



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

3

Том 67 • 2022

Volume 67 • Issue 3 • 2022

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 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» (в соответствии с п.5 Правил формирования Перечня (Приказ Минобрнауки России от 12.12.2016 N 1586), как входящий в международную реферативную базу данных и систем цитирования Scopus) 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)

Свидетельство о регистрации
ПИ № ФС77-77676 от 29 января 2020 г.
ISSN 0507-4088 (Print)
ISSN 2411-2097 (Online)
DOI prefix: 10.36233

Журнал представлен в международных базах данных и информационно-справочных системах: Abstract Journals, AIDS & Cancer Research, Biocontrol News and Information, Biological Sciences, Chemical Abstracts, CrossRef, EBSCOhost Biological Abstracts, EBSCOhost Wildlife & Ecology Studies Worldwide, Elsevier BV Scopus, Elsevier BV EMBASE, Index Medicus, Excerpta Medica, Index Veterinarius, MEDLINE, National Library of Medicine PubMed, Parasitology Database, Poultry Abstracts, Review of Medical and Veterinary Entomology, Thomson Reuters Biological Abstracts, Thomson Reuters BIOSIS Previews, Thomson Reuters Science Citation Index Expanded, Thomson Reuters Web of Science, Tropical Diseases Bulletin, Veterinary Science Database, Virology and AIDS Abstracts, Russian Science Citation Index (на платформе Web of Science)

Журнал открытого доступа,
не берущий плату за публикации.

Контент доступен под лицензией
Commons Attribution International
4.0 CC-BY.

Статьи иностранных авторов и отдельные статьи, рекомендованные Редакционной коллегией журнала, публикуются на русском и английском языках под единым DOI.

Полные тексты статей журнала
доступны на сайтах:

<https://www.virusjour.elpub.ru/>;

<https://www.elibrary.ru/>;

<https://www.cyberleninka.ru/>;

<https://www.rucont.ru/>;

<https://www.ebsco.com>

ИЗДАТЕЛЬ:

ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии
Роспотребнадзора
111123, Москва,
ул. Новогиреевская, д. 3А.
Тел.: +7(925) 011-87-79
E-mail: publisher@crie.ru

РЕДАКЦИЯ:

Редакция расположена по адресу
Издателя

Начальник редакционно-
издательского отдела:
Осокина Ольга Владимировна

Заведующая редакцией:
Неверова Анна Леонидовна

Выпускающий редактор:
Архипова Елена Михайловна

Редакция не несёт ответственности за
содержание рекламных материалов.

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

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

Подписано в печать 29.04.2022.

Формат 60×90^{1/8}.

Тираж 50 экз.

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

© ФБУН ЦНИИ эпидемиологии
Роспотребнадзора, 2022

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.

3

Том 67 · 2022

Редакционная коллегия

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

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

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

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

Члены редколлегии:

Белоусова Р.В. (д.в.н., проф.)

Галегов Г.А. (д.б.н., проф.)

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

Гурцевич В.Э. (д.м.н., проф.)

Ершов Ф.И. (д.м.н., проф., акад. РАН)

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

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

Зуев В.А. (д.м.н., проф.)

Иванова О.Е. (д.м.н., проф.)

Карганова Г.Г. (д.б.н., проф.)

Колобухина Л.В. (д.м.н., проф.)

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

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

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

Попова А.Ю. (д.м.н., проф.)

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

Юминова Н.В. (д.б.н., проф.)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Иванов А.И. (Хабаровск, Россия)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Чвала И.А. (к.в.н.; Владимир, Россия)

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

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

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

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

Яшкуллов К.Б. (к.м.н., Элиста, Россия)

МЕЖДУНАРОДНЫЙ РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

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

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

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

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

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

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

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

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

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

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

Oxford J. (DSc; London, UK)

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

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

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

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

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

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

Webby R. (PhD; Memphis, USA)

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

The journal is registered by the Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media. Certificate of registration PI no. FS77-77676
ISSN 0507-4088 (Print)
ISSN 2411-2097 (Online)
DOI prefix: 10.36233

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

Abstract Journals, AIDS & Cancer Research, Biocontrol News and Information, Biological Sciences, Chemical Abstracts, CrossRef, EBSCOhost Biological Abstracts, EBSCOhost Wildlife & Ecology Studies Worldwide, Elsevier BV Scopus, Elsevier BV EMBASE, Index Medicus, Excerpta Medica, Index Veterinarius, MEDLINE, National Library of Medicine PubMed, Parasitology Database, Poultry Abstracts, Review of Medical and Veterinary Entomology, Thomson Reuters Biological Abstracts, Thomson Reuters BIOSIS Previews, Thomson Reuters Science Citation Index Expanded, Thomson Reuters Web of Science, Tropical Diseases Bulletin, Veterinary Science Database, Virology and AIDS Abstracts, Russian Science Citation Index (on the Web of Science platform),

The journal is a Platinum Open Access peer-reviewed scholarly journal, which does not charge author fees.

The content is licensed under Commons Attribution International 4.0 CC-BY.

Articles by foreign authors, as well as Russian-language articles specially recommended by the Editorial Board, are published in Russian and English under the same DOI.

Full texts of issues of the journal are available on:

<https://www.virusjour.elpub.ru;>

<https://www.elibrary.ru;>

<https://www.cyberleninka.ru;>

<https://www.rucont.ru;>

<https://www.ebsco.com>

PUBLISHER:

Central Research Institute for Epidemiology,
111123, 3A, Novogireevskaya St.,
Moscow, Russian Federation.
Phone/fax: +7(925) 011-87-79.
E-mail: publisher@crie.ru

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

EDITORIAL OFFICE:

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

Head of Editorial Office:

Anna L. Neverova

The Editorial Board is not responsible for the advertising content.

The materials that do not meet the requirements of the journal (<https://www.virusjour.elpub.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.elpub.ru>).

Signed to the press

on April 29, 2022.

Print format 60 × 90^{1/8}.

Circulation 50 copies.

Produced at the Buki Vedi Printing House.
115093, 1, 1st Party lane, Moscow, Russian Federation.
E-mail: info@bukivedi.com.
www.bukivedi.com

© Central Research Institute for Epidemiology, 2022

**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

3

Volume 67 • 2022

EDITORIAL BOARD

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

Assistant editor in chief: **Grebennikova T.V.**, RAS Corr. Member,
Professor, Dr. Sci. (Biology)

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

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

MEMBERS OF EDITORIAL BOARD

Belousova R.V. – Professor, Dr. Sci. (Veterinary)

Galegov G.A. – Professor, Dr. Sci. (Biology)

Gulyukin M.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Veterinary)

Gurtsevich V.E. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Ershov F.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Zhirnov O.P. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology)

Zverev V.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Biology)

Zuev V.A. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Ivanova O.E. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Karganova G.G. – Professor, Dr. Sci. (Biology)

Kolobukhina L.V. – Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Lobzin Yu.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Maleev V.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

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

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

Uryvaev L.V. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine)

Yuminova N.V. – Professor, Dr. Sci. (Biology)

EDITORIAL COUNCIL

Akimkin V.G. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine), (Moscow, Russia)

Aliper T.I. – Professor, Dr. Sci. (Biology), (Moscow, Russia)

Antonov V.A. – Professor, Dr. Sci. (Medicine), (Volgograd, Russia)

Bovin N.V. – Professor, Dr. Sci. (Chemistry), (Moscow, Russia)

Borisevich S.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Biology) (Sergiev Posad, Russia)

Briko N.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Vasin A.V. – Dr. Sci. (Biology) (St. Petersburg, Russia)

Glotov A.G. – Professor, Dr. Sci. (Veterinary) (Krasnoobsk, Russia)

Glupov V.V. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Zasedatelev A.S. – Professor, Dr. Sci. (Physics and Mathematics) (Moscow, Russia)

Zlobin V.I. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Irkutsk, Russia)

Ivanov L.I. – MD (Khabarovsk, Russia)

Kuzin A.A. – Dr. Sci. (Medicine) (St. Petersburg, Russia)

Kutyrev V.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Saratov, Russia)

Leonova G.N. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Vladivostok, Russia)

Loktev V.B. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Lukashev A.N. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Makarov V.V. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Moscow, Russia)

Malyshev N.A. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Manapova E.R. – Dr. Sci. (Medicine) (Kazan', Russia)

Mikhailov M.I. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Netesov S.V. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Nikiforov V.V. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Panin A.N. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Veterinary) (Moscow, Russia)

Pokrovskiy A.G. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Novosibirsk, Russia)

Reznik V.I. – MD, PhD (Khabarovsk, Russia)

Romanenko V.V. – Dr. Sci. (Medicine) (Ekaterinburg, Russia)

Savel'ev S.I. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Lipetsk, Russia)

Smetanina S.V. – PhD (Moscow, Russia)

Stepanova T.F. – Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Tyumen', Russia)

Tutel'yan A.V. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Chvala I.A. – PhD (Vladimir, Russia)

Chumakov P.M. – RAS Corr. Member, Professor, Dr. Sci. (Biology) (Moscow, Russia)

Chuchalin A.G. – RAS Full Member, Professor, Dr. Sci. (Medicine) (Moscow, Russia)

Shestopalov A.M. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Novosibirsk, Russia)

Shchelkanov M.Yu. – Professor, Dr. Sci. (Biology) (Vladivostok, Russia)

Yashkulov K.B. – MD, PhD (Elista, Russia)

INTERNATIONAL EDITORIAL COUNCIL

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

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

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

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

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

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

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

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

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

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

Oxford J. (DSc; London, UK)

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

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

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

Titov L.P. (MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; Minsk, Republic of Belarus)

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

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

Webby R. (PhD; Memphis, USA)

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

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

Догадов Д.И., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Энтеральные вирусные гепатиты у обезьян	173
Новиков Д.В., Мелентьев Д.А. Энтеровирусные (<i>Picornaviridae: Enterovirus</i>) (неполио) вакцины	185
Ожмегова Е.Н., Бобкова М.Р. Лекарственная устойчивость ВИЧ: прежние и современные тенденции	193
Власова Н.Н., Верховский О.А., Алипер Т.И., Капустина О.В., Алексеев К.П., Южаков А.Г., Гулюкин М.И., Гулюкин А.М. Проблемы специфической профилактики африканской чумы свиней*	206

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Киселева Н.П., Федорова М.Д., Заикина А.Э., Елкина Н.В., Голдобина Е.Е., Елкин Д.С., Абрамов П.М., Павлова Л.С., Винокурова С.В. Идентификация регуляторных некодирующих РНК вируса папилломы человека типа 16 (<i>Papillomaviridae: Alphapapillomavirus: Human papillomavirus 16</i>) в опухолях шейки матки*	217
Поволяева О.С., Чадаева А.А., Луницин А.В., Юрков С.Г. Штаммы диплоидных клеток лёгкого летучей мыши <i>Pipistrellus pipistrellus</i> и их перmissивность к орбивирусам (<i>Reoviridae: Orbivirus</i>) – возбудителям трансмиссивных болезней животных	227
Николаева Л.И., Белявцев А.Н., Шевченко Н.Г., Стучинская М.Д., Самохвалов Е.И., Дедова А.В., Сапронов Г.В., Шастина Н.С., Куприянов В.В. Анализ иммунореактивности отдельных В-клеточных эпитопов антигена NS4a вируса гепатита С (<i>Flaviviridae: Hepacivirus: Hepatitis C virus</i>).	237
Гурцевич В.Э., Лубенская А.К., Сенюта Н.Б., Душенькина Т.Е., Смирнова К.В. Вирус Эпштейна–Барр (<i>Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4</i>) у калмыков и славян, проживающих на территории России: типы вируса, варианты онкогена LMP1 и злокачественные опухоли*	246
ИНФОРМАЦИЯ Выборы в РАН	258

CONTENTS

REVIEWS

- Dogadov D.I., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I.**
Enteral viral hepatitis in monkeys 176
- Novikov D.V., Melentev D.A.**
Enteroviral (*Picornaviridae: Enterovirus*) (nonpolio) vaccines 185
- Ozhmegova E.N., Bobkova M.R.**
HIV drug resistance: past and current trends 193
- Vlasova N.N., Verkhovsky O.A., Aliper T.I., Kapustina O.V.,
Alekseev K.P., Yuzhakov A.G., Gulukin M.I., Gulukin A.M.**
Problems of specific prevention of African swine fever* 206

ORIGINAL RESEARCHES

- Kissel'jova N.P., Fedorova M.D., Zaikina A.E., Elkina N.V., Goldobina E.E.,
Elkin D.S., Abramov P.M., Pavlova L.S., Vinokurova S.V.**
Identification regulatory noncoding RNAs of human papilloma virus type 16
(*Papillomaviridae: Alphapapillomavirus: Human papillomavirus*) in cervical tumors* 217
- Povolyaeva O.S., Chadaeva A.A., Lunicyn A.V., Yurkov S.G.**
Common bat's (*Pipistrellus pipistrellus*) lung diploid cell strains and their permissivity to orbiviruses
(*Reoviridae: Orbivirus*) — pathogens of vector-borne animal diseases 227
- Nikolaeva L.I., Belyavtsev A.N., Shevchenko N.G., Stuchinskaya M.D.,
Samokhvalov E.I., Dedova A.V., Sapronov G.V., Shastina N.S., Kuprianov V.V.**
The analysis of immunoreactivity of individual B-cell epitopes of hepatitis C virus
(*Flaviviridae: Hepacivirus: Hepatitis C virus*) NS4a antigen 237
- Gurtsevitch V.E., Lubenskaya A.K., Senyuta N.B., Dushenkina T.E., Smirnova K.V.**
Epstein–Barr virus (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*)
in Kalmyks and Slavs living in Russia: virus types, *LMP1* oncogene variants, and malignancies* 246
- INFORMATION**
RAS elections 258

ОБЗОРЫ

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

https://doi.org/10.36233/0507-4088-110

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Энтеральные вирусные гепатиты у обезьян

Догадов Д.И.¹, Кюрегян К.К.^{2,3}, Михайлов М.И.^{2,3}

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» Министерства науки и высшего образования (Минобрнауки) РФ, 354376, Сочи, Россия;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия;

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993, Москва, Россия

В течение последнего десятилетия большое число вирусов, генетически связанных с вирусами гепатита человека, были обнаружены у животных, в том числе и обезьян. Множество вирусов, близких вирусу гепатита А (ВГА, *Picornaviridae: Hepatovirus: Hepatovirus A*) человека, было обнаружено у различных видов млекопитающих в течение 2015–2018 гг., включая главным образом летучих мышей и грызунов, а также землероек, тюленей и сумчатых животных. Зоонозные генотипы вируса гепатита Е (ВГЕ, *Hepeviridae: Orthohepevirus: Orthohepevirus A*) были обнаружены у диких кабанов, оленей, верблюдов и кроликов, а также у приматов. Кроме того, у летучих мышей, хорьков, грызунов, птиц и рыб были описаны вирусы, генетически близкие ВГЕ. Тем не менее именно обезьяны остаются важными лабораторными животными для изучения ВГА- и ВГЕ-инфекции. Изучение спонтанной и экспериментальной инфекции у этих животных представляет бесценный источник информации о биологии и патогенезе этих вирусов и по-прежнему является незаменимым инструментом для тестирования вакцин и лекарств. Целью данного обзора литературы являлись обобщение и анализ опубликованных данных о циркуляции ВГА и ВГЕ среди диких и содержащихся в неволе приматов, а также результатов экспериментов по моделированию на обезьянах инфекций, вызываемых ВГА и ВГЕ.

Ключевые слова: вирус гепатита А (ВГА); вирус гепатита Е (ВГЕ); обезьяны

Для цитирования: Догадов Д.И., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Энтеральные вирусные гепатиты у обезьян. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(3): 173–184. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-110>

Для корреспонденции: Догадов Дмитрий Игоревич, канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории инфекционных вирусов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» Министерства науки и высшего образования (Минобрнауки) РФ, 354376, Сочи, Россия. E-mail: dima_loko86@mail.ru

Участие авторов: Догадов Д.И. – обзор публикаций на тему статьи, написание и редактирование текста; Кюрегян К.К. – обзор публикаций на тему статьи, редактирование текста; Михайлов М.И. – обзор публикаций на тему статьи, редактирование текста.

Финансирование. Результаты получены при поддержке проекта Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2021-1065 от 28 сентября 2021 г. о предоставлении гранта на реализацию отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий на 2019–2027 гг.

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

Поступила 13.04.2022

Принята в печать 26.05.2022

Опубликована 30.06.2022

REVIEW ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-110>

Enteral viral hepatitis in monkeys

Dmitriy I. Dogadov¹, Karen K. Kyuregyan^{2,3}, Mikhail I. Mikhailov^{2,3}¹FSBRI «Research Institute of Medical Primatology» of the Ministry of Education and Science of Russia, 354376, Sochi, Russia;²FSBRI «I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 105064, Moscow, Russia;³FSBEI FPE «Russian Medical Academy of Continuous Professional Education» of the Ministry of Health of Russia, 125993, Moscow, Russia

Within the last decade, a large number of viruses genetically related to human hepatitis viruses have been identified in different animal species, including monkeys. Numerous viruses related to human hepatitis A virus (HAV, Picornaviridae: Hepatovirus: Hepatovirus A) were detected in various mammalian species in 2015–2018, predominantly in bats and rodents, but also in shrews, seals and marsupials. Zoonotic hepatitis E virus (HEV, Hepeviridae: Orthohepevirus: Orthohepevirus A) genotypes have been found in wild boars, deer, camels, and rabbits, as well as in non human primates. In addition, viruses that are genetically close to HEV have been described in bats, ferrets, rodents, birds, and fish. Nevertheless, monkeys remain important laboratory animals in HAV and HEV research. The study of spontaneous and experimental infection in these animals is an invaluable source of information about the biology and pathogenesis of these viruses and continues to be an indispensable tool for vaccine and drug testing. The purpose of this literature review was to summarize and analyze published data on the circulation of HAV and HEV among wild and captive primates, as well as the results of experimental studies of HAV and HEV infections in monkeys.

Keywords: hepatitis A virus (HAV); hepatitis E virus (HEV); monkeys**For citation:** Dogadov D.I., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I. Enteral viral hepatitis in monkeys. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(3): 173–184. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-110>**For correspondence:** Dmitriy I. Dogadov, Ph.D. (Biol.), Researcher of the Laboratory of Infection Virology, FSBRI «Research Institute of Medical Primatology» of the Ministry of Education and Science of Russia, 354376, Sochi, Russia. E-mail: dima_loko86@mail.ru**Contribution:** Dogadov D.I. – review of publications on the topic of the article, writing and editing of the text; Kyuregyan K.K. – review of publications on the topic of the article, text editing; Mikhailov M.I. – review of publications on the topic of the article, text editing.**Information about the authors:**Dogadov D.I., <https://orcid.org/0000-0003-1596-0509>Kyuregyan K.K., <https://orcid.org/0000-0002-3599-117X>Mikhailov M.I., <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>**Funding.** The results were obtained during the implementation of the project of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation under agreement No. 075-15-2021-1065 dated September 28, 2021 on the provision of a grant for the implementation of certain activities of the Federal Scientific and Technical Program for the Development of Genetic Technologies for 2019–2027.**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Received 13 April 2022

Accepted 26 May 2022

Published 30 June 2022

Введение

За последние 60 лет был достигнут большой прогресс в изучении вирусов гепатита человека. Однако ключевые аспекты их эволюции и патогенеза остаются малоизученными. В течение последнего десятилетия большое число вирусов, генетически связанных с вирусами гепатита человека, были обнаружены у животных, в том числе и обезьян.

Значительное расширение знаний о разнообразии вирусов животных произошло благодаря новым молекулярно-генетическим методам и беспрецедентному вниманию к зоонозным инфекциям, которое последовало за идентификацией высокопатогенных вирусов, таких как вирус Эбола и коронавирус SARS (Severe

acute respiratory syndrome – тяжёлый острый респираторный синдром) у летучих мышей. Множество вирусов, генетически связанных с вирусом гепатита А (ВГА, *Picornaviridae: Hepatovirus: Hepatovirus A*), было обнаружено у различных видов млекопитающих в течение 2015–2018 гг., главным образом у летучих мышей и грызунов, а также землероек, тюленей и сумчатых животных [1].

Зоонозные генотипы вируса гепатита Е (ВГЕ, *Hepeviridae: Orthohepevirus: Orthohepevirus A*) были обнаружены у диких кабанов, верблюдов, кроликов и крыс [2, 3]. Кроме того, у летучих мышей, хорьков, грызунов, птиц и рыб были описаны вирусы, генетически близкие ВГЕ и объединенные с ним в одно семейство

Hepeviridae [4]. Таким образом, вирусы, схожие с вирусами гепатита человека, существуют у разных животных.

Текущая пандемия, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 – тяжёлый острый респираторный синдром, связанный с коронавирусом 2), в очередной раз продемонстрировала, что для выявления новых и возвращающихся инфекций, а также их резервуаров среди животных требуется систематическое исследование вирусных инфекций у животных.

Обезьяны являются важными лабораторными животными для изучения ВГА- и ВГЕ-инфекции. Изучение спонтанной и экспериментальной инфекции у этих животных представляет собой бесценный источник информации о биологии и патогенезе этих вирусов и по-прежнему является незаменимым инструментом для тестирования вакцин и лекарств.

Целью данной работы являлись обобщение и анализ опубликованных данных о циркуляции ВГА и ВГЕ среди диких и содержащихся в неволе приматов, а также результатов экспериментов по моделированию вызываемых ВГА и ВГЕ инфекций на обезьянах.

Вирус гепатита А обезьян

Первые данные о ВГА у приматов были опубликованы в 1961 г., когда W.D. Hillis и соавт. описали вспышку с признаками этой инфекции среди шимпанзе, а также среди людей, работающих с этими животными [5]. Полученные данные стали первым доказательством того, что человек и обезьяны могут инфицировать друг друга ВГА. Вначале такие случаи были описаны как инфекционный гепатит, а позднее ретроспективно было доказано, что эта инфекция была вызвана ВГА, передававшимся от детенышей шимпанзе и являвшимся инфекционным для людей [6–9].

В 1980-е гг. после разработки тестов на основе иммуноферментного анализа (ИФА) для выявления антител к ВГА (анти-ВГА) было показано, что у различных видов обезьян Старого Света имеются эти антитела. Вспышки ВГА-инфекции также выявлялись среди низших обезьян Старого Света, отловленных в местах естественного обитания. По клиническим признакам они были аналогичны описанным ранее вспышкам у шимпанзе, за исключением отсутствия случаев ВГА-инфекции среди обслуживающего персонала [8, 10, 11]. Дальнейшие исследования показали, что среди большинства видов обезьян Старого и Нового Света, содержащихся в различных зоопарках и приматологических центрах мира, наблюдается высокая частота выявления анти-ВГА (табл. 1) [12–17].

Как видно из табл. 1, все виды человекообразных и низших обезьян Старого Света восприимчивы к ВГА. Позитивные особи наблюдались как среди животных, постоянно содержащихся в неволе, так и среди диких и импортированных обезьян. Анти-ВГА-IgG не были выявлены только среди SPF-животных (Specific Pathogen Free – беспатогенные животные).

Среди человекообразных обезьян частота выявления IgG-антител находилась в пределах 27–67%. Среди низших обезьян Старого Света этот показатель варьировал от 7 до 98%. Наиболее высокая (более 80%) частота распространения анти-ВГА-IgG наблюдалась среди обезьян рода макак, зелёных мартышек, а также павианов.

Кроме того, у многих видов макак, павианов и зелёных мартышек был выявлен маркер недавно перенесённой ВГА-инфекции (анти-ВГА-IgM). Так, наиболее высокая (78%) частота выявления анти-ВГА-IgM наблюдалась среди импортированных зелёных мартышек, а в остальных случаях этот показатель не превышал 20%.

Судя по частоте выявления антител, интенсивность циркуляции ВГА среди низших обезьян Нового Света оказалась на порядок ниже, чем среди человекообразных обезьян и низших обезьян Старого Света, за исключением ночных обезьян.

В середине 1980-х гг. были получены первые нуклеотидные последовательности различных штаммов ВГА, выделенных при вспышках гепатита А (ГА) у людей. Штамм НМ-175 человеческого происхождения, являющийся в настоящее время референсным для ВГА, был выделен при вспышке ГА в Австралии, а впоследствии экспериментальная инфекция с использованием этого штамма была воспроизведена на мармозетах [18]. Определение полной нуклеотидной последовательности штамма НМ-175 позволило провести сравнительный анализ последовательностей других штаммов ВГА, а также способствовало исследованию генетической гетерогенности штаммов ВГА, выделенных от людей и обезьян [19–21].

Результаты сравнительного анализа геномов ВГА человека и обезьян показали, что область VP1 является наиболее вариабельной, тогда как 5'-нетранслируемая область является наиболее консервативной [8].

В 1992 г. на основании генетического анализа 168 нуклеотидов участка VP1–2A 152 штамма ВГА человека и обезьян были разделены на 7 генотипов [22]. В 2007 г. II и VII генотипы из-за большого сходства были объединены в один генотип ВГА [23], который сегодня разделен на 6 генотипов. Следует отметить, что нуклеотидные последовательности с идентичностью более 85% объединяют в один генотип, а генотипы подразделяются на субгенотипы с вариабельностью в пределах 7,5% [23–25]. Штаммы ВГА, выделенные от низших обезьян Старого и Нового Света, в настоящее время относят к III–VI генотипам (табл. 2) [20, 26–31]. При этом штаммы, относящиеся к III генотипу, были выделены и среди людей, тогда как изоляты, относящиеся к IV–VI генотипам, – только от обезьян.

Штамм PA-21, отнесенный позднее к субгенотипу IIIA, был выделен в 1980 г. в Панаме среди диких ночных обезьян (*Aotus trivirgatus*) вскоре после поступления животных в приматологический центр из мест естественного обитания. Серологические исследования других ночных обезьян, содержащихся в центре, выявили широкое распространение анти-ВГА.

Только у одной обезьяны, содержащейся в приматологическом центре более 2 мес, анти-ВГА не были обнаружены. Эти исследования показали, что ночные обезьяны восприимчивы к ВГА и могут быть исполь-

зованы в качестве модели ВГА-инфекции. Позже было выяснено, что штамм РА-21 не только инфицирует обезьян, но и связан со случаями ВГА-инфекции среди людей в Индии, Непале, Швеции и США [25].

Таблица 1. Частота выявления антител к вирусу гепатита А среди различных видов обезьян
Table 1. The frequency of detection of antibodies to HAV among different species of monkeys

Вид обезьян / Species of monkeys	Маркер ВГА-инфекции / Marker of HAV infection		
	IgG (%)	IgM (%)	Источник / Reference
Человекообразные обезьяны / Apes			
Шимпанзе / Chimpanzee <i>Pan troglodytes</i>	0–50* 58**	Н/д N/d	S.S. Kalter и соавт. (1997) [12] R.H. Purcell и соавт. (2001) [13]
Горилла / Gorilla <i>Gorilla gorilla</i>	33*	Н/д N/d	S.S. Kalter и соавт. (1997) [12]
Орангутан / Orangutan <i>Pongo pygmaeus</i>	27*	Н/д N/d	S.S. Kalter и соавт. (1997) [12]
Гиббон / Gibbon <i>Hylobates</i>	33–50*	Н/д N/d	S.S. Kalter и соавт. (1997) [12] R.H. Purcell и соавт. (2001) [13]
Низшие обезьяны Старого Света / The Old World monkeys			
Макаки / Macaques <i>Macaca mulatta, M. fascicularis, M. nemestrina, M. arctoides, M. silenus</i>	7–88* 20** 0*** 42–98****	0–13* 0*** 10,4****	S.S. Kalter и соавт. (1997) [12] L.I. Korzaya и соавт. (2001) [14] R.H. Purcell и соавт. (2001) [13] Д.И. Догадов и соавт. (2019) [15]
Зелёные мартышки / Green monkeys <i>Chlorocebus aethiops, C. pygerythrus</i>	23–98* 63,1** 95****	10–78* 27,5%**	L.I. Korzaya и соавт. (2001) [14] R.H. Purcell и соавт. (2001) [13] Д.И. Догадов и соавт. (2019) [15]
Мартышка-гусар / Patas monkey <i>Erythrocebus patas</i>	0–50*	Н/д N/d	S.S. Kalter и соавт. (1997) [12] R.H. Purcell и соавт. (2001) [13]
Павианы / Baboons <i>Papio hamadryas, P. anubis</i>	17–100* 23****	3–20%*	Л.И. Корзая и соавт. (2011) [16] J.A. Drewe и соавт. (2012) [17] S.S. Kalter и соавт. (1997) [12] R.H. Purcell и соавт. (2001) [13] Д.И. Догадов и соавт. (2019) [15]
Дымчатый мангобей / Sooty mangabey <i>Cercocebus atys</i>	50–100*	Н/д N/d	S.S. Kalter и соавт. (1997) [12] R.H. Purcell и соавт. (2001) [13]
Низшие обезьяны Нового Света / The New World monkeys			
Капуцины / Capuchins <i>Cebus</i>	22*	Н/д N/d	R.H. Purcell и соавт. (2001) [13]
Ночные обезьяны / Three-striped night monkey <i>Aotus trivirgatus</i>	42* 1**	Н/д N/d	
Беличий саймири / Squirrel monkey <i>Saimiri sciureus</i>	0*	Н/д N/d	
Тамарины / Tamarins <i>Saguinus</i>	1*	Н/д N/d	
Мармозеты / Marmosets <i>Callitrichidae</i>	10*	Н/д N/d	
Паукообразные обезьяны / Atelidae <i>Atelidae</i>	18*	Н/д N/d	
Шерстистые обезьяны / Woolly monkey <i>Lagothrix</i>	0*	Н/д N/d	
Бурый прыгун / Brown titi <i>Callicebus brunneus</i>	0*	Н/д N/d	S.S. Kalter и соавт. (1997) [12]
Бледный саки / White-faced saki <i>Pithecia pithecia</i>	100*	Н/д N/d	

Примечание. Н/д – Нет данных. *Рожденные в колонии. **Обитающие в естественных условиях. ***SPF-животные. ****Импортированные.

Note. N/d – no data. *Born in captivity. **Living in the wild. ***SPF animals. ****Imported.

Генотип IV включает в себя только один штамм СУ-145, который был выделен в 1991 г. в Атланте (штат Джорджия, США) от импортированных из Филиппин макак яванских (*Macaca fascicularis*). Анализ последовательности штамма СУ-145 показал отличие от других штаммов ВГА на 20% по нуклеотидной и на 7% по аминокислотной последовательностям. Большинство наблюдаемых несинонимичных замен в сравнении со штаммом НМ-175 находятся у СУ-145 в областях, кодирующих белки VP1 и VP3. Анализ предполагаемых мест расщепления белков капсида показал наличие характерной аминокислотной замены в месте расщепления VP3–VP1: во всех изолятах ВГА человека на этом участке расщепляется пара «глутанин–валин», тогда как в штамме СУ-145 валин заменен треонином. Остальные две области расщепления капсидных белков СУ-145 идентичны таковым у ВГА человека [20].

В 1986 г. в Советском Союзе от зелёных мартышек гривет (*Cercopithecus aethiops*), импортированных из Кении, был выделен штамм AGM-27 [27]. В 1991 г. было установлено, что нуклеотидная последовательность этого штамма отличается от прототипного штамма ВГА человека НМ-175 на 17%, что соответствует отличию на 7% по аминокислотной последовательности. При этом для неструктурных белков отмечена более высокая степень отличий (8–9%) по сравнению со структурными белками (3%). Значительные отличия AGM-27 от других штаммов ВГА позволили отнести его к новому, V, генотипу, для которого данный штамм признан прототипным. Кроме того, отсутствие его среди людей позволило сделать вывод, что этот штамм инфицирует только обезьян [32].

Что касается различий в биологических свойствах штаммов НМ-175 и AGM-27, то AGM-27 растет в культурах клеток приматов значительно лучше, чем

НМ-175. Также были проведены экспериментальные заражения обезьян, результаты которых показали, что оба штамма вирулентны для тамаринов (*Saguinus mystax*), однако сильно отличаются по вирулентности при инфицировании шимпанзе (*Pan troglodytes*). Так, дикий тип НМ-175 является вирулентным для шимпанзе и вызывает у них проявление острого заболевания, тогда как AGM-27 протекает у этих животных бессимптомно, но тем не менее приводит к выработке защитных антител [33].

Следует также отметить, что V генотип ВГА был выделен не только от зелёных мартышек, но и от других видов обезьян. Так, в 2008 г. ВГА V генотипа был выделен от макака резуса из Индии (IND-SHAV). Степень сходства нуклеотидных и аминокислотных последовательностей этого штамма с AGM-27 составила 99,8 и 100% соответственно [28]. В 2012 г. А. J. Bennet и соавт. проанализировали геном изолята ВГА (KibOB-1), выделенного от павиана анубиса (*Papio anubis*), обитающего в Национальном парке Уганды. Нуклеотидная последовательность выделенного изолята была сходна с AGM-27 на 94,2% [29]. Кроме того, в 2014–2015 гг. среди обезьян НИИ медицинской приматологии (Сочи) были описаны последовательности V генотипа ВГА, выделенные от зелёных мартышек верветок (*Cercopithecus pygerythrus*), импортированных из Танзании, а также от двух макак резусов и макака яванского, содержащихся в питомнике. Отличие этих изолятов от штамма AGM-27 составило 5,5% по нуклеотидной последовательности участка VP1–2A [30]. Эти данные свидетельствуют о значительном генетическом разнообразии в рамках V генотипа ВГА.

К VI генотипу ВГА относится единственный штамм JM-55, выделенный от макак яванских (*Macaca fascicularis*), которые были импортированы из Ин-

Таблица 2. Изоляты вируса гепатита А, выделенные от обезьян
Table 2. HAV sequences isolated from monkeys

Генотип ВГА / HAV genotype	Вид обезьяны / Species of monkeys	Источник / Reference
IIIА	Ночные обезьяны / Three-striped night monkeys <i>Aotus trivirgatus</i>	S.M. Lemon и соавт. (1982) [26]
IV	Макаки яванские / Cynomolgus monkeys <i>Macaca fascicularis</i>	O.V. Nainan и соавт. (1991) [20]
V	Зеленые мартышки / Green monkeys <i>Cercopithecus aethiops</i>	А.Г. Анджапаридзе и соавт. (1987) [27]
	Макаки резусы / Monkeys rhesus <i>Macaca mulatta</i>	V.A. Arankalle и соавт. (2009) [28]
	Павианы анубисы / Olive baboons <i>Papio anubis</i>	A.J. Bennet и соавт. (2016) [29]
	Зелёные мартышки верветки / Vervet monkeys <i>Cercopithecus pygerythrus</i>	D.I. Dogadov и соавт. (2018) [30]
	Макаки резусы / Monkeys rhesus <i>Macaca mulatta</i>	D.I. Dogadov и соавт. (2018) [30]
	Макаки яванские / Cynomolgus monkeys <i>Macaca fascicularis</i>	D.I. Dogadov и соавт. (2018) [30]
	Макаки яванские / Cynomolgus monkeys <i>Macaca fascicularis</i>	А.Г. Анджапаридзе и соавт. (1985) [31]

донезии в 1985 г. в Советский Союз [31]. Для этого изолята было установлено наличие аминокислотных замен в тех же областях генома, что и в изоляте СУ-145 генотипа IV, выделенного также от макак яванских [7].

Массовое инфицирование обезьян ВГА, по-видимому, происходит в местах их концентрации после отлова, а также при групповом содержании в питомниках. Инфекция ВГА у обезьян часто протекает без клинических проявлений и сопровождается выделением вируса с фекалиями, появлением антител (анти-ВГА-IgG и анти-ВГА-IgM), а также повышением уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ). Однако у импортированных животных в период акклиматизации заболевание часто протекает с клиническими проявлениями: снижением двигательной активности, появлением жидкого стула, анорексией и нарастанием печеночных ферментов (АЛТ, АСТ) в крови. Заболевание в этих случаях может закончиться летально, а при макроскопическом исследовании отмечаются полнокровие печени, ее набухание и стертость рисунка на разрезе. Гистологически выявляются баллонная дистрофия гепатоцитов и их избыточная эозинофилия [34].

Несмотря на многочисленные попытки воспроизведения ВГА на разных видах лабораторных животных, успех был достигнут только при заражении обезьян.

В 1970-х гг. было проведено большое количество экспериментов по заражению шимпанзе ВГА, однако большинство из них были безуспешны. Позже появились данные о заражении обслуживающего персонала ВГА после работы с дикими шимпанзе. Применение серологических тестов показало высокую частоту выявления анти-ВГА среди этих животных, что делало их невосприимчивыми к экспериментальному заражению. В дальнейшем эксперименты по заражению ВГА серонегативных шимпанзе были успешны. Кроме того, были описаны удачные попытки заражения человеческими штаммами ВГА тамаринов, игрунок и ночных обезьян [35, 36].

Дальнейшие исследования показали, что к ВГА восприимчивы не только шимпанзе и некоторые виды низших обезьян Нового Света, но и многие виды низших обезьян Старого Света. С использованием штаммов ВГА, полученных от пациентов с острым ГА, а также от различных видов обезьян со спонтанной ВГА-инфекцией, были выполнены исследования по воспроизведению ВГА-инфекции на этих животных. Независимо от использовавшихся для заражения штаммов, у всех серонегативных обезьян развивалось заболевание, схожее с ГА человека: повышение уровня АЛТ, выделение частиц ВГА с фекалиями, образование анти-ВГА-IgG и анти-ВГА-IgM, а также морфологические изменения в печени, характерные для этой инфекции. Помимо острых форм, у некоторых животных наблюдалось продолжительное бессимптомное выделение вируса, продолжающееся до 8 мес [14].

Несмотря на достигнутые успехи в области таксономии, биологии и эпидемиологии ВГА обезьян,

на сегодняшний день остается много нерешенных вопросов. Большой интерес представляет сравнительный молекулярно-генетический анализ штаммов ВГА, выделенных от разных видов обезьян, обитающих в различных регионах мира. Его проведение могло бы существенно пополнить базу данных GenBank, в которой в настоящее время зарегистрировано единичное количество последовательностей, выделенных от приматов. Данные о генетическом разнообразии ВГА у приматов могут представлять большой интерес для проведения надзора за ВГА-инфекцией как среди обезьян, так и людей.

В связи с тем что обезьяны могут быть источником инфекции для обезьян, а человекообразные – и для людей, при импорте животных как в приматологические центры, так и в зоопарки необходим месячный карантин для этих животных, во время которого должен проводиться сбор фекальных образцов и сывороток крови для выявления маркеров текущей ВГА-инфекции. Кроме того, необходима вакцинация сотрудников и обслуживающего персонала для обеспечения протективного иммунитета, а также снижения вероятности передачи ВГА от человека обезьянам.

Также перспективными представляются поиск и выбор штаммов для моделирования ВГА-инфекции на обезьянах, поскольку экспериментальное воспроизведение этой инфекции на этих животных имеет большое значение для изучения еще нерешенных вопросов пато- и иммуногенеза, а также испытания новых препаратов и вакцин против ГА.

Вирус гепатита Е обезьян

Гепатит Е (ГЕ) среди вирусных гепатитов занимает особое место, так как может являться зоонозом и вызывать высокую смертность среди беременных женщин. Вирус гепатита Е (ВГЕ) представляет собой РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству *Hepeviridae*, роду *Orthohepevirus* [37].

Впервые ВГЕ-инфекция у обезьян была описана М.С. Балаяном и соавт. при экспериментальном заражении макак яванских с использованием экстракта фекалий после его опыта по самозаражению, приведшего к открытию ВГЕ [38]. Позже было показано, что многие виды обезьян рода макак (макаки резусы, макаки яванские, лапундеры, индийские, тайванские и японские макаки) восприимчивы к ВГЕ, что подтверждается выявлением антител к ВГЕ (анти-ВГЕ) как у диких, так и у обитающих в неволе приматов (табл. 3) [13, 39–45].

В табл. 3 приведены данные о выявлении анти-ВГЕ-IgM и анти-ВГЕ-IgG у обезьян разных видов из различных приматологических центров мира. Как видно, распространённость антител была широко изучена как у высших, так и у низших обезьян Старого Света.

Среди высших обезьян анти-ВГЕ не были обнаружены, тогда как у низших обезьян Старого Света они были выявлены в основном только у рода макак, за исключением суматранского лангура. У других видов низших обезьян Старого Света анти-ВГЕ обнаружены не были. Среди низших обезьян Нового Света

анти-ВГЕ также выявлены не были, однако исследования среди этих приматов носят единичный характер, а количество обследованных обезьян крайне мало.

Несмотря на то что у многих видов обезьян обнаруживаются анти-ВГЕ, на сегодняшний день данные о спонтанной ВГЕ-инфекции, подтверждённой выявлением у этих животных вирусной рибонуклеиновой кислоты (РНК), опубликованы только в 3 работах (табл. 4) [40, 42, 45–47]. В табл. 4 представлены данные о выделении РНК ВГЕ среди обезьян.

В исследовании Н. Yamamoto и соавт. был обнаружен ВГЕ генотипа 3 (ВГЕ-3) в сыворотке одной из об-

следованных японских макак, содержащихся в питомнике под открытым небом. Следует отметить, что РНК ВГЕ у этой обезьяны обнаруживалась в крови в течение 4 лет (2006–2009), а также в фекалиях, собранных в 2009 г. Анализ нуклеотидных последовательностей участка открытых рамок считывания (ОРС) 2 ВГЕ показал 100% идентичность всех образцов, полученных от этого животного, что свидетельствуют о длительной персистенции ВГЕ-инфекции у обезьяны, сопровождавшейся выделением вируса [44].

В 2019 г. F. Yang и соавт. опубликовали данные о выявлении РНК ВГЕ в образцах фекалий и сыворот-

Таблица 3. Частота выявления антител к вирусу гепатита E у различных видов обезьян
Table 3. The frequency of detection of antibodies to HEV in different species of monkeys

Вид обезьян / Species of monkeys	Маркер ВГЕ-инфекции / Markers of HEV infection		
	IgG (%)	IgM (%)	Источник / Reference
Человекообразные обезьяны / Apes			
Шимпанзе / Chimpanzee <i>Pan troglodytes</i>	0*	Н/д ***** N/d	R.H. Purcell и соавт. (2001) [13] M. Hirano и соавт. (2003) [39]
Орангутан / Orangutan <i>Pongo pygmaeus</i>	0*	Н/д N/d	M. Hirano и соавт. (2003) [39]
Кампучийский гиббон / Pileated gibbon <i>Hylobates pileatus</i>	0*	Н/д N/d	M. Hirano и соавт. (2003) [39]
Обезьяны Старого Света / The Old World monkeys			
Макаки / Macaques <i>Macaca mulatta, M. fascicularis, M. fuscata, M. nemestrina, M. assamensis, M. arctoides, M. radiata, M. cyclopis</i>	0–100 51,8** 16–37*** 0****	0–2,1*	S. Nakamura и соавт. (2012) [40] R.H. Purcell и соавт. (2001) [13] M. Hirano и соавт. (2003) [39] H. Yamamoto и соавт. (2008) [41] Л.И. Корзая и соавт. (2016) [42] Л.И. Корзая и соавт. (2021) [43] H. Yamamoto и соавт. (2012) [44] F. Huang и соавт. (2011) [45] L.I. Korzaya и соавт. (2016) [14]
Зелёные маргышки / Green monkeys <i>Chlorocebus aethiops, C. pygerythrus</i>	0*	0*	R.H. Purcell и соавт. (2001) [13] M. Hirano и соавт. (2003) [39] H. Yamamoto и соавт. (2008) [41] Л.И. Корзая и соавт. (2016) [42] Л.И. Корзая и соавт. (2021) [43]
Суматранский лангур / Black-crested Sumatran langur <i>Presbytis melalophos</i>	2*	Н/д N/d	R.H. Purcell (2001) и соавт. [13]
Маргышка-гусар / Patas monkey <i>Erythrocebus patas</i>	0*	Н/д N/d	M. Hirano и соавт. (2003) [39]
Павианы / Baboons <i>Papio hamadryas, P. anubis</i>	0*	0*	M. Hirano и соавт. (2003) [39] Л.И. Корзая и соавт. (2016) [42]
Обезьяны Нового Света / The New World monkeys			
Капуцины / Capuchins <i>Sapajus paella, Cebus albifrons</i>	0*	Н/д N/d	M. Hirano и соавт. (2003) [39]
Ночные обезьяны / Three-striped night monkey <i>Aotus trivirgatus</i>	0*	Н/д N/d	R.H. Purcell (2001) [13] M. Hirano и соавт. (2003) [39]
Беличий саймири / Squirrel monkey <i>Saimiri sciureus</i>	0*	Н/д N/d	R.H. Purcell (2001) [13] M. Hirano и соавт. (2003) [39]
Усатые тамарины / Saguinus mystax pileatus <i>Saguinus mystax</i>	0*	Н/д N/d	R.H. Purcell и соавт. (2001) [13]

Примечание. Н/д – Нет данных. *Рожденные в колонии. **Обитающие в естественных условиях. ***SPF-животные. ****Импортированные.

Note. N/d – no data. *Born in captivity. **Living in the wild. ***SPF animals. ****Imported.

Таблица 4. Выделение РНК вируса гепатита Е среди обезьян рода макак

Table 4. Isolation of HEV RNA among macaque monkeys

Вид обезьян / Species of monkeys	РНК ВГЕ (%) / HEV RNA (%)	Источник / Reference
Макаки резусы / Monkeys rhesus <i>Macaca mulatta</i>	0/3 (0)* 0/13 (0)* 10/48 (20,8)* 1/88 (1,1)**	F. Huang и соавт. (2011) [45] Л.И. Корзая и соавт. (2016) [42] F. Yang и соавт. (2019) [46] F. Yang и соавт. (2019) [46]
Макаки яванские / Cynomolgus monkeys <i>Macaca fascicularis</i>	0/12 (0)* 7/77 (9,1)*	S. Nakamura и соавт. (2012) [40] D.I. Dogadov и соавт. (2019) [47]
Японские макаки / Japanese macaque <i>Macaca fuscata</i>	1/25 (16)**	H. Yamamoto и соавт. (2012) [44]

Примечание. *Фекальные образцы. **Сыворотки крови.

Note. *Fecal samples. **Serum samples.

ки крови от макак резусов в возрасте 1–2 лет, содержащихся на ферме в китайской провинции Юньнань. Нуклеотидные последовательности, выделенные из фекальных образцов обезьян, были практически идентичны между собой (99,8–100%), относились к субгенотипу ВГЕ 4h и на 99,5–100% были идентичны последовательностям, выделенными в той же провинции от людей, свиней, коров и коз. В то же время последовательность ВГЕ, выделенная из сыворотки крови от одной из обезьян, обследованной в данной работе, принадлежала к субгенотипу ВГЕ 4b, который был выделен от свиней в Китае, а также среди людей в Японии и Камбодже. Уникальность этой последовательности подтвердил полногеномный анализ, согласно которому степень его сходства с другими вариантами субгенотипа 4b составляет 87,1–94,1% [46].

Ранее нами было описано выявление РНК ВГЕ в образцах фекалий от макак яванских, импортированных в Научно-исследовательский институт медицинской приматологии (Сочи) из Вьетнама. Филогенетический анализ показал принадлежность всех обнаруженных у обезьян последовательностей ВГЕ к IV генотипу. Также был проведен филодинамический анализ, согласно которому возраст общего предка вирусных последовательностей, выделенных от макак яванских, составил 5,2 года (доверительный интервал 3,47–10,15 года). Это позволяет предполагать, что ВГЕ-инфекция не явилась результатом заражения от одного источника инфекции, а вероятнее всего, отражает стабильную циркуляцию ВГЕ среди представителей данного вида в питомнике, откуда поступили животные [43, 47].

Обезьяны часто используются в качестве экспериментальной модели для изучения различных аспектов ВГЕ-инфекции. Наиболее распространенными моделями для экспериментального заражения ГЕ являются обезьяны рода макак (макаки резусы и макаки яванские), а также игрунковые обезьяны [48, 49].

Первые экспериментальные исследования по заражению обезьян штаммами ВГЕ, выделенными от человека, были проведены в начале 1990-х гг. [50, 51]. Во всех проведенных исследованиях ВГЕ-инфекция у обезьян протекала без клинических признаков, однако сопровождалась повышением таких биохимиче-

ских показателей, как АЛТ и АСТ, выделением вирусных частиц из фекальных образцов, крови и желчи, а также гистопатологическими изменениями.

В связи с тем что ВГЕ-инфекция во многих случаях наиболее тяжело протекает у беременных женщин, в 1995 г. S. Tsarev и соавт. провели исследование, в котором макаки резусы в I, II и III триместрах беременности были заражены изолятом ВГЕ, выделенным от беременной женщины со смертельным исходом. Сравнение гематологических, биохимических, гистопатологических и серологических маркеров не выявило увеличения тяжести протекания ВГЕ-инфекции у беременных животных. Признаков неонатальной инфекции ВГЕ у родившихся детёнышей также обнаружено не было [52].

В нашей стране на базе Института полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М.П. Чумакова были проведены исследования по экспериментальному заражению ВГЕ тамашинов (*Saguinus mystax*) и обыкновенных мармозет (*Callithrix jacchus*). Была разработана модель инфекции ВГЕ у обыкновенных мармозет. Были установлены оптимальный способ инфицирования, длительность, клинические и вирусологические характеристики ВГЕ-инфекции у этих животных [48], а также проведены испытания иммуногенных и протективных свойств кандидатной вакцины против ГЕ [49].

Для изучения зоонозных резервуаров ВГЕ-инфекции для человека был проведен ряд исследований, в которых штаммами ВГЕ, выделенными от различных животных, заражали обезьян рода макак [53–56].

L.G. de Carvalho и соавт. провели экспериментальное заражение макак яванских штаммами ВГЕ-3, выделенными от свиней и заболевших людей. У всех обезьян инфекция протекала без клинических признаков, однако сопровождалась сероконверсией, выявлением РНК ВГЕ в крови и фекалиях, а также биохимическими и гематологическими изменениями, при этом значимые различия, связанные с происхождением штаммов вирусов, использовавшихся для заражения, выявлены не были [53].

До настоящего время спорным оставался вопрос о возможности заражения крысиным ВГЕ (*Orthohepevirus C*) обезьян [54], однако в 2021 г. было проведено исследование, в котором 1 макака яванская

и 5 макак резусов были экспериментально заражены крысиным ВГЕ. Несмотря на то что изменений в биохимических показателях у животных не наблюдалось, РНК ВГЕ и сероконверсия были обнаружены у всех обезьян [55]. Эти данные свидетельствуют о том, что не только свиньи, но и крысы могут являться одним из резервуаров ВГЕ как для обезьян, так и для человека.

Также были предприняты попытки экспериментального заражения макак яванских ВГЕ, выделенным от кур (*Orthohepevirus B*), однако признаков инфекции у заражённых обезьян (выделение вируса, сероконверсия) обнаружено не было [56]. Тем не менее вызывают интерес проведённые исследования по экспериментальному заражению поросят штаммом вируса *Orthohepevirus B*, выделенным от птиц. У всех экспериментальных животных отсутствовали клинические признаки инфекции, однако в сыворотке и фекальных образцах выявлялась вирусная РНК. Данные этого исследования показывают, что ВГЕ птиц успешно преодолевает межвидовой барьер, переходя на свиней, а далее, вероятно, может перейти и на человека после успешной адаптации к репликации в свином организме [57].

На сегодняшний день представляет несомненный интерес выделение штаммов ВГЕ, циркулирующих среди обезьян в различных регионах мира, а также их генетическая характеристика. Кроме того, остаётся открытым вопрос, вовлечены ли штаммы ВГЕ, выделенные от обезьян, в зоонозную передачу инфекции человеку.

Исследования естественных резервуаров и экологии ВГЕ помогут понять масштабы и значение зоонозного риска этого вируса. Кроме того, в связи с тем что вакцины против ГЕ до сих пор находятся в разработке, экспериментальная модель ВГЕ на обезьянах будет иметь большое значение для оценки эффективности вакцин против уже существующих, а также против новых штаммов, особенно с зоонозным потенциалом. Это поможет свести к минимуму риск зоонозной передачи и повысить безопасность пищевых продуктов.

Учитывая потенциальную опасность передачи ВГЕ как обезьянам, так и обслуживающему персоналу, при импорте животных из различных регионов мира, также как и в случае с ВГА-инфекцией, необходим месячный карантин для снижения риска заражения. Учитывая подтверждённую возможность заражения обезьян ВГЕ крыс, в приматологических центрах и зоопарках необходимо вести борьбу с грызунами.

Заключение

Таким образом, за последние годы были получены данные о восприимчивости различных видов обезьян к ВГА. Кроме того, были выявлены важные сведения в области молекулярной биологии и современной лабораторной диагностики ВГА. Применение молекулярно-генетических методов позволило классифицировать и охарактеризовать штаммы человека и обезьян. Ранее считалось, что каждый вид обезьян имеет

свои уникальные штаммы ВГА, однако последние исследования показывают, что у приматов встречаются разные генотипы вируса.

Также в последние годы достигнуты большие успехи в изучении таксономии и экологии ВГЕ. Были открыты новые генотипы и субгенотипы, а также естественные хозяева ВГЕ, среди которых не только люди, но и различные виды животных, в том числе обезьяны. Несмотря на то что у обезьян часто выявляются анти-ВГЕ, на настоящий момент естественная ВГЕ-инфекция описана пока только в единичных публикациях. Обезьяны являются важной лабораторной моделью для изучения ВГЕ-инфекции, в том числе для оценки возможности межвидового перехода для разных представителей рода *Orthohepevirus*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Drexler J.F., Corman V.M., Lukashev A.N., van den Brand J.M.A., Gmyl A.P., Brünink S., et al. The Hepatovirus Ecology Consortium. Evolutionary origins of hepatitis A virus in small mammals. *PNAS*. 2015; 112(49): 15190–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516992112>
2. Sridhar S., Teng J.L.L., Chiu T.H., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. Hepatitis E virus genotypes and evolution: emergence of camel hepatitis E variants. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(4): 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms18040869>
3. Batts W., Yun S., Hedrick R., Winton J. A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Res.* 2011; 158(1-2): 116–23. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.03.019>
4. ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Genus: Hepatovirus; 2021. Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/picornaviridae/709/genus-hepatovirus
5. Hillis W.D. An outbreak of infectious hepatitis among chimpanzee handlers at a United States Air Force base. *Am. J. Hyg.* 1961; 73: 316–28. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120191>
6. Mosely J.W., Reinhardt H.P., Hassler F.R. Chimpanzee-associated hepatitis: an outbreak in Oklahoma. *JAMA*. 1967; 199(10): 105–7.
7. Robertson B.H., Jansen R.W., Khanna B., Totsuka A., Nainan O.V., Siegl G., et al. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J. Gen. Virol.* 1992; 73(6): 1365–77. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-6-1365>
8. Robertson B.H. Viral hepatitis and primates: historical and molecular analysis of human and nonhuman primate hepatitis A, B, and the GB-related viruses. *J. Viral. Hepat.* 2001; 8(4): 233–42. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.2001.00295.x>
9. Ruddy S.J., Mosley J.W., Held J.R. Chimpanzee-associated viral hepatitis in 1963. *Am. J. Epidemiol.* 1967; 86(3): 634–40. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120772>
10. Burke D.S., Graham R.R., Heisey G.B., Coursaget R., Levesque B., Gretillat E., et al. Hepatitis A virus in primates outside captivity. *Lancet*. 1981; 2(8252): 928. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(81\)91411-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(81)91411-2)
11. Smith M.S., Swanepoel P.J., Bootsma M. Hepatitis A in nonhuman primates in nature. *Lancet*. 1980; 2(8206): 1241–2. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(80\)92495-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(80)92495-2)
12. Kalter S.S., Heberling R.L., Cooke A.W., Barry J.D., Tian P.Y., Northam W.J. Viral infections of nonhuman primates. *Lab. Anim. Sci.* 1997; 47(5): 461–8.
13. Purcell R.H., Emerson S.U. Animal models of hepatitis A and E. *ILAR J.* 2001; 42(2): 161–77. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031815>
14. Korzaya L.I., Lapin B.A., Shevtsova Z.V., Krilova R.I. Spontaneous and experimental hepatitis A in Old World monkeys are the models of human hepatitis A. *Baltic J. Lab. Animal. Sci.* 2001; 11(2): 135–41.
15. Догаров Д.И., Корзая Л.И., Кюреган К.К., Карлсен А.А., Михайлов М.И., Лапин Б.А. Маркеры гепатита А у обезьян Адлерского приматологического центра. *Вопросы вирусологии*. 2019; 64(5): 246–9. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-246-249>

16. Корзая Л.И., Кебурия В.В., Гончаренко А.М., Догадов Д.И., Лапин Б.А. Маркёры вирусных инфекций у лабораторных приматов. В кн.: *Материалы второй международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии»*. Сочи; 2011: 79–88.
17. Drewe J.A., O’Riain M.J., Beamish E., Currie H., Parsons S. Survey of infections transmissible between baboons and humans, Cape Town, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(2): 298–301. <https://doi.org/10.3201/eid1802.111309>
18. Gust I.D., Lehmann N.I., Crowe S., McCrorie M., Locarnini S.A., Lucas C.R. The origin of the HM175 strain of hepatitis A virus. *J. Infect. Dis.* 1985; 151(2): 365–7. <https://doi.org/10.1093/infdis/151.2.365>
19. Balayan M.S., Kusov Yu.Yu., Andjaparidze A.G., Tsarev S.A., Sverdlov E.D., Chizhikov V.E., et al. Variations in genome fragments coding for RNA polymerase in human and simian hepatitis A viruses. *FEBS Lett.* 1989; 247(2): 425–8. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81384-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81384-5)
20. Nainan O.V., Margolis H.S., Robertson B.H., Balayan M., Brinton M.A. Sequence analysis of a new hepatitis A virus naturally infecting cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J. Gen. Virol.* 1991; 72(7): 1685–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-7-1685>
21. Van Cuyck-Gandