. HCV Resistance Primer. HCV Guidance; 2022. Available at: <https://hcvguidelines.org/evaluate/resistance>

21. Koskela von Sydow A., Lindqvist C.M., Asghar N., Johansson M., Sundqvist M., Mölling P., et al. Comparison of SARS-CoV-2 whole genome sequencing using tiled amplicon enrichment and bait hybridization. *Sci. Rep.* 2023; 13(1): 6461. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33168-1>
 22. Yoshimi S., Imamura M., Murakami E., Hiraga N., Tsuge M., Kawakami Y., et al. Long term persistence of NS5A inhibitor-resistant hepatitis C virus in patients who failed daclatasvir and asunaprevir therapy. *J. Med. Virol.* 2015; 87(11): 1913–20. <https://doi.org/10.1002/jmv.24255>
 23. Wyles D.L., Luetkemeyer A.F. Understanding hepatitis C virus drug resistance: clinical implications for current and future regimens. *Top Antivir. Med.* 2017; 25(3): 103–9.
- REFERENCES**
1. Isakov V., Nikityuk D. Elimination of HCV in Russia: Barriers and perspective. *Viruses.* 2022; 14(4): 790. <https://doi.org/10.3390/v14040790>
 2. Pimenov N.N., Komarova S.V., Karandashova I.V., Tsapkova N.N., Volchkova E.V., Chulanov V.P. Hepatitis C and its outcomes in Russia: analysis of incidence, prevalence and mortality rates before the start of the programme of infection elimination. *Infectious diseases: news, opinions, training.* 2018; 16(3): 37–45. <https://doi.org/10.20953/1729-9225-2018-3-37-45> <https://elibrary.ru/ysjrqt> (in Russian)
 3. Messina J.P., Humphreys I., Flaxman A., Brown A., Cooke G.S., Pybus O.G., et al. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology.* 2015; 61(1): 77–87. <https://doi.org/10.1002/hep.27259>
 4. Pimenov N., Kostyushev D., Komarova S., Fomicheva A., Urtikov A., Belaia O., et al. Epidemiology and genotype distribution of hepatitis C virus in Russia. *Pathogens.* 2022; 11(12): 1482. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121482>
 5. Raimondi S., Bruno S., Mondelli M.U., Maisonneuve P. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis. *J. Hepatol.* 2009; 50(6): 1142–54. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.01.019>
 6. Kalaghatgi P., Sikorski A.M., Knops E., Rupp D., Sierra S. Geno2pheno[HCV] – a Web-based interpretation system to support hepatitis C treatment decisions in the era of direct-acting antiviral agents. *PLoS One.* 2016; 11(5): e0155869. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155869>
 7. Ahmed A., Felmlee D.J. Mechanisms of hepatitis C viral resistance to direct acting antivirals. *Viruses.* 2015; 7(12): 6716–29. <https://doi.org/10.3390/v7122968>
 8. Yamauchi K., Maekawa S., Osawa L., Komiyama Y., Nakakuki N., Takada H., et al. Single-molecule sequencing of the whole HCV genome revealed envelope deletions in decompensated cirrhosis associated with NS2 and NS5A mutations. *J. Gastroenterol.* 2024; 59(11): 1021–36. <https://doi.org/10.1007/s00535-024-02146-3>
 9. Fishman S.L., Factor S.H., Balestrieri C., Fan X., Dibisceglie A.M., Desai S.M., et al. Mutations in the hepatitis C virus core gene are associated with advanced liver disease and hepatocellular carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15(9): 3205–13. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-08-2418>
 10. Costantino A., Spada E., Equestre M., Bruni R., Tritarelli E., Coppola N., et al. Naturally occurring mutations associated with resistance to HCV NS5B polymerase and NS3 protease inhibitors in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C. *Virol. J.* 2015; 12: 186. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0414-1>
 11. Iio E., Shimada N., Abe H., Atsukawa M., Yoshizawa K., Takaguchi K., et al. Efficacy of daclatasvir/asunaprevir according to resistance-associated variants in chronic hepatitis C with genotype 1. *J. Gastroenterol.* 2017; 52(1): 94–103. <https://doi.org/10.1007/s00535-016-1225-x>
 12. Spitz N., Barros J.J., do Ó K.M., Brandão-Mello C.E., Araujo N.M. The first complete genome sequences of hepatitis C virus subtype 2b from Latin America: molecular characterization and phylogeographic analysis. *Viruses.* 2019; 11(11): 1000. <https://doi.org/10.3390/v11111000>
 13. Bull R.A., Eltahla A.A., Rodrigo C., Koekkoek S.M., Walker M., Pirozian M.R., et al. A method for near full-length amplification and sequencing for six hepatitis C virus genotypes. *BMC Genomics.* 2016; 17: 247. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2575-8>
 14. Aisyah D.N., Story A., Kremyda-Vlachou M., Kozlakidis Z., Shalcross L., Hayward A. Assessing hepatitis C virus distribution among vulnerable populations in London using whole genome sequencing: results from the TB-REACH study. *WellcomeOpenRes.* 2021; 6: 229. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.16907.1>
 15. Kotova V.O., Balakhontseva L.A., Bazykina E.A., Trotsenko O.E., Beldy V.N., Kiryashova S.E. Genetic diversity of hepatitis c virus in Nanaian region, Khabarovsk territory. *Infektsiya i immunitet.* 2021; 11(1): 148–56. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-GDO-1265> <https://elibrary.ru/enfery> (in Russian)
 16. Reingardt D.E., Ostankova Yu.V., Lyalina L.V., Anufrieva E.V., Semenov A.V., Totolian A.A. Distribution of hepatitis C virus drug resistance mutations among patients with recurrence of the disease during therapy with direct antiviral drugs. *VICH-infektsiya i immunosuppressii.* 2023; 15(4): 86–93. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2023-15-4-86-93> (in Russian)
 17. Isakov V., Hedskog C., Wertheim J.O., Hostager R.E., Parhy B., Schneider A.B., et al. Prevalence of resistance-associated substitutions and phylogenetic analysis of hepatitis C virus infection in Russia. *Int. J. Infect. Dis.* 2021; 113: 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.09.041>
 18. Chanyshv M.D., Vlasenko N.V., Roev G.V., Kotov I.A., Glushchenko A.G., Makashova V.V., et al. NGS amplification panel for HBV (Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus) sequencing. *Voprosy virusologii.* 2024; 69(1): 65–75. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-212> (in Russian)
 19. Cheng X.D., Xu H.F., Wei X.M., Zhou H.Z. Variation analysis of E1 and E2 in HCV subtypes. *Arch. Virol.* 2015; 160(10): 2479–82. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2533-9>
 20. Kandel S., Hartzell S.L., Ingold A.K., Turner G.A., Kennedy J.L., Ussery D.W. Genomic surveillance of SARS-CoV-2 using long-range PCR primers. *Front. Microbiol.* 2024; 15: 1272972. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1272972>
 21. Koskela von Sydow A., Lindqvist C.M., Asghar N., Johansson M., Sundqvist M., Mölling P., et al. Comparison of SARS-CoV-2 whole genome sequencing using tiled amplicon enrichment and bait hybridization. *Sci. Rep.* 2023; 13(1): 6461. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-33168-1>
 22. Yoshimi S., Imamura M., Murakami E., Hiraga N., Tsuge M., Kawakami Y., et al. Long term persistence of NS5A inhibitor-resistant hepatitis C virus in patients who failed daclatasvir and asunaprevir therapy. *J. Med. Virol.* 2015; 87(11): 1913–20. <https://doi.org/10.1002/jmv.24255>
 23. Wyles D.L., Luetkemeyer A.F. Understanding hepatitis C virus drug resistance: clinical implications for current and future regimens. *Top Antivir. Med.* 2017; 25(3): 103–9.

Информация об авторах:

Чанышев Михаил Дамирович✉ – канд. биол. наук, старший научный сотрудник Лаборатории геномных исследований ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: chanishq@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-6943-2915>

Чернышова Анастасия Сергеевна – лаборант Лаборатории геномных исследований ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: chernyshova.a@cmd.su; <https://orcid.org/0009-0000-2440-1309>

Глущенко Альбина Григорьевна – лаборант-исследователь Лаборатории геномных исследований ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: albinagluschenko@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0002-8851-8703>

Гришаева Антонина Алексеевна – канд. мед. наук, научный сотрудник Клинического отдела инфекционной патологии ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: antoninagrishaeva@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1326-9274>

Макашова Вера Васильевна – д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник Клинического отдела инфекционной патологии ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: veramakashova@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0982-3527>

Понежева Жанна Бетовна – д-р мед. наук, доцент, заведующая Клиническим отделом инфекционной патологии ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: doktorim@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6539-4878>

Хафизов Камил Фаридович – канд. биол. наук, заведующий Лабораторией геномных исследований ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: kkhafizov@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-5524-0296>

Акимкин Василий Геннадьевич – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия. E-mail: vgakimkin@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Участие авторов: Понежева Ж.Б., Акимкин В.Г. – концептуализация, обеспечение проекта; Чанышев М.Д. – методология, визуализация данных, написание статьи; Глущенко А.Г. – программное обеспечение, формальный анализ, визуализация данных; Чернышова А.С. – исследовательская работа, валидация результатов, ведение проекта; Макашова В.В. – исследовательская работа; Гришаева А.А. – курирование данных, написание статьи; Хафизов К.Ф. – формальный анализ, общее руководство проектом.

Поступила 15.07.2025

Принята в печать 26.08.2025

Опубликована 30.08.2025

Information about the authors:

Mikhail D. Chanyshv✉ – PhD, Senior Researcher, Laboratory for Genomic Research, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia. E-mail: chanishq@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-6943-2915>

Anastasia S. Chernyshova – Laboratory assistant, Laboratory for Genomic Research, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia. E-mail: chernyshova.a@cmd.su; <https://orcid.org/0009-0000-2440-1309>

Albina G. Glushchenko – Laboratory research assistant, Laboratory for Genomic Research, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia. E-mail: albinagluschenko@gmail.com; <https://orcid.org/0009-0002-8851-8703>

Antonina A. Grishaeva – PhD, Researcher of the Clinical Department of Infectious Pathology, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia. E-mail: antoninagrishaeva@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1326-9274>

Vera V. Makashova – Dr. of Sci., Leading Researcher, Clinical Department of Infectious Diseases, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia. E-mail: veramakashova@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0982-3527>

Zhanna B. Ponezheva – Dr. of Sci., Associate Professor, Head of the Clinical Department of Infectious Diseases, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia. E-mail: doktorim@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6539-4878>

Kamil F. Khafizov – PhD, Head of Laboratory for Genomic Research, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia. E-mail: kkhafizov@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0001-5524-0296>

Vasily G. Akimkin – Academician of the Russian Academy of Sciences, Dr. of Sci., Professor, Director of Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia. E-mail: vgakimkin@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Contribution: Ponezheva Zh.B., Akimkin V.G. – conceptualization, project administration; Chanyshv M.D. – methodology, visualization, writing original draft preparation; Glushchenko A.G. – software, formal analysis, visualization; Chernyshova A.S. – investigation, validation, project administration; Makashova V.V. – investigation; Grishaeva A.A. – data curation, writing original draft preparation; Khafizov K.F. – formal analysis, supervision.

Received 15 July 2025

Accepted 26 August 2025

Published 30 August 2025

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ



ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-333>

© МУХАЧЕВА А.В., БАРАНОВА Е.В., БОГРЯНЦЕВА М.П., НЕЧАЕВА Е.А., СМОЛИНА М.П., САРКИСЯН К.А., ЯНДИМИРОВА С.С., ШУБИНА Е.А., 2025

Результаты аттестации фармакопейного стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины

Мухачева А.В.^{1✉}, Баранова Е.В.¹, Богрянцева М.П.², Нечаева Е.А.², Смолина М.П.², Саркисян К.А.¹, Яндимирова С.С.¹, Шубина Е.А.¹

¹ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России, 127051, г. Москва, Россия;

²ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, Россия

Резюме

Введение. Фармакопейный стандартный образец активности, специфичности и некротической активности используется при испытаниях вакцин для профилактики оспы. В рамках аттестации фармакопейного стандартного образца была запланирована оценка возможности применения новой методики определения специфической активности, специфичности (подлинности) культуральным методом (*in vitro*) с целью испытаний вакцин для профилактики оспы, произведенных с использованием культуры клеток.

Цель работы – проведение аттестации фармакопейного стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины по основным аттестуемым характеристикам, а также оценка возможности использования новой методики определения специфической активности, специфичности (подлинности) с применением культурального метода.

Материалы и методы. Для исследования использовали фармакопейный стандартный образец Государственной фармакопеи Российской Федерации (далее – ГФ РФ) Стандартный образец активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины ФСО 3.2.00113, серия 130406 (далее – ФСО ГФ РФ 3.2.00113). С целью оценки аттестуемых характеристик применяли фармакопейные биологические методы, описанные в ГФ РФ, ФС.3.3.1.0033.15 Вакцина оспенная живая. Для определения специфической активности, специфичности (подлинности) культуральным методом применяли методику, предоставленную ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Новосибирск). Оценка статистических данных проводили в программе Microsoft Excel.

Результаты. Проведена аттестация ФСО ГФ РФ 3.2.00113. Положительным образом была оценена возможность использования новой методики определения специфической активности, специфичности (подлинности) с применением культурального метода.

Заключение. Наряду с подтверждением аттестованных характеристик была подтверждена возможность использования новой методики определения специфической активности, специфичности (подлинности) с применением культурального метода, определены основные критерии приемлемости.

Ключевые слова: специфическая активность оспенных вакцин; некротическая активность оспенных вакцин; специфичность (подлинность); культуральный метод оценки специфической активности

Для цитирования: Мухачева А.В., Баранова Е.В., Богрянцева М.П., Нечаева Е.А., Смолина М.П., Саркисян К.А., Яндимирова С.С., Шубина Е.А. Результаты аттестации фармакопейного стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины. *Вопросы вирусологии*. 2025; 70(4): 374–387. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-333> EDN: <https://elibrary.ru/ellalg>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-25-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР124022200103-5).

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

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-333>

The results of certification of Pharmacopoeial standard for smallpox vaccine

Anastasia V. Muhacheva^{1✉}, Ekaterina V. Baranova¹, Marina P. Bogyantseva²,
Elena A. Nechaeva², Margarita P. Smolina², Karine A. Sarkisyan¹,
Snezhana S. Jandimirova¹, Elena A. Shubina¹,

¹Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 127051, Moscow, Russia;

²State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being, 630559, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia

Abstract

Introduction. Pharmacopoeial standard of activity, specificity and necrotic activity is used in testing of for smallpox vaccines. As a part of standard certification, an opportunity of using Pharmacopoeial standard for smallpox vaccine on new cell culture method (*in vitro*) for testing a new generation of smallpox vaccines was also defined.

The aim – certification of the Pharmacopoeial standard for smallpox vaccine to the main certified characteristics and defining an opportunity for using Pharmacopoeial standard for smallpox vaccine on new cell culture method (*in vitro*).

Materials and methods. Pharmacopoeial standard for smallpox vaccine (FSO 3.2.00113, series 130406) and pharmacopoeial biological methods described in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (S.Ph), the monograph 3.3.1.0033.15 Smallpox vaccine live were used in the study. For cell culture method, the technique from State Research Centre of Virology and Biotechnology «Vector» of the Federal Service for Surveillance in Consumer Rights Protection and Human Well-being, Novosibirsk Region, Koltsovo, Russian Federation was used. Statistical data were evaluated using Microsoft Excel software.

Results. The Pharmacopoeial standard for smallpox vaccine (FSO 3.2.00113) was certified. The possibility of using a new method of determining specific activity, specificity (identification) using the culture method was confirmed.

Conclusion. Along with the confirmation of certified characteristics, the possibility of using a new methodology for determining specific activity, specificity (identification) using the culture method was confirmed, and the main acceptance criteria were determined.

Keywords: *specific activity of smallpox vaccines; necrotic activity of smallpox vaccines; specificity (identification); cell culture method for specific activity*

For citation: Muhacheva A.V., Baranova E.V., Bogyantseva M.P., Nechaeva E.A., Smolina M.P., Sarkisyan K.A., Jandimirova S.S., Shubina E.A. The results of certification of Pharmacopoeial standard for smallpox vaccine. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2025; 70(4): 374–387. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-333>
EDN: <https://elibrary.ru/ellalg>

Funding. This work was conducted within the framework of the State assignment of Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products No № 056-00001-25-00 for conducting applied research (Agreement No 124022200103-5).

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

Введение

Фармакопейный стандартный образец активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины, серия 130406 (далее – ФСО ГФ РФ 3.2.00113) применяется для контроля специфической активности, специфичности (подлинности), некротической активности и термостабильности живых оспенных вакцин биологическими методами, а также для подтверждения подлинности, антигенной активности и специфической безопасности инактивированной оспенной вакцины биологическими методами. Материал стандартного образца представляет собой производственную серию лекарственного препарата «Вакцина оспенная живая, лиофилизат для приготовления раствора для

внутрикожного введения и накожного скарификационного нанесения», серия 130406, производство акционерного общества «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген» (АО «НПО «Микроген»). Серия препарата была произведена в 2006 г., впервые аттестована в 2007 г., успешно проходила аттестацию с целью продления срока годности в 2012, 2015, 2018 и 2021 гг. (дата продления срока годности – 31.12.2021, годен до 31.12.2024). Аттестация ФСО ГФ РФ 3.2.00113 биологическими методами была подробно описана нами ранее в научных публикациях [1]. Методики аттестации являются фармакопейными и указаны в требованиях ГФ РФ, ФС.3.3.1.0033.15 Вакцина оспенная живая и ГФ РФ, ФС.3.3.1.0034.15 Вакцина оспенная инак-

тивированная^{1,2}. По итогам аттестации в 2021 г. серия 130406 приобрела статус фармакопейного стандартного образца, которому был присвоен номер ФСО ГФ РФ 3.2.00113 (ОСО 42-28-113). Необходимо отметить, что при аттестации по показателю «Специфическая активность» ФСО ГФ РФ 3.2.00113 используется 1 Международный стандартный образец оспенной вакцины, впервые аттестованный в 1962 г. (далее – МСО)³.

На сегодняшний день в РФ зарегистрирована культуральная вакцина нового поколения «ОртопоксВак Вакцина для профилактики натуральной оспы и других ортопоксвирусных инфекций на основе вируса осповакцины живая культуральная» (далее – «ОртопоксВак») [2]. Современные требования к качеству таких вакцин, которые отражены в п. 4.6. главы 30 Решения Коллегии Евразийской экономической комиссии № 89⁵ и тенденции к переходу с методов контроля на животных (*in vivo*) на методы *in vitro*, в соответствии с п. 2.3.1.8 Решения Коллегии Евразийской экономической комиссии № 100 (в ред. от 25.06.2024 № 75)⁶, диктуют необходимость применения культурального метода для оценки «Специфичности (подлинности)» и «Специфической активности» оспенных вакцин нового поколения.

Цель работы – проведение аттестации ФСО ГФ РФ 3.2.00113 по основным аттестуемым характеристикам, а также оценка возможности использования новой методики определения специфической активности, специфичности (подлинности) с применением культурального метода.

¹Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. ФС.3.3.1.0033.15 Вакцина оспенная живая. Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/3/3-3-3-1/vaktsina-ospennaya-zhivaya/>

²Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. ФС.3.3.1.0034.15 Вакцина оспенная инактивированная. Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-14/3/3-3-3-1/vaktsina-ospennaya-inaktivirovannaya/>

³Всемирная организация здравоохранения. Международный стандартный образец оспенной вакцины. Код по каталогу NIBSC: SMV. Инструкция по применению (Версия 4.0, от 18/03/2008). Доступно по: https://nibsc.org/products/brm_product_catalogue/detail_page.aspx?catid=SMV

⁴Государственный реестр лекарственных средств. Доступно по: https://grls.minzdrav.gov.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=da624460-36a0-47be-bf46-850be407fc42

⁵Коллегия Евразийской экономической комиссии. Решение от 3 ноября 2016 года № 89. «Об утверждении правил исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» (с изменениями на 22 января 2025 года). Доступно по: <https://docs.cntd.ru/document/456026116>

⁶Коллегия Евразийской экономической комиссии. Решение от 11 августа 2020 г. № 100 «О Фармакопее Евразийского экономического союза». (в редакции Решений Коллегии Евразийской экономической комиссии от 25.10.2022 № 10, от 25.06.2024 № 75). Доступно по: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_359911/

Материалы и методы

Объектом исследования являлся ФСО ГФ РФ 3.2.00113. В качестве стандартного образца использовали МСО (NIBSC, каталожный номер SMV).

Оценку показателей «Специфическая активность», «Специфичность (подлинность)», «Некротическая активность» проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ, ФС. 3.3.1.0033.15 Вакцина оспенная живая, раздел «Специфическая активность»².

При оценке возможности аттестации ФСО ГФ РФ 3.2.00113 культуральным методом по показателям «Специфическая активность» и «Специфичности (подлинности)» применяли методику, предоставленную ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Новосибирск). При испытаниях использовали 2 паспортизированные культуры клеток:

- культуру клеток 4647 – коллекционный шифр 184. Линия клеток получена в 1974 г. Л.Л. Мироновой в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова РАН из почки африканской зеленой марьши. Приобретена из коллекции культур ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора;
- культуру клеток Vero. Номер в коллекции ATCC – CCL 81. Номер лота: 58954145.

Выбор культур клеток был обусловлен тем, что культуральная вакцина «ОртопоксВак» производится с использованием в качестве субстрата культуры клеток 4647. Применение второй культуры клеток Vero обусловлено необходимостью проверки устойчивости методики.

При исследовании использовали паспортизированные питательные среды, сыворотки крови плодов коровы, растворы для работы с культурами клеток коммерческого производства. Работу с культурами клеток проводили в асептических условиях в соответствии с общепринятыми правилами, а также с соблюдением требований Санитарных правил и норм СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Составы сред и растворов (приготовление проводили непосредственно перед использованием в асептических условиях)

Среда для получения суспензии клеток (среда для снятия клеточного монослоя):

- 0,25% раствор трипсина – 1 часть (1/3);
- 0,02% раствор версена – 2 части (2/3).

Или применяли готовый раствор трипсина-версена стерильный, коммерческого производства.

В качестве питательной среды для культивирования клеток (ростовая питательная среда) в разных циклах испытаний последовательно применяли 3 различных наименования питательных сред, а именно: питательную среду ДЕМ, или питательную среду Игла MEM с L-глутамином, или питательную среду RPMI-1640 с L-глутамином. К каждой питательной среде добавляли 5–10% сыворотки крови плодов коровы и растворы антибиотиков (гентамицин или пенициллин-стрептомицин) в рабочих концентрациях. В качестве поддер-

живающей питательной среды применяли аналогичные наименования питательных сред со сниженным содержанием сыворотки крови плодов коровы (2–5%).

Определение показателей «Специфическая активность» и «Специфичность (подлинность)» (проводилось 3 исполнителями и состояло из нескольких этапов)

1. Подготовка планшетов с культурой клеток

Культуру клеток Vero и 4647 выращивали в культуральных флаконах в CO_2 -инкубаторе с 5% содержанием углекислого газа при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24–48 ч до образования клеточного монослоя. Для культивирования применяли ростовые питательные среды, описанные выше.

Для снятия клеток с поверхности культуральных флаконов использовали подогретую до $37 \pm 1^\circ\text{C}$ смесь 0,25% раствора трипсина и 0,02% раствора версена, выдерживали клетки при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ до состояния набухания, удаляли смесь диспергирующего раствора трипсина-версена и добавляли в культуральный флакон около 50 мл ростовой питательной среды. Получали клеточную суспензию в растворе ростовой питательной среды и затем проводили подсчет клеток в автоматическом счетчике клеток производства фирмы Biorad.

Посевная концентрация клеточной суспензии в опытах составляла 250–500 тыс. клеток в 1 мл. Суспензию клеток разливали в 6-луночные планшеты, после чего проводили инкубацию в CO_2 -инкубаторе с 5% содержанием углекислого газа при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 24–48 ч до образования клеточного монослоя.

2. Приготовление разведений образцов ФСО ГФ РФ 3.2.00113

С целью отработки методики и сравнения полученных результатов применяли 2 способа восстановления образцов:

- 1-й способ – 1 ампулу образца восстанавливали в 2,0 мл поддерживающей питательной среды, получая разведение 10^{-1} , после чего проводили последовательное приготовление 10-кратных разведений от 10^{-2} до 10^{-8} (восстановление и приготовление разведений в соответствии с требованиями раздела «Специфическая активность» ГФ РФ, ФС. 3.3.1.0033.15 Вакцина оспенная живая);
- 2-й способ – 1 ампулу образца восстанавливали в 1,0 мл поддерживающей питательной среды, получая предварительное разведение 10^{-0} , после чего проводили последовательное приготовление 10-кратных разведений от 10^{-1} до 10^{-8} .

Количество 10-кратных разведений варьировалось в зависимости от результатов, получаемых при исследованиях.

3. Инфицирование культур клеток Vero и 4647 разведениями ФСО ГФ РФ 3.2.00113

Из 6-луночных планшетов со сформированным клеточным монослоем аккуратно удаляли ростовую питательную среду и в каждые 3 лунки (ряд)

вносили не менее 2–3 10-кратных разведений ФСО (10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} или 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}) в объеме 0,1 мл или 0,3 мл. Количество и разведения для инфицирования культур клеток зависели от целей того или иного этапа испытаний. В качестве отрицательного контрольного образца в каждом опыте использовали 3 лунки с незараженным монослоем культуры клеток, в которые вносили 0,1 или 0,3 мл поддерживающей питательной среды.

Планшеты с инфицированными культурами клеток выдерживали в CO_2 -инкубаторе при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 60 мин для адсорбции вируса.

Затем добавляли по 2,0 мл в каждую лунку 6-луночных планшетов поддерживающей питательной среды и продолжали инкубацию в CO_2 -инкубаторе при температуре $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 48–72 ч.

4. Учет результатов

Учет результатов проводили через 48–72 ч визуальным способом после окрашивания инфицированного клеточного монослоя, для этого аккуратно удаляли содержимое лунок в контейнер с дезинфицирующим раствором, инфицированный клеточный монослой фиксировали и окрашивали 0,2% спиртовым раствором кристаллического фиолетового с формальдегидом. Через 10–15 мин краситель удаляли, а культуральный планшет с окрашенным монослоем подсушивали. Подсчитывали количество специфических образований – бляшек (очагов разрушенного монослоя клеток округлой формы в виде белых пятен на синем фоне) в монослое культуры клеток. Затем вычисляли среднее арифметическое количество (В) бляшек в лунках, инфицированных разведением, вызвавшим образование не менее 5–10 бляшек. Вычисляли количество БОЕ/мл по формуле:

$$A = \frac{B}{C \times d}, \quad [1]$$

где: А – специфическая активность, БОЕ/мл; В – среднее арифметическое количество бляшек в монослое культуры клеток; С – разведение вируса; d – объем инокулята (мл).

При расчетах учитывали разведения препарата, в котором происходило образование не менее 5–10 бляшек на монослое клеток.

В случае внесения в лунку 0,3 мл разведения среднего результата, полученный в 3 лунках, делили на 3 или учитывали в формуле расчета.

Пример расчета:

$$A = \frac{11}{10^{-6} \times 0,1} = 1,0 \times 10^8 \text{ БОЕ/мл}$$

Специфическая активность составляет $1,0 \times 10^8$ БОЕ/мл.

Основные критерии приемлемости:

- 1) в отрицательном контроле не должно происходить образование специфических образований – бляшек;
- 2) в учитываемом для расчета разведении должно наблюдаться образование не менее 5–10 специфических образований – бляшек.

Исследование по оценке возможности проведения испытаний ФСО ГФ РФ 3.2.00113 культуральным методом (включало в себя несколько этапов)

1. *Проведение предварительного исследования.* При предварительном исследовании оценивали возможность формирования специфических образований – бляшек, подбирали способ восстановления ФСО ГФ РФ 3.2.00113 и определяли 10-кратные разведения с целью оценки показателя «Специфическая активность» и «Специфичность (подлинность)».

2. *Проведение исследования ФСО ГФ РФ 3.2.00113 с одновременным применением МСО.* Приготовление разведений в этом исследовании осуществлял 1 исполнитель в соответствии с требованиями инструкции по применению³.

3. *Оценка возможности проведения аттестации ФСО ГФ РФ 3.2.00113 культуральным методом.* На данном этапе исследование было разделено на 3 основных этапа (аналитических цикла), выполнение каждого этапа проводилось каждым из 3 исполнителей. При испытаниях использовали различные способы восстановления образцов, разные составы ростовых и поддерживающих питательных сред, применение разных объемов разведений ФСО для инфицирования клеточного монослоя.

Статистическую обработку данных проводили на персональном компьютере в Windows 7 с использованием редактора Microsoft Office Excel (Microsoft, США).

Результаты

При аттестации ФСО ГФ РФ 3.2.00113 с применением фармакопейных методик были получены следующие результаты:

а) специфическая активность – на хорионаллантоисной оболочке (ХАО) куриных эмбрионов: $3,8 \pm 2,5 \times 10^8$ оспообразующих единиц на 1 мл (ООЕ/мл);

б) специфичность (подлинность):

– при нанесении на скарифицированную кожу кроликов дозы 10^4 ООЕ/0,1 мл образуются типичные оспины;

– на ХАО 12-дневных куриных эмбрионов образуются белые плотные поражения диаметром от 0,5 до 3 мм;

в) некротическая активность – при внутрикожном введении кроликам дозы, равной 10^4 ООЕ/0,1 мл, некрозы отсутствуют.

Потеря в массе при высушивании составила 1,24%, рН – 6,99; средняя масса – $0,0106 \pm 0,0004$ г, коэффициент вариации массы – 3,80%; термостабильность – не менее 1×10^8 ООЕ/мл.

На основании полученных результатов аттестованных характеристик и дополнительных сведений для ФСО 3.2.00113 был установлен срок годности 1 год – до 31.12.2025.

Результаты оценки возможности испытания ФСО ГФ РФ 3.2.00113 по показателям «Специфичность (подлинность)» и «Специфическая активность» культуральным методом

Предварительное исследование проводилось каждым из 3 исполнителей. В качестве ростовой и под-

держивающей питательных сред была использована среда Игла МЕМ с двойным набором аминокислот и стабильным L-глутамином с добавлением сыворотки крови плодов коровы и антибиотиков в рабочих концентрациях на двух культурах клеток Vero и 4647. Испытанию подвергались образцы ФСО ГФ РФ 3.2.00113. Каждую из ампул исследуемых образцов исполнитель растворял в 2,0 мл поддерживающей питательной среды для получения разведения 10^{-1} , после чего проводил приготовление последовательных 10-кратных разведений в соответствии с требованиями ГФ РФ, ФС.3.3.1.0033.15 Вакцина оспенная живая, раздел «специфическая активность».

После удаления из 6-луночных планшетов с культурами клеток Vero и 4647 ростовой питательной среды, каждый исполнитель инфицировал по 1 ряду (3 лунки) разведениями 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} в объеме 100 мкл на 1 лунку. В пустые лунки, в которые не вносили разведения ФСО, добавляли 100 мкл поддерживающей питательной среды – отрицательный контроль. Пример учета результатов бляшкообразования представлен на **рис. 1**.

При предварительном исследовании были получены следующие результаты:

1. При инфицировании культур клеток Vero и 4647 ФСО ГФ РФ 3.2.00113 разведениями 10^{-6} и 10^{-7} наблюдалось образование специфических образований – бляшек, что предполагает возможность использования данной методики при подтверждении показателя «Специфичность (подлинность)» (**рис. 2, 3**). При инфицировании двух культур разведением 10^{-8} наблюдались единичные бляшки, в некоторых лунках они отсутствовали. Таким образом, при подтверждении показателя «Специфичность (подлинность)» целесообразным является использование разведений 10^{-6} и 10^{-7} .

2. В опыте было определено, что при приготовлении разведений ФСО ГФ РФ 3.2.00113 аналогично требованиям ГФ РФ, ФС.3.3.1.0033.15 на Вакцину оспенную живую расчет специфических поражений – бляшек целесообразно проводить в разведении 10^{-6} , где количество бляшек составило более 10 штук (у 3 исполнителей), что позволило получить более корректный результат. Расчет по разведению 10^{-7} приводит к завышению значений показателя «Специфическая активность». Полученные результаты показаны в примерах расчета **табл. 1**.

Как следует из результатов, представленных в табл. 1, расчет бляшек в разведении 10^{-6} позволил получить адекватные результаты значений показателя «Специфическая активность» на культурах клеток Vero и 4647. Полученные результаты коррелировали со значением показателя «Специфическая активность» ФСО, полученного при проведении испытания на ХАО развивающихся куриных эмбрионов $3,8 \pm 2,5 \times 10^8$ ООЕ/мл.

3. При проведении тестового эксперимента при просмотре в микроскоп на этапе первичной (контактной) инкубации планшетов в CO_2 -инкубаторе при температуре 37 ± 1 °C в течение 60 мин, в не-

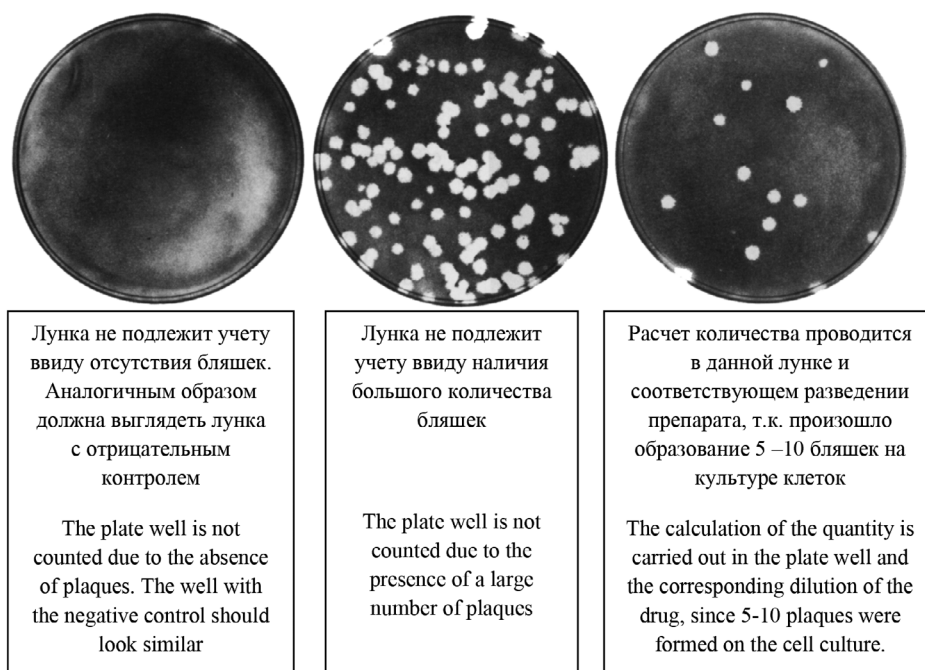


Рис. 1. Учет результатов бляшкообразования.

Fig. 1. Interpretation of the results of plaque formation.

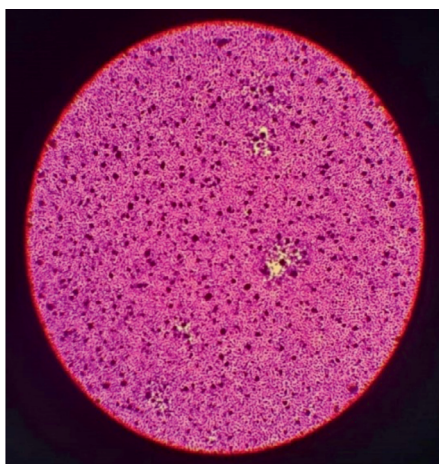


Рис. 2. Бляшки под микроскопом при увеличении 4 (общее увеличение 40).

Fig. 2. Plaques under a microscope at magnification $\times 4$ (total magnification $\times 40$).

которых случаях были обнаружены очаги частичного разрушения и дегенерации клеточного монослоя. Данное явление может быть связано с недостаточным количеством инфицирующего материала, вносимого в каждую лунку (100 мкл), которое не покрывало всю поверхность клеточного монослоя, в результате чего монослой в процессе инкубации подвергался пересыханию и частичной дегенерации. В одном из опытов это привело к снижению значений показателя «Специфическая активность» ($1,97 \times 10^8$ и $3,5 \times 10^8$ БОЕ/мл). Таким образом, при проведении последующих экспериментов была установлена необходимость увеличения инфициру-

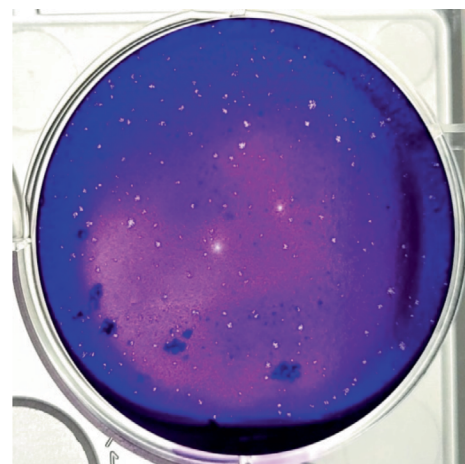


Рис. 3. Бляшки в лунке планшета с культурой клеток 4647.

Fig. 3. Plaques in the plate well with cell culture 4647.

ющей дозы до 300 мкл для разведений ФСО на этапе инфицирования культуры клеток.

Минимальные и максимальные значения показателя «Специфическая активность» на культуре клеток Vero составили от $1,97 \times 10^8$ до $5,20 \times 10^8$ БОЕ/мл, а на культуре клеток 4647 – от $3,5 \times 10^8$ до $5,20 \times 10^8$ БОЕ/мл, что показало их сходимость.

Исследование с применением 1 Международного стандартного образца оспенной вакцины

Основанием для проведения опыта на культурах клеток с применением МСО (The 1st International Stan-

Таблица 1. Примеры расчета бляшек на культуре клеток Vero и 4647
Table 1. Examples of plaque calculation in Vero and 4647 cell culture

Разведения ФСО Dilutions of Pharmacopoeia standard	Количество бляшек на культуре клеток Plaque count on cell culture				Значение показателя «Специфическая активность», БОЕ/мл Specific activity, Plaque-forming units/mL
	Исполнитель 1 Operator 1 (n = 3)	Исполнитель 2 Operator 2 (n = 3)	Исполнитель 3 Operator 3 (n = 3)	Среднее значение и стандартное отклонение Mean value and standard deviation (n = 9)	
Культура клеток Vero Cell culture Vero					
10 ⁻⁶	50,0	50,0	19,7	39,9 ± 17,5	4,0 × 10 ⁸
10 ⁻⁷	9,3	4,7	7,0	7,0 ± 2,3	0,7 × 10 ⁹ или / or 7,0 × 10 ⁸
10 ⁻⁸	0,3	1,3	0,5	0,7 ± 0,5	—
Культура клеток 4647 Cell culture 4647					
10 ⁻⁶	50,0	50,0	34,7	45 ± 8,8	4,5 × 10 ⁸
10 ⁻⁷	8,7	11,7	5,0	8,5 ± 3,4	0,8 × 10 ⁹ или / or 8,0 × 10 ⁸
10 ⁻⁸	0,3	4,3	0,3	1,6 ± 2,3	—

dard for Smallpox Vaccine, NIBSC, кат. № SMV) была возможность его использования, указанная в инструкции. Аттестованной характеристикой МСО является значение LD₅₀ на культуре клеток, значение которой составляет 10^{5,8} в 1 мл (1963 г.)³. Исходя из данных литературы, аттестация МСО проводилась в 1963 г. с применением клеточной культуры КВ (КВ Hela – клетки карциномы шейки матки человека) и первично-трипсинизированной культуры клеток куриного эмбриона [3]. В связи с тем, что МСО охарактеризован культуральным методом, это являлось дополнительной возможностью для проведения оценки ФСО ГФ РФ 3.2.00113 культуральным методом и удовлетворяло требованиям, предъявляемым при установлении аттестуемых характеристик стандартных образцов [4]. Однако ввиду того, что аттестация МСО проходила в 1963 г., применялись другие культуры клеток, а также иная характеристика количественной оценки (LD₅₀, а не БОЕ/мл), можно предположить, что нами могут быть получены иные результаты и их учет будет целесообразно проводить по фактическим данным.

В опыте были исследованы такие валидационные характеристики, как специфичность, правильность, линейность, была проведена сравнительная оценка получаемых результатов при разных способах восстановления исследуемых образцов ФСО ГФ РФ 3.2.00113, сравнительная оценка результатов, полученных при использовании различных инфицирующих доз. Схема исследования представлена на **рис. 4, 5**.

Определение валидационных характеристик

Определение специфичности

Определение специфичности (подлинности) заключалось в сравнении специфических поражений – бля-

шек, полученных при инфицировании монослоя клеток Vero и 4647 разведениями МСО и ФСО.

При определении специфичности были получены результаты, соответствующие следующим критериям приемлемости:

- при инфицировании культур клеток Vero и 4647 разведениями МСО и ФСО наблюдалось образование специфических образований – бляшек, схожих по морфологии;
- в отрицательном контроле у 3 исполнителей во всех опытах были получены отрицательные результаты.

Результаты опыта представлены на **рис. 6**.

На основании полученных результатов и соответствия образцов ФСО установленным критериям приемлемости можно сделать вывод о том, что валидационная характеристика «Специфичность (подлинность)» подтверждена и методика может быть применима с целью определения аналогичного показателя ФСО ГФ РФ 3.2.00113.

*Определение повторяемости (сходимости)
и внутрилабораторной (промежуточной)
прецизионности*

С целью подтверждения повторяемости (сходимости) был установлен следующий критерий приемлемости:

- количество бляшек, образованных вирусом осповакцины при воспроизведении испытания исполнителем в разных разведениях, позволяет получить сходимые результаты (n = 3 при внесении одного разведения в 3 лунки 1 исполнителем). Всего в опыте было использовано 3 разведения (10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ для МСО). Аналогичный опыт был проведен каждым из 3 исполнителей.

С целью подтверждения внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности был установлен критерий приемлемости:

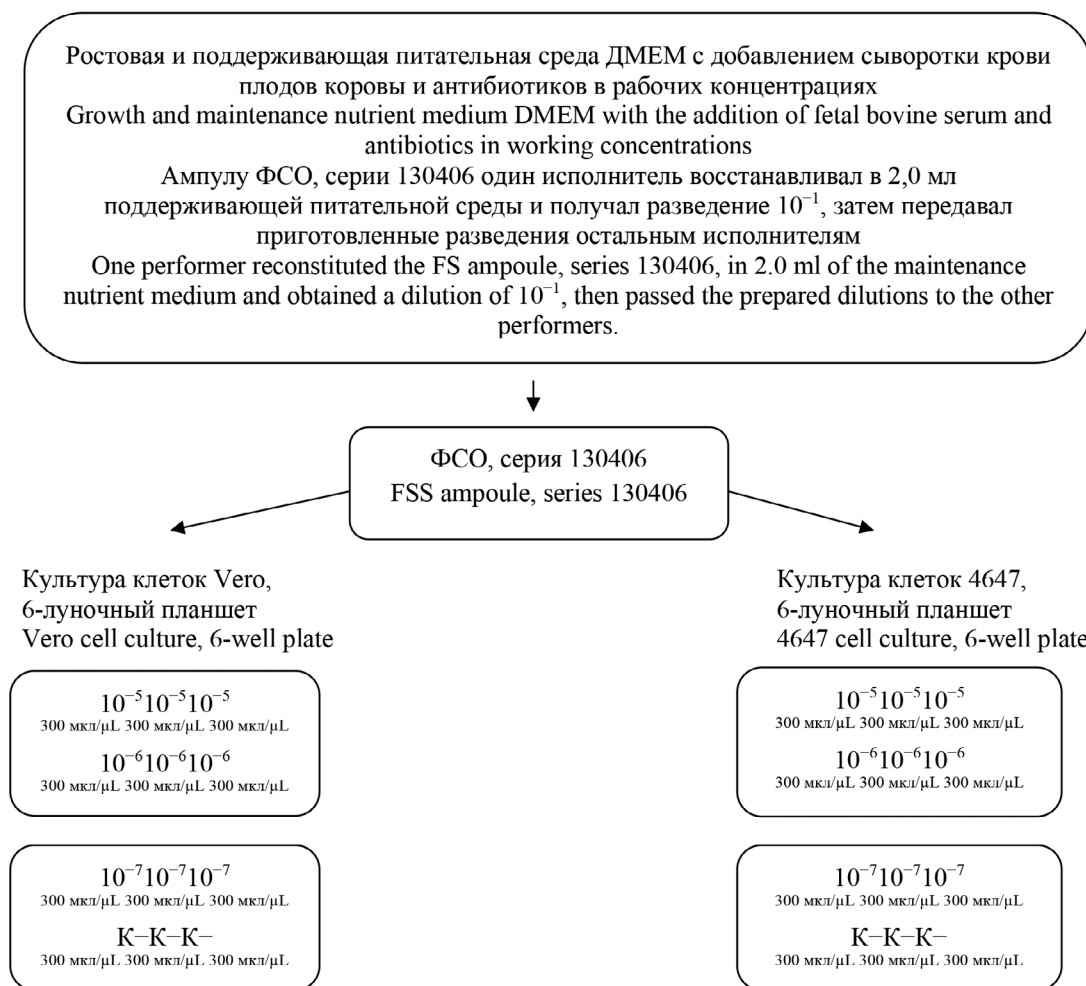


Рис. 4. Схема исследования с Фармакопейным стандартным образцом.

Fig. 4. Scheme of the research using Pharmacopoeial standard.

– результаты не менее 3 определений показателя «Специфическая активность» каждым из 3 исполнителей отдельно для каждой культуры клеток Vero и 4647 позволяет получить сходимые данные.

Полученные результаты представлены в **табл. 2**.

В опыте при приготовлении разведений МСО одним исполнителем и последующим инфицированием культур клеток Vero и 4647 разными исполнителями были подтверждены 2 валидационные характеристики, а именно:

1. *Повторяемость (сходимость)*. Были получены сходимые результаты не менее 3 определений у каждого из 3 исполнителей на каждом из 3 уровней определяемых величин при испытании МСО:

– для разведения 10^{-4} количество бляшек, образованных вирусом осповакцины, в каждой из трех лунок составило более 100 штук (для культуры клеток Vero и 4647);

– для разведения 10^{-5} количество бляшек, образованных вирусом осповакцины, в каждой из трех лунок составило в среднем 89 штук (для культуры клеток Vero) и в среднем 47 штук (для культуры клеток 4647);

– для разведения 10^{-6} количество бляшек, образованных вирусом осповакцины, в каждой из трех лунок составило в среднем 14 штук (для культуры клеток Vero) и в среднем 5 штук (для культуры клеток 4647).

2. *Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность*. Были получены сходимые результаты при определении показателя «Специфическая активность» культуральным методом при испытании МСО каждым из 3 исполнителей:

– на культуре клеток Vero среднее значение показателя составило $0,5 \times 10^8$ БОЕ/мл, стандартное отклонение – 0,14 (исполнитель 1 – $0,52 \times 10^8$ БОЕ/мл; исполнитель 2 – $0,58 \times 10^8$ БОЕ/мл; исполнитель 3 – $0,31 \times 10^8$ БОЕ/мл);

– на культуре клеток 4647 среднее значение показателя составило $0,2 \times 10^8$ БОЕ/мл, стандартное отклонение – 0,06 (исполнитель 1 – $0,23 \times 10^8$ БОЕ/мл; исполнитель 2 – $0,1 \times 10^8$ БОЕ/мл; исполнитель 3 – $0,15 \times 10^8$ БОЕ/мл).

Таким образом, на основании полученных результатов при испытании МСО были подтверждены валидационные характеристики методики «Повторяе-

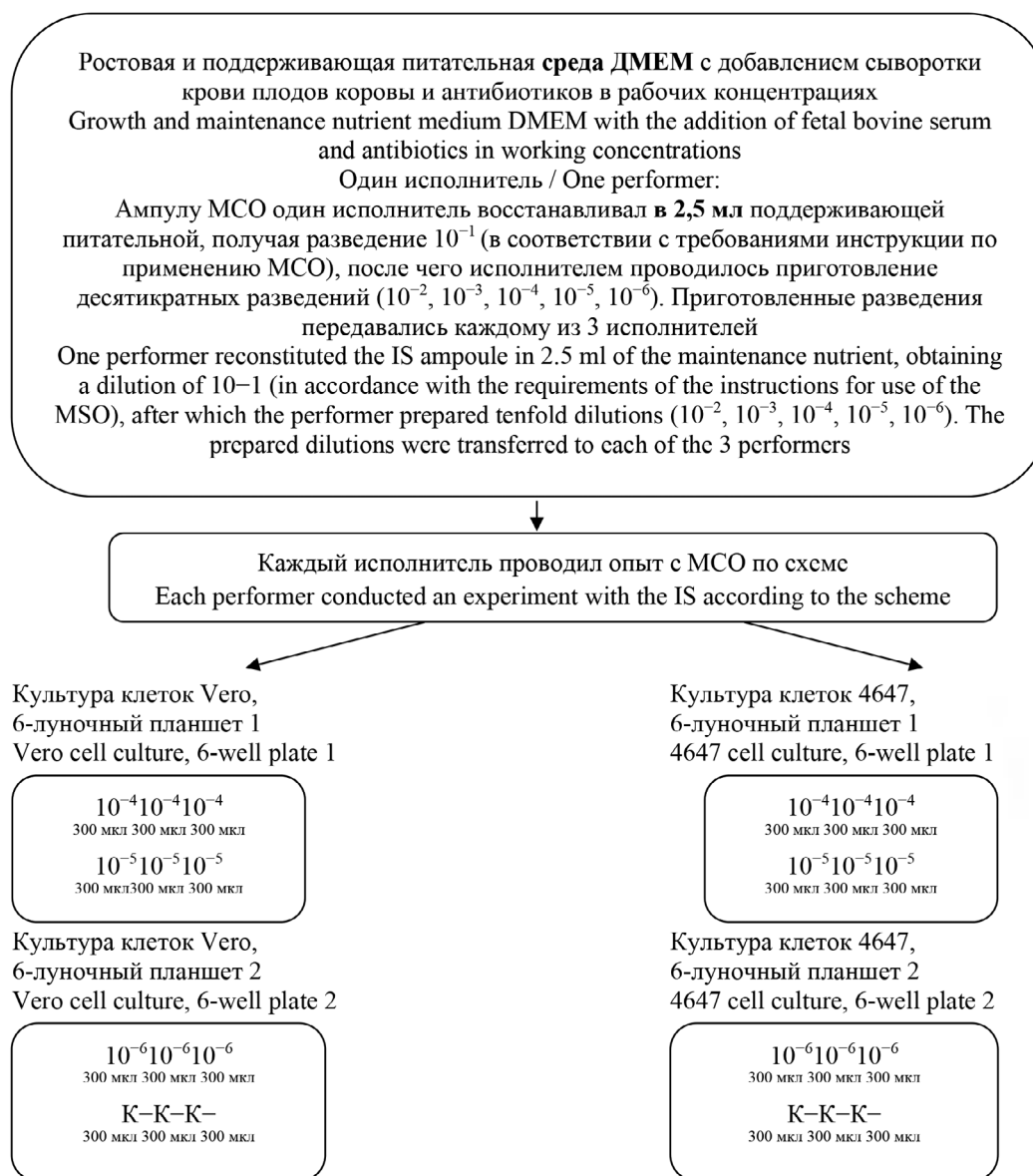


Рис. 5. Схема исследования с Международным стандартным образцом.

Fig. 5. Research Scheme of the research using International Standard.

мость (сходимость)» и «Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность».

Определение линейности

В одной повторности одним исполнителем с целью определения линейности были использованы разведения 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} при инфицировании культур клеток Vero и 4647 (рис. 6).

Критерием приемлемости при определении линейности было установлено наличие линейной зависимости количества специфических поражений (бляшек) на культурах клеток Vero и 4647 при инфицировании клеточного монослоя разными разведениями МСО.

Как следует из результатов, представленных на рис. 6, при внесении разных концентраций (разведе-

ний) МСО на культуры клеток Vero и 4647 образуются специфические поражения – бляшки, количество которых пропорционально внесенной концентрации испытуемого образца, что свидетельствует о линейности методики.

С целью оценки валидационной характеристики «Линейность» на основании результатов расчета количества специфических поражений (бляшек) на культурах клеток Vero и 4647 при инфицировании клеточного монослоя разными разведениями МСО была построена диаграмма, а также вычислена величина достоверности аппроксимации R^2 (коэффициент детерминации). При испытании разведений МСО на культурах клеток Vero и 4647 коэффициент детерминации находился в пределах 0,954 и 0,951 соответственно, что подтвердило линейность методики.

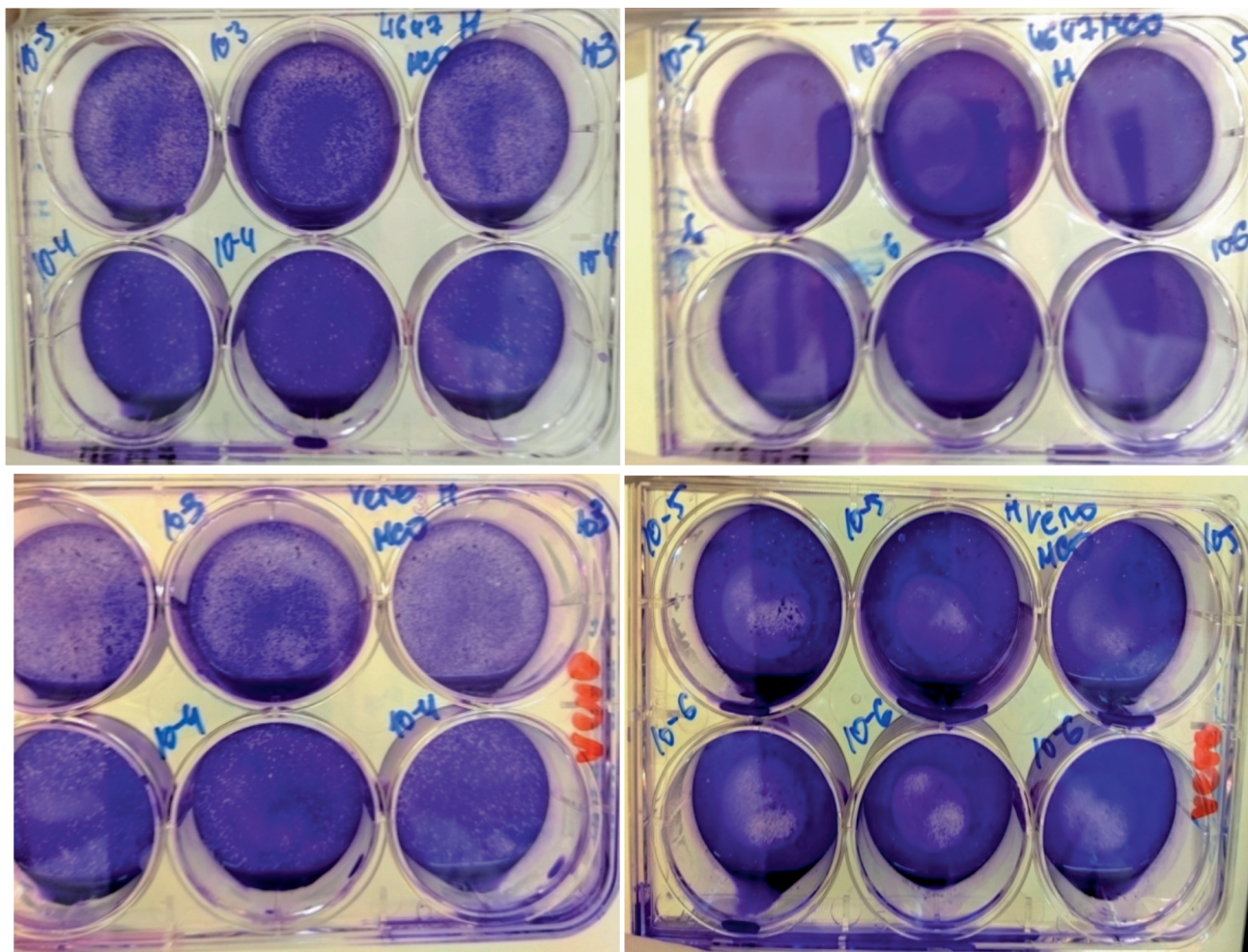


Рис. 6. Культуры клеток Vero и 4647 инфицированные разведениями МСО.

Fig. 6. Cell cultures Vero и 4647 infected with dilutions of International standard.

Определение правильности

С целью определения правильности в опыте с применением МСО, на основании требований Европейской фармакопеи 11.0 издания⁷ был установлен следующий критерий приемлемости:

– валидируемая методика признается правильной, если значения показателя «Специфическая активность» исследуемых образцов, полученные 3 исполнителями, не отличаются друг от друга более чем на $\pm 0,5 \log$ БОЕ/мл.

Для оценки правильности оценивались значения показателя «Специфическая активность» МСО и ФСО ГФ РФ 3.2.00113, полученные 3 исполнителями. Результаты представлены в **табл. 3**.

Как видно из табл. 3, значения показателя «Специфическая активность» исследуемых образцов МСО и ФСО ГФ РФ 3.2.00113, полученные 3 исполнителями и выраженные в единицах логарифма

концентрации, не отличались друг от друга более чем на $\pm 0,5 \log$ БОЕ/мл, правильность методики подтверждена.

Таким образом, в опыте с применением МСО были подтверждены следующие валидационные характеристики методики определения показателей «Специфичность (подлинность)» и «Специфическая активность» культуральным методом:

- специфичность;
- повторяемость (сходимость);
- внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность;
- линейность;
- правильность.

С целью дальнейшей отработки методики при определении показателей «Специфичность (подлинность)» и «Специфическая активность» с применением культурального метода было проведено 3 основных этапа (аналитических цикла), состоящих из не менее чем 3 опытов. Выполнение каждого этапа проводилось каждым из 3 исполнителей. При испытаниях варьировались способы восстановления образцов, составы ростовых и поддер-

⁷European Pharmacopoeia 11.0.04/2022:0164 corrected 11.0 «Smallpox vaccine (Live)». Доступно по: <https://pheur.edqm.eu/home> (дата обращения: 11.05.2025)

Таблица 2. Результаты определения показателя «Специфическая активность» МСО на культурах клеток**Table 2.** The results of the determination of the indicator “Specific activity” of International Standard in cell cultures

Наименование культуры клеток Cell culture	Объем инфицирующей дозы The volume of infectious dose	Исполнитель Operator	Разведения МСО Dilutions of International standard	Количество бляшек на культуре клеток Pock-count on cell culture	Значение показателя «Специфическая активность», БОЕ/мл Specific activity, Plaque-forming units/mL	Среднее значение/стандартное отклонение Mean value/standard deviation
Vero	300 мкл / μ L	1	10^{-4}	Более 100; более 100; более 100	Не учитывается	$0,5 \times 10^8/0,14$
			10^{-5}	Более 100; более 100; более 100	Не учитывается	
			10^{-6}	16; 18; 13	$0,52 \times 10^8$	
		2	10^{-4}	Более 100; более 100; более 100	Не учитывается	
			10^{-5}	85; 90; 95	Не учитывается	
			10^{-6}	18; 17; 17	$0,58 \times 10^8$	
		3	10^{-4}	Более 100; более 100; более 100	Не учитывается	
			10^{-5}	78; 71; 81	Не учитывается	
			10^{-6}	10; 8; 10	$0,31 \times 10^8$	
4647	300 мкл / μ L	1	10^{-4}	Более 100; более 100; более 100	Не учитывается	$0,2 \times 10^8/0,06$
			10^{-5}	54; 46; 50	Не учитывается	
			10^{-6}	7; 6; 8	$0,23 \times 10^8$	
		2	10^{-4}	Более 100; более 100; более 100	Не учитывается	
			10^{-5}	56; 57; 51	Не учитывается	
			10^{-6}	4; 4; 4	$0,1 \times 10^8$	
		3	10^{-4}	Более 100; более 100; более 100	Не учитывается	
			10^{-5}	38; 35; 39	Не учитывается	
			10^{-6}	5; 4; 5	$0,15 \times 10^8$	

живающих питательных сред, время инкубации инфицированных культур клеток.

На 1-м этапе (аналитическом цикле) для работы с культурами клеток использовалась среда Игла MEM с двойным набором аминокислот и стабильным L-глутамином с добавлением сыворотки крови плодов коровы и антибиотиков в рабочих концентрациях.

Во 2-м аналитическом цикле для работы с культурами клеток использовалась среда DMEM с добавлением сыворотки крови плодов коровы и антибиотиков в рабочих концентрациях.

В 3-м аналитическом цикле применяли среду RPMI с добавлением сыворотки крови плодов коровы и антибиотиков в рабочих концентрациях.

Средние результаты, полученные 3 исполнителями при выполнении 3 аналитических циклов, представлены в табл. 4.

Как следует из результатов, при восстановлении образцов в 2,0 мл поддерживающей питательной среды на культуре клеток Vero и 4647 с целью получения раз-

ведения 10^{-1} были получены сопоставимые данные. Значение показателя «Специфическая активность» при испытании на культурах клеток Vero и 4647 составляло $3,65 \times 10^8$ и $3,61 \times 10^8$ БОЕ/мл соответственно (при округлении можно установить значение показателя «Специфическая активность» $3,6 \times 10^8$ БОЕ/мл для 2 культур клеток) в случае инкубации инфицированных планшетов в течение 3 сут. При инкубации инфицированных планшетов в течение 2 сут среднее значение показателя «Специфическая активность» на культуре клеток 4647 было ниже и составило $1,0 \times 10^8$ БОЕ/мл, тогда как значение показателя «Специфическая активность», полученное с применением культуры клеток Vero, составило $1,8 \times 10^8$ БОЕ/мл.

При использовании дополнительного разведения при восстановлении образцов в 1,0 мл поддерживающей питательной среды для получения разведения 10^0 (по аналогии с пробоподготовкой препарата «ОртопоксВак») и последующим приготовлением 10-кратных разведений результаты значений по-

Таблица 3. Результаты оценки правильности при определении показателя «Специфическая активность» МСО и ФСО ГФ РФ 3.2.00113 на культурах клеток**Table 3.** The results of the assessment of correctness in determining the indicator “Specific activity” of the International standard and Pharmacopeia standard 3.2.00113 in cell cultures

Наименование культуры клеток Cell culture	Исполнитель Operator	Логарифм концентрации значения показателя «Специфическая активность» МСО, Log ₁₀ БОЕ/мл Log ₁₀ concentration specific activity of International standard, Log ₁₀ Plaque-forming units/mL	Стандартное отклонение Standard deviation	Логарифм концентрации значения показателя «Специфическая активность» ФСО, Log ₁₀ БОЕ/мл Log ₁₀ of concentration specific activity of Pharmacopeia standard, Log ₁₀ Plaque-forming units/mL	Стандартное отклонение Standard deviation
Vero	1	7,71	0,14	8,32	0,06
	2	7,76		8,20	
	3	7,49		8,23	
4647	1	7,36	0,18	8,17	0,17
	2	7,00		7,90	
	3	7,17		7,84	

Таблица 4. Результаты испытаний по показателю «Специфическая активность» ФСО ГФ РФ 3.2.00113 на культурах клеток Vero и 4647**Table 4.** Test results for the indicator “Specific activity” of Pharmacopeia standard 3.2.00113 on Vero and 4647 cell cultures

Особенности методики	Значение показателя «Специфическая активность», на культуре клеток Vero, БОЕ/мл Specific activity on cell culture Vero Plaque-forming units/mL		Значение показателя «Специфическая активность», на культуре клеток 4647, БОЕ/мл Specific activity on cell culture 4647 Plaque-forming units/mL	
	Инкубация инфицированных планшетов в течение 2 сут	Инкубация инфицированных планшетов в течение 3 сут	Инкубация инфицированных планшетов в течение 2 сут	Инкубация инфицированных планшетов в течение 3 сут
Восстановление образцов в 2,0 мл поддерживающей питательной среды для получения разведения 10 ⁻¹ и последующим приготовлением разведений в соответствии с требованиями ГФ РФ, ФС.3.3.1.0033.15 «Вакцина оспенная живая»	1,80 × 10 ⁸ стандартное отклонение 0,3 (p = 0,25)	3,65 × 10 ⁸ стандартное отклонение 1,2 (p = 0,12)	1,01 × 10 ⁸ стандартное отклонение 0,4 (p = 0,17)	3,61 × 10 ⁸ стандартное отклонение 1,1 (p = 0,13)
Восстановление образцов в 1,0 мл поддерживающей питательной среды для получения разведения 10 ⁰ и последующим приготовлением разведений в соответствии с требованиями ГФ РФ, ФС. 3.3.1.0033.15 «Вакцина оспенная живая»	1,3 × 10 ⁸ стандартное отклонение 0,7 (p = 0,23)	1,7 × 10 ⁸ стандартное отклонение 0,9 (p = 0,21)	0,5 × 10 ⁸ стандартное отклонение 0,3 (p = 0,05)	1,1 × 10 ⁸ стандартное отклонение 1,1 (p = 0,04)

казателя «Специфическая активность» были ниже, что является закономерным. При инкубации инфицированных планшетов в течение 3 сут на культуре клеток Vero значение показателя «Специфическая активность» составило $1,7 \times 10^8$ БОЕ/мл, а на культуре клеток 4647 – $1,1 \times 10^8$ БОЕ/мл (значение показателя культуре клеток 4647 было в 1,5 раза ниже). При инкубации инфицированных планшетов в течение 2 сут наблюдалась аналогичная тенденция. Значение показателя «Специфическая активность» на культуре клеток Vero составило $1,3 \times 10^8$ БОЕ/мл, а на культуре клеток 4647 – $0,5 \times 10^8$ БОЕ/мл (значение показателя культуре клеток 4647 было в 2,6 раза ниже). Однако при использовании дополнительного разведения 10⁰ для восстановления образцов были отмечены неоднозначные результаты значений стандартных отклонений. Распределение результатов было нормальным во всех случаях, за исключением результатов, по-

лученных на культуре клеток 4647 при приготовлении предварительного разведения 10⁰ после инкубирования инфицированных планшетов в течение 3 сут.

Обсуждение

В соответствии с результатами, полученными при аттестации ФСО ГФ РФ 3.2.00113 с применением фармакопейных методик, подтверждены его основные аттестованные характеристики. По итогам работы оформлены паспорт и инструкция по применению, срок годности ФСО составил 1 год.

При оценке возможности испытания ФСО ГФ РФ 3.2.00113, ГФ РФ 3.2.00113 по показателям «Специфичность (подлинность)» и «Специфическая активность» культуральным методом можно сделать следующие выводы:

1. Установлено, что возможно проведение испытаний ФСО ГФ РФ 3.2.00113 по показателям «Специ-

фичность (подлинность)» и «Специфическая активность» с применением культурального метода.

2. При испытании по показателю «Специфичность (подлинность)» во всех проведенных исследованиях наблюдалось образование специфических образований – бляшек при инфицировании культур клеток Vero и 4647 разведениями ФСО 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , что подтверждает возможность испытаний с применением данного метода.

3. В 3 аналитических циклах с применением различных питательных сред были получены сходимые и воспроизводимые результаты. Было установлено, что наиболее приемлемые результаты получаются при восстановлении образцов в 2,0 мл поддерживающей питательной среды для получения разведения 10^{-1} и последующим приготовлением разведений в соответствии с требованиями ГФ РФ, ФС.3.3.1.0033.15 «Вакцина оспенная живая» и последующей инкубацией в течение не менее 3 сут (не менее 72 ч) до получения результатов.

4. Расчет показателя «Специфическая активность» целесообразно проводить в разведении, где количество образованных бляшек составляет 5–10 и более штук (при исследовании ФСО ГФ РФ 3.2.00113 определение показателя «Специфическая активность» проводилось в разведении 10^{-6}). С целью получения воспроизводимых результатов объем инфицирующих разведений, вносимый в лунки 6-луночного планшета, должен составлять 0,3 мл перед инкубацией в течение 60 мин в CO_2 -инкубаторе. В опытах целесообразно использования разведений ФСО 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} . При последующих расчетах целесообразно проводить пересчет значения показателя «Специфическая активность» на инфицирующую дозу (0,3 мл).

5. При валидации методики с применением МСО были подтверждены такие валидационные характеристики методики, как специфичность, повторяемость (сходимость), внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность, линейность, правильность.

В ходе исследования была подтверждена возможность использования новой методики определения специфической активности, специфичности (подлинности) с применением культурального метода. На основании полученных результатов были установлены следующие критерии приемлемости методики определения показателей «Специфичность (подлинность)» и «Специфическая активность» культуральным методом:

1. При учете результатов в клетках, не инфицированных разведениями ФСО (отрицательный контроль), не должно наблюдаться признаков цитопатогенного действия, клеточной дегенерации, образования специфических поражений.

2. Расчет показателя «Специфическая активность» целесообразно проводить в разведении, где количество образованных бляшек составляет 5–10 и более штук.

3. При испытании должно быть подтверждено значение показателя «Специфическая активность», уста-

новленное культуральным методом, выраженную в виде аттестованного значения ($\bar{X}_{\text{ср}}$) при доверительной вероятности 0,95, а также расширенной неопределенности (U), которую вычисляют как $\pm 2S$ от среднего значения (коэффициент охвата $k = 2$, уровень доверия 95%).

Возможно внесение обоснованных дополнений и изменений в установленные критерии приемлемости в ходе проведения последующих испытаний с применением культурального метода.

Заключение

Проведена аттестация фармакопейного стандартного образца активности, специфичности и некротической активности оспенной вакцины по основным аттестуемым характеристикам. Был установлен срок годности 1 год – до 31.12.2025. При исследовании ФСО подтверждена возможность использования новой методики определения специфической активности, специфичности (подлинности) с применением культурального метода, установлены основные критерии приемлемости.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мухачева А.В., Перекрест В.В., Movsesyants A.A., Sarkisyan K.A., Butyrskii A.Yu., Fadeikina O.V. и др. Результаты переаттестации отраслевого стандартного образца и использование его при экспертизе качества вакцин против натуральной оспы. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2016; 15(6): 70–9. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-6-70-79> <https://elibrary.ru/xemezv>
2. Щелкунов С.Н., Якубский С.Н., Титова К.А., Пьянков С.А., Шульгина И.С., Старостина Е.В. и др. Атенуированный и высокоиммуногенный вариант вируса осповакцины. *Acta Naturae*. 2024; 16(2): 82–9. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27384> <https://elibrary.ru/kcsbn>
3. Krag P., Bentzon M.W. The international reference preparation of smallpox vaccine. An international collaborative assay. *Bull. World Health Organ*. 1963; 29(3): 299–309.
4. Волкова Р.А., Fadeikina O.V., Ustinikova O.B., Sarkisyan K.A., Movsesyants A.A., Merkulov V.A. и др. Требования к материалам раздела по стандартным образцам, представляемым в досье на биологические лекарственные средства. *БИО препараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024; 24(1): 7–20. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-7-20>

REFERENCES

1. Mukhacheva A.V., Perekrst V.V., Movsesyants A.A., Sarkisyan K.A., Butyrskii A.Yu., Fadeikina O.V., et al. The results of re-certification of reference standard sample used for the examination of quality smallpox vaccines. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2016; 15(6): 70–9. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2016-15-6-70-79> <https://elibrary.ru/xemezv> (in Russian)
2. Shchelkunov S.N., Yakubitskiy S.N., Titova K.A., Pyankov S.A., Shulgina I.S., Starostina E.V., et al. An attenuated and highly immunogenic variant of the vaccinia virus. *Acta Naturae*. 2024; 16(2): 82–9. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27384> <https://elibrary.ru/kcsbn> (in Russian)
3. Krag P., Bentzon M.W. The international reference preparation of smallpox vaccine. An international collaborative assay. *Bull. World Health Organ*. 1963; 29(3): 299–309.
4. Volkova R.A., Fadeikina O.V., Ustinikova O.B., Sarkisyan K.A., Movsesyants A.A., Merkulov V.A., et al. Requirements for the information on reference standards submitted in the dossier for biologicals. *BIO preparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2024; 24(1): 7–20. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2024-24-1-7-20> (in Russian)

Информация об авторах:

Мухачева Анастасия Вячеславовна✉ – главный эксперт лаборатории вирусных вакцин ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: muhacheva@expmed.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0769-6867>

Баранова Екатерина Владимировна – эксперт 2-й категории лаборатории вирусных вакцин ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: baranovae@expmed.ru; <https://orcid.org/0009-0001-7598-8936>

Богрянцева Марина Поликарповна – канд. биол. наук, заведующая отделом биологического и технологического контроля ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия. E-mail: bogryantseva@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0467-5024>

Нечаева Елена Августовна – канд. мед. наук, заместитель генерального директора по научной и производственной работе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия. E-mail: nechaeva@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6901-7738>

Смолина Маргарита Петровна – начальник лаборатории разработки и контроля ИПП отдела клеточных технологий ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия. E-mail: smolina_mp@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0009-0005-1859-7065>

Саркисян Каринэ Арташесовна – канд. мед. наук, начальник лаборатории вирусных вакцин ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: sarkisyan@expmed.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0445-7086>

Яндимирова Снежана Сергеевна – ведущий эксперт лаборатории вирусных вакцин ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: yandimirovass@expmed.ru; <https://orcid.org/0009-0008-8196-5926>

Шубина Елена Александровна – инженер-лаборант лаборатории вирусных вакцин ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: shubinaea@expmed.ru; <https://orcid.org/0009-0007-9535-9145>

Участие авторов: Мухачева А.В. – концепция и дизайн исследования, планирование и проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Баранова Е.В. – проведение экспериментов, работа с клеточными культурами; Богрянцева М.П. – участие при разработке методики, утверждение стандартных операционных процедур и нормативных документов, инициация проведения исследования, оказание методической помощи при совместном исследовании, анализ и интерпретация данных, участие в подготовке текста; Неchaева Е.А. – участие в разработке методики, участие в разработке и утверждении стандартных операционных процедур на производстве, оказание методической помощи при совместном исследовании; Смолина М.П. – участие в разработке методики, участие в разработке и утверждении стандартных операционных процедур, оказание методической помощи при совместном исследовании, консультирование по этапам проведения испытаний; Саркисян К.А. – концепция и дизайн исследования, планирование экспериментов, анализ и интерпретация данных, участие в подготовке текста; Яндимирова С.С. – планирование и проведение экспериментов, приготовление основных и вспомогательных растворов для экспериментов; Шубина Е.А. – планирование и проведение экспериментов, работа с клеточными культурами.

Поступила 21.06.2025
Принята в печать 14.08.2025
Опубликована 30.08.2025

Information about the authors:

Anastasia V. Muhacheva✉ – Chief expert of viral vaccines laboratory, Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia. E-mail: muhacheva@expmed.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0769-6867>

Ekaterina V. Baranova – 2 category expert of viral vaccines laboratory, Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia. E-mail: baranovae@expmed.ru; <https://orcid.org/0009-0001-7598-8936>

Marina P. Bogryantseva – Cand. Sci. (Biol.), Chief of biological and technological control department, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: bogryantseva@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0467-5024>

Elena A. Nechaeva – Cand. Sci. (Med.), Deputy director general for science and production, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: nechaeva@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6901-7738>

Margarita P. Smolina – Chief of the development and control laboratory the immunobiological medicines cell culture department State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: smolina_mp@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0009-0005-1859-7065>

Karine A. Sarkisyan – Cand. Sci. (Med.), Chief of the viral vaccines laboratory, Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia. E-mail: sarkisyan@expmed.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0445-7086>

Snezhana S. Jandimirova – leading expert of viral vaccines laboratory, Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia. E-mail: yandimirovass@expmed.ru; <https://orcid.org/0009-0008-8196-5926>

Elena A. Shubina – Laboratory engineer of viral vaccines laboratory, Scientific Center for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia. E-mail: shubinaea@expmed.ru; <https://orcid.org/0009-0007-9535-9145>

Contribution: Muhacheva A.V. – research concept and design, planning and conducting of experiments, collection, analysis and interpretation of results, text preparation; Baranova E.V. – experiments, working with cell cultures; Bogryantseva M.P. – development of technique, approval of standard operating procedures and regulatory documents, initiation of research, help on collaborative research, analysis and interpretation of results, text preparation; Nechaeva E.A. – development of technique, approval of standard operating procedures in the workplace, help on collaborative research; Smolina M.P. – development of technique, approval of standard operating procedures, help on collaborative research, consultation on research phases; Sarkisyan K.A. – research concept and design, planning and conducting of experiments, analysis and interpretation of results, text preparation; Jandimirova S.S. – planning and conducting of experiments, preparing of solutions for experiments; Shubina E.A. – planning and conducting of experiments, working with cell cultures.

Received 21 June 2025
Accepted 14 August 2025
Published 30 August 2025

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-332>

© Ерш А.В., Полтавченко А.Г., Ушкаленко Н.Д., Филатов П.В., Титова К.А., Одношевский Д.А., Сергеев Ал. А., Сергеев А.А., 2025



Выявление высокопатогенных ортопоксвирусов (*Poxviridae: Chordopoxvirinae: Orthopoxvirus*) методом дот-иммуноанализа в условиях лаборатории с высоким уровнем биологической защиты

Ерш А.В., Полтавченко А.Г., Ушкаленко Н.Д., Филатов П.В.✉, Титова К.А., Одношевский Д.А., Сергеев Ал.А., Сергеев А.А.

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

Резюме

Введение. Высокопатогенные для человека ортопоксвирусы (ОПВ) – вирусы натуральной оспы (VARV) и оспы обезьян (MPXV) – могут вызывать системные заболевания, характеризующиеся высокой контагиозностью и нередко приводящие к смерти. В предыдущих публикациях (<https://doi.org/10.3390/v14112580>) мы сообщали о разработке чувствительного, быстрого и простого в использовании иммунохимического теста, потенциально пригодного для применения в очаге инфекции и в условиях лаборатории с высоким уровнем биозащиты. Прототип диагностического набора был протестирован на непатогенных и малопатогенных для человека ОПВ и специфически выявлял их с чувствительностью в диапазоне от 10^3 до 10^4 БОЕ/мл.

Цель работы – оценка чувствительности разработанного иммунохимического теста при выявлении высокопатогенных для человека MPXV и VARV, а также применимости анализа в лаборатории с высоким уровнем биологической безопасности (BSL-4).

Материалы и методы. Методом одностадийного дот-иммуноанализа в условиях лаборатории с уровнем биобезопасности BSL4 оценивали эффективность выявления вирусов в криолизатах образцов культуры клеток CV-1, инфицированных VARV и MPXV.

Результаты. Показано, что одностадийный дот-анализ позволяет обнаруживать MPXV в концентрации $2,5 \times 10^3$ БОЕ/мл, а VARV в концентрации $1,0 \times 10^4$ БОЕ/мл. Отмечено, что пары дезинфектантов (перекись водорода или формальдегид), используемых для обработки изолирующего бокса, могут влиять на эффективность проявления результатов анализа.

Заключение. Одностадийный дот-иммуноанализ может быть выполнен в лаборатории BSL-4. При ограничении контакта проявляющей системы с парами формальдегида чувствительность теста при выявлении VARV и MPXV укладывается в ранее заявленный диапазон 10^3 – 10^4 БОЕ/мл.

Ключевые слова: вирус натуральной оспы; вирус оспы обезьян; выявление; дот-иммуноанализ

Для цитирования: Ерш А.В., Полтавченко А.Г., Ушкаленко Н.Д., Филатов П.В., Титова К.А., Одношевский Д.А., Сергеев Ал.А., Сергеев А.А. Выявление высокопатогенных ортопоксвирусов (*Poxviridae: Chordopoxvirinae: Orthopoxvirus*) методом дот-иммуноанализа в условиях лаборатории с высоким уровнем биологической защиты. *Вопросы вирусологии*. 2025; 70(4): 388–392. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-332> EDN: <https://elibrary.ru/emfnak>

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.

SHORT COMMUNICATION

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-332>

Detection of highly pathogenic orthopoxviruses (*Poxviridae: Chordopoxvirinae: Orthopoxvirus*) by dot immunoassay in a high-containment biological safety laboratory

Anna V. Ersh, Alexander G. Poltavchenko, Nikita D. Ushkalenko, Pavel V. Filatov✉, Ksenia A. Titova, Dmitrii A. Odnoshevsky, Alexander A. Sergeev, Artemiy A. Sergeev

State Scientific Center of Virology and Biotechnology «Vector», Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russia

Abstract

Introduction. Highly pathogenic for humans orthopoxviruses (OPV) – *Variola virus* (VARV) and *Monkeypox virus* (MPXV) can cause systemic diseases characterized by high contagiousness and often leading to death. In previous publications (<https://doi.org/10.3390/v14112580>), we reported on the development of a sensitive, rapid and easy-to-use immunochemical test potentially suitable for use in the infection foci and in laboratory conditions with a high level of biosecurity. The prototype of the diagnostic kit was tested on non-pathogenic and low-pathogenic for humans OPV and specifically detected them with a sensitivity within the range of 10^3 to 10^4 PFU/mL.

The aim of this work was to evaluate the sensitivity of this assay in detecting highly pathogenic for humans MPXV and VARV, as well as the applicability of the assay in a laboratory with a high level of biosafety (BSL-4).

Materials and methods. The efficiency of virus detection in cryolysates of CV-1 cell culture samples infected with VARV and MPXV was assessed using a one-step dot immunoassay method in a laboratory with biosafety level BSL-4.

Results. It was shown that the one-step dot assay allows detection of MPXV at a concentration of 2.5×10^3 PFU/mL, and VARV at a concentration of 1.0×10^4 PFU/mL. It was noted that vapors from disinfectants (hydrogen peroxide/ formaldehyde) applied in biosafety cabinet decontamination may interfere with assay performance and affect result interpretation.

Conclusion. The one-step dot immunoassay can be performed in a BSL-4 laboratory. When limiting the contact of the detecting system with formaldehyde vapors, the sensitivity of the test for detection of VARV and MPXV falls within the previously declared range of 10^3 – 10^4 PFU/mL.

Keywords: smallpox virus; monkeypox virus; detection; dot immunoassay

For citation: Ersh A.V., Poltavchenko A.G., Ushkalenko N.D., Filatov P.V., Titova K.A., Odnoshevsky D.A., Sergeev A.I., Sergeev A.A. Detection of highly pathogenic orthopoxviruses (*Poxviridae: Chordopoxvirinae: Orthopoxvirus*) by dot immunoassay in a high-containment biological safety laboratory. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2025; 70(4):388–392 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-332> EDN: <https://elibrary.ru/emfnak>

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

Род *Orthopoxvirus* подсемейства *Chordopoxvirinae* семейства *Poxviridae* включает 2 вида особо патогенных для человека вирусов: вирус натуральной оспы – *Variola virus* (VARV) и вирус оспы обезьян – *Monkeypox virus* (MPXV)¹. Эти вирусы высококонтагиозны, устойчивы к внешним факторам среды и имеют разные пути передачи.

Инфицирование VARV и MPXV приводит к системным заболеваниям с острым течением и нередко с летальным исходом [1–3]. VARV был ликвидирован в результате массовой вакцинации, но невозможно исключить преднамеренное использование его

штаммов против населения, а также распространение этого вируса из районов вечной мерзлоты с останками умерших от оспы [4, 5]. MPXV угрожает жизни людей не только в эндемичных регионах Африки, но в последнее время все чаще за их пределами [3, 6].

В системе противодействия патогенным ортопоксвирусам (ОПВ) ключевое значение имеет раннее выявление эпидемической угрозы, поскольку именно от этого зависит оперативность и эффективность реализации противоэпидемических мероприятий [2, 6]. С учетом высокой контагиозности исследуемых образцов, лабораторная диагностика должна проводиться в лаборатории с высоким уровнем биологической защиты (Biosafety Level 4, BSL-4) либо непосредственно в условиях очага инфекции. В том и другом случае выполнение диагностических процедур сопряжено с рядом ограничений в аппаратном оснащении и маневренностью при проведении

¹Genus: Orthopoxvirus | ICTV [Internet]. International Committee on Taxonomy of Viruses. Доступно по: <https://ictv.global/report/chapter/poxviridae/poxviridae/orthopoxvirus> (дата обращения 11 мая 2025).

манипуляций в средствах индивидуальной защиты [7, 8]. Таким образом, в условиях BSL-4 применение технологий полимеразной цепной реакции (ПЦР) или иммуноферментного анализа ограничено необходимостью использования дорогостоящего оборудования и сложных манипуляций [9].

Иммунохимические методы обладают меньшей чувствительностью по сравнению с ПЦР и не позволяют дифференцировать виды ОПВ, поскольку внутри рода антигенные детерминанты этих вирусов обладают выраженной степенью гомологии. Однако в сочетании с анамнестическими данными и клиническими симптомами они позволяют поставить предварительный диагноз заражения высокопатогенными видами ОВП и принять необходимые противоэпидемические меры. В то же время иммунохимические методы менее прихотливы к условиям анализа, относительно просты и оперативны в исполнении. Известны иммунохимические тесты, которые могут выполняться в полевых условиях за короткий период, но они не обладают достаточной чувствительностью [9, 10]. Таким образом, методы детекции ОПВ требуют усовершенствования в отношении повышения чувствительности, оперативности получения результатов и простоты выполнения анализа, позволяющей использовать тест непосредственно в очаге заражения или в условиях технических ограничений лаборатории с высоким уровнем биологической защиты.

Ранее нами был описан метод одностадийного дот-иммуноанализа на белковых матрицах для детекции ОПВ во внелабораторных условиях [11]. Созданные на его основе наборы реагентов автономны, содержат встроенные контроли, отличаются простотой применения, быстротой выполнения (до 35 мин) и возможностью надежной визуальной оценки результатов. Испытания наборов с использованием слабопатогенных и непатогенных для человека вирусов осповакцины, оспы коров и экстремелии показало, что они обеспечивают специфичность на уровне рода и чувствительность в диапазоне от 10^4 до 10^3 БОЕ/мл [11].

Целью данной работы являлась оценка чувствительности набора реагентов, созданного на основе разработанного иммунохимического теста, при обнаружении высокопатогенных для человека MPXV и VARV, а также применимости теста в лаборатории с высоким уровнем биологической безопасности (BSL-4).

Материалы и методы

Вирусы

Использовали следующие вирусы: VARV – вирус натуральной оспы (*Variola virus*), штамм Ind-3a, исходный титр $8,0 \times 10^6$ БОЕ/мл; MPXV – вирус оспы обезьян (*Monkeypox virus*), штамм V79-1-005, исходный титр $4,0 \times 10^6$ БОЕ/мл; VACV – вирус осповакцины (*Vaccinia virus*), штамм LIVP, исходный титр $8,5 \times 10^6$ БОЕ/мл.

Титрование вирусов на культуре клеток Vero проводили в соответствии с ранее описанными процедурами [11]. Все вирусы использовали в виде криолизатов

инфицированных клеток, освобожденных от клеточного дебриса низкоскоростным центрифугированием. Все эксперименты с живыми VARV (работы проводились в 2023 г. после одобрения и согласия Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ)) и MPXV выполняли в лаборатории уровня BSL-4 в Сотрудничающем центре ВОЗ по диагностике ортопоксвирусных инфекций и музее штаммов и ДНК вируса оспы с соблюдением всех операционных процедур.

Антитела

Использовали следующие антитела: АТ а/POX – поликлональные антитела из сыворотки кролика, иммунизированного VACV, штамм LIVP (получение сыворотки и выделение из нее антител методом осаждения сульфатом аммония описаны ранее [1]); АТ НКС – антитела из сыворотки не иммунизированного кролика, выделенные осаждением сульфатом аммония.

Конъюгат коллоидного золота с АТ а/POX

Получение золя золота (20 нм), определение дозы нагрузки золя антителами АТ а/POX, проведение нагрузки золя, стабилизацию и очистку конъюгата выполняли, как описано ранее [11].

Набор для выявления ортопоксвирусов

Набор содержал белковые матрицы и аналитические ванны. Белковые матрицы представляли собой подложки из синтетической бумаги с иммобилизованными в виде отдельных точек реагентами захвата: АТ а/POX (тестовая точка), АТ НКС (точка негативного контроля) и инактивированный VACV (точка позитивного контроля). Аналитические ванны содержали наборы ячеек с компонентами иммунологической реакции, герметизированные укрывным материалом. Полный состав набора и способы изготовления его элементов приведены в предыдущей публикации [11].

Дот-иммуноанализ

Одностадийный дот-анализ выполняли в аналитических ваннах в течение 35 мин при температуре 20–25 °С в растворе конъюгата объемом 400 мкл, с разведением образца 1 : 20. Общая схема и описание отдельных этапов анализа приведены в предыдущей работе [11].

Результаты

Эксперименты по оценке чувствительности выявления VARV проводили дважды с двумя параллельными постановками анализа, а по оценке чувствительности выявления MPXV – двумя независимыми группами исследователей в двух постановках. Во всех случаях были получены сходные результаты. При выявлении VARV максимальный фактор разведения составил 1/800, а лимит определения – $1,0 \times 10^4$ БОЕ/мл, а при выявлении MPXV – 1/1600 и $2,5 \times 10^3$ БОЕ/мл соответственно.

Обсуждение

В настоящей работе представлены результаты отложенного по техническим причинам (согласование с ВОЗ) этапа разработки метода индикации ОПВ,

касающегося оценки характеристик метода при выявлении высокопатогенных для человека видов ОПВ в условиях лаборатории с высоким уровнем биологической защиты (BSL-4). Метод представляет собой одностадийный дот-иммуноанализ на плоских белковых матрицах с использованием поликлональных кроличьих антител, связанных с коллоидным золотом, и золото-серебряного проявления. Результаты исследований с использованием слабопатогенных и непатогенных ОПВ, приведенные в предшествующей публикации [11], показали, что метод позволяет в течение 35 мин при комнатной температуре выявлять ОПВ в неочищенных вирусных препаратах и клинических материалах с пределом обнаружения в диапазоне 10^4 – 10^3 БОЕ/мл. Метод предполагает визуальный учет с несложной интерпретацией результатов анализа, прост в постановке, не проявляет реактивности в отношении возбудителей других эритематозных заболеваний и может использоваться для детекции ОПВ непосредственно в очаге инфекции.

Для определения чувствительности детекции особо опасных ОПВ готовили серии двукратных разведений VARV и MPXV в ячейках аналитической ванны, заполненных рабочим разведением конъюгата, погружали белковые матрицы в полученные смеси и инкубировали 25 мин при 25 °С. Далее выполняли отмычки, проявление матриц и визуальный учет результатов. За лимит определения принимали максимальный фактор разведения исходного титра вируса, при котором достоверно определяется положительный результат анализа.

Проявитель в составе набора был представлен в виде двух компонентов: сухого – таблетка, содержащая метол и лимонную кислоту в соотношении 3 : 5, и жидкого – 0,4% раствор нитрата серебра в очищенной воде. Таблетки помещали в определенный ряд ячеек аналитической ванны, а жидкий компонент входил в состав набора в отдельном флаконе. Описанная ранее схема подготовки проявителя предусматривает вскрытие ячеек с таблетками и внесение в них по 200 мкл очищенной воды до начала выполнения анализа (для полного растворения таблеток). Жидкий компонент вносят в эти ячейки в объеме 200 мкл непосредственно перед проявлением. Полученный проявитель стабилен не менее 10 мин, но малейшие посторонние примеси могут спровоцировать его дестабилизацию с выпадением серебра в осадок. Эксперименты показали, что длительное воздействие паров дезинфектантов (таких, как перекись водорода или формальдегид), используемых для обработки внутренних поверхностей в изоляционных камерах, может привести к реакциям, ухудшающим качество проявителя, вызывая неравномерное проявление тестовых и контрольных пятен на белковых матрицах. Рекомендовано производить вскрытие ячеек с таблетками сухой смеси и внесение в них воды до помещения диагностического набора в изолирующий бокс. Полученный раствор метола и лимонной кис-

лоты стабилен не менее 12 ч, что достаточно для выполнения всех операций по подготовке и проведению эксперимента. Для изоляции этого раствора от паров дезинфектантов подготовленные ячейки необходимо герметизировать лабораторной пленкой Parafilm. Непосредственно перед проявлением пленку удаляют и вносят в ячейки раствор нитрата серебра. При таком подходе воздействие дезинфектанта на проявитель ограничено 8–10 мин, что значительно улучшает процесс проявления. Приведенные выше результаты достигнуты с использованием описанной модификации метода.

Заключение

Дот-иммуноанализ на плоских белковых матрицах может выполняться в условиях лаборатории с высоким уровнем биологической защиты, но требует адаптации методики, обусловленной необходимостью минимизации времени контакта реагентов с парами дезинфектантов, применяемых при текущей обработке изолирующих боксов.

С использованием модифицированной методики лимит определения вирусов VARV и MPXV в исследованных образцах составил $1,0 \times 10^4$ и $2,5 \times 10^3$ БОЕ/мл соответственно, что соответствует заявленному ранее [11] диапазону чувствительности.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Buller R.M.L. Poxviruses. In: Cohen J., Powderly W.G., Opal S.M., eds. *Infectious Diseases. Volume 2*. Elsevier; 2017: 1452–7.e1.
2. Shchelkunova G.A., Shchelkunov S.N. Smallpox, monkeypox and other human orthopoxvirus infections. *Viruses*. 2022; 15(1): 103. <https://doi.org/10.3390/v15010103>
3. Sklenovská N. Monkeypox virus. In: Malik Y.S., Singh R.K., Dhama K., eds. *Livestock Diseases and Management*. Springer; 2020: 39–68.
4. Whitley R.J. Smallpox: a potential agent of bioterrorism. *Antiviral. Res.* 2003; 57(1-2): 7–12. [https://doi.org/10.1016/s0166-3542\(02\)00195-x](https://doi.org/10.1016/s0166-3542(02)00195-x)
5. Wallin A., Luksiene Z., Zagminas K., Surkiene G. Public health and bioterrorism: renewed threat of anthrax and smallpox. *Medicina (Kaunas)*. 2007; 43(4): 278–84.
6. Harapan H., Ophinni Y., Megawati D., Frediansyah A., Mamada S.S., Salampe M., et al. Monkeypox: a comprehensive review. *Viruses*. 2022; 14(10): 2155. <https://doi.org/10.3390/v14102155>
7. Shurtleff A.C., Garza N., Lackemeyer M., Carrion R. Jr., Griffiths A., Patterson J., et al. The impact of regulations, safety considerations and physical limitations on research progress at maximum biocontainment. *Viruses*. 2012; 4(12): 3932–51. <https://doi.org/10.3390/v4123932>
8. Bohannon J.K., Janosko K., Holbrook M.R., Barr J., Pust D., Bollinger L., et al. Safety precautions and operating procedures in an (A)BSL-4 laboratory: 3. *Aerobiology. J. Vis. Exp.* 2016; (116): 53602. <https://doi.org/10.3791/53602>
9. Townsend M.B., MacNeil A., Reynolds M.G., Hughes C.M., Olson V.A., Damon I.K., et al. Evaluation of the Tetracore Orthopox BioThreat® antigen detection assay using laboratory grown orthopoxviruses and rash illness clinical specimens. *J. Virol. Methods*. 2013; 187(1): 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.08.023>
10. Stern D., Olson V.A., Smith S.K., Pietraszczyk M., Miller L., Mithe P., et al. Rapid and sensitive point-of-care detection of Orthopoxviruses by ABICAP immunofiltration. *Virol. J.* 2016; 13(1): 207. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0665-5>
11. Ushkalenko N., Ersh A., Sergeev A., Filatov P., Poltavchenko A. Evaluation of rapid dot-immunoassay for detection orthopoxviruses using laboratory-grown viruses and animal's clinical specimens. *Viruses*. 2022; 14(11): 2580. <https://doi.org/10.3390/v14112580>

Информация об авторах:

Ерш Анна Васильевна – канд. биол. наук, научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: ersh_av@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9220-1250>

Полтавченко Александр Георгиевич – д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: poltav@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2408-5611>

Ушкаленко Никита Дмитриевич – аспирант, младший научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: ushkalenko_nd@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2171-7444>

Филатов Павел Владимирович – канд. биол. наук, научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: filatov_pv@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7763-3808>

Титова Ксения Александровна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: titova_ka@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8764-9408>

Одношевский Дмитрий Александрович – научный сотрудник ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: odnoshevskiy_da@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0616-7488>

Сергеев Александр Александрович – канд. мед. наук, заведующий отделом «Коллекция микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: sergeev_ala@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8355-5551>

Сергеев Артемий Александрович – д-р мед. наук, зам. генерального директора по научной и эпидемиологической работе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия. E-mail: sergeev_aa@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3591-1571>

Участие авторов: Ерш А.В. – проведение исследований; Полтавченко А.Г. – общее руководство, написание текста статьи; Ушкаленко Н.Д. – концепция и дизайн исследования; Филатов П.В. – подготовка исследований, редактирование текста; Титова К.А. – проведение исследований; Одношевский Д.А. – проведение исследований; Сергеев Ал.А. – проведение исследований; Сергеев А.А. – общее руководство, проведение исследований.

Поступила 16.06.2025
Принята в печать 08.08.2025
Опубликована 30.08.2025

Information about the authors:

Anna V. Ersh – PhD (Biology), Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: ersh_av@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-9220-1250>

Alexander G. Poltavchenko – Dr.Sci. (Biology), Leading researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: poltav@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2408-5611>

Nikita D. Ushkalenko – postgraduate student, Junior researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: ushkalenko_nd@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2171-7444>

Pavel V. Filatov – PhD (Biology), Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: filatov_pv@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0001-7763-3808>

Ksenia A. Titova – PhD (Biology), Senior researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: titova_ka@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8764-9408>

Dmitrii A. Odnoshevsky – Researcher, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: odnoshevskiy_da@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0616-7488>

Alexander A. Sergeev – PhD (Medicine), Head of the Department «Collection of Microorganisms», State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: sergeev_ala@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8355-5551>

Artemiy A. Sergeev – Dr.Sci. (Medicine) Deputy Director General for Scientific and Epidemiological Work, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk Region, Russia. E-mail: sergeev_aa@vector.nsc.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3591-1571>

Contribution: Ersh A. – conducting research; Poltavchenko A. – general management, writing the text of the article; Ushkalenko N – concept and design of the study; Filatov P. – research preparation, text editing; Titova K – conducting research; Odnoshevsky D – conducting research; Sergeev Al. – conducting research; Sergeev A. – general management, conducting research.

Received 16 June 2025
Accepted 08 August 2025
Published 30 August 2025

ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

К 80-летию со дня рождения Олега Ивановича Киселева



Олег Иванович Киселев родился 5 сентября 1945 г. в Магнитогорске в семье журналиста Ивана Яковлевича Киселева и преподавателя русского языка и литературы Галины Григорьевны Киселевой. В 1962 г. окончил школу в Челябинске, а в 1968 г. — с отличием Первый Ленинградский медицинский институт им. И.П. Павлова, получив официальную рекомендацию для поступления в аспирантуру. С институтской скамьи Олег Иванович увлекался микробиологией и биохимией. Он поступил в аспирантуру в лабораторию биохимической генетики Института экспериментальной медицины АМН СССР и уже в 1971 г. успешно защитил диссертацию на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности «Биохимия». Продолжив работать в Институте экспериментальной медицины, в 1982 г. Олег Иванович защитил докторскую диссертацию «Белоксинтезирующие структуры митохондрий и топография биосинтеза митохондриальных белков» по специальности «Биологическая химия».

С 1983 г. он продолжил свой научный путь в учреждениях Главного управления микробиологической промышленности при Совете Министров СССР (Главмикробиопром) и Министерства медицинской и

микробиологической промышленности СССР, став руководителем отделения генной инженерии при Главмикробиопроме. Этот период творческого пути О.И. Киселева был сфокусирован на вопросах генной инженерии и промышленной биотехнологии. Основные работы были посвящены клонированию и экспрессии генов интерферонов и цитокинов (интерлейкин-2).

В 1988 г. Олег Иванович совмещал работу в Институте эволюционной физиологии и биохимии РАН, где заведовал лабораторией молекулярных основ эволюции. Основная область его интересов сместилась в сторону изучения эволюции вирусов. Тогда же, в 1988 г., по предложению Министра здравоохранения СССР академика Е.И. Чазова О.И. Киселев был назначен директором НИИ гриппа. Вместе с назначением было подписано постановление о переводе всего отделения генной инженерии из Министерства медицинской и микробиологической промышленности в структуру НИИ гриппа.

В 1998 г. Олег Иванович получил звание профессора по специальности «Биохимия», в 2000 г. избран членом-корреспондентом РАМН, а в 2005 г. — академиком РАМН по специальности «Молекулярная вирусология» (с 2013 г. — академик РАН).

За время работы в НИИ гриппа основные направления научных исследований Олега Ивановича относились к области молекулярной биологии вирусов, генной инженерии иммунобиологических препаратов, дизайну и исследованию молекулярных механизмов действия химиопрепаратов. Им создана своя научная школа по молекулярной вирусологии, под его руководством защищены 11 кандидатских и 4 докторские диссертации, опубликовано более 350 научных работ, включая 20 монографий, 45 патентов на изобретения и 11 сборников.

Олег Иванович систематизировал современные представления о потенциальных лекарственных мишенях в репликативном цикле вирусов, внес вклад в молекулярно-генетическое обоснование терапии гриппа этиотропными препаратами. Благодаря сотрудничеству с Институтом органического синтеза УрО РАН и Уральским федеральным университетом было разработано новое поколение противовирусных препаратов на основе нитроазолоазинов, проведен скрининг соединений данного класса и осуществлен выбор соединения — лидера препарата триазавирин, проведены уникальные работы по расшифровке механизма действия препарата.

Олег Иванович внес важнейший вклад в разработку иммунобиологических препаратов против гриппа и туберкулеза, лично выступал как популяризатор широкого внедрения в практику вакцинопрофилактики гриппа и других инфекционных болезней.

Академик О.И. Киселев плодотворно сотрудничал с зарубежными научными коллективами и развивал международное сотрудничество НИИ гриппа; был одним из ведущих специалистов в области биологической безопасности и биотерроризма. Внес значительный вклад в создание проектов по линии Российско-Вьетнамского тропического центра.

Отдельно необходимо отметить его значительный вклад в развитие сотрудничества с Всемирной организацией здравоохранения по вопросам надзора и контроля за гриппом и острыми респираторными заболеваниями на территории России. Длительная работа в составе комиссий ВОЗ по подготовке к пандемии гриппа способствовала укреплению авторитета и признанию России как страны с высоким уровнем решения проблем защиты населения от пандемии гриппа, ведущим в мире производителем противогриппозных вакцин и противовирусных препаратов.

Заслуги Олега Ивановича Киселева по достоинству были оценены государством: он лауреат премии Правительства РФ 2004 г. в области науки и техники; в 2004 г. награжден медалью Ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени; в 2014 г. получил звание заслуженного деятеля науки Российской Федерации.

Олег Иванович активно готовил высококвалифицированные научные кадры и оставил после себя целую

плеяду учеников, продолживших традиции его школы молекулярной вирусологии. Они считают делом чести сохранить и приумножить наследие академика О.И. Киселева и все самое ценное из него передать следующим поколениям сотрудников Института и своим ученикам. Все они видят свое призвание в решении актуальных проблем здравоохранения.

Академик О.И. Киселев, безвременно ушедший 24 ноября 2015 г., — один из наиболее ярких представителей медицинской науки, объединявший в себе фундаментальные представления о медицине и биологии, внес существенный вклад в решение многих фундаментальных и прикладных задач в области молекулярной вирусологии, генной инженерии, химиотерапии, профилактики и эпидемиологии гриппа и других вирусных инфекций. Коллеги вспоминают его с восхищением и теплотой как человека, который любил и умел жить, подавал самоотверженный пример настоящего ученого, выполнявшего свой долг, несмотря ни на какие трудности, отстаивал интересы страны на международной арене и развивал научную кооперацию с ведущими учеными по всему миру.

*Светлая память академику О.И. Киселеву.
Коллектив сотрудников ФГБУ «НИИ гриппа
им. А.А. Смородинцева» Минздрава России*

Problems
of Virology

Voprosy
Virusologii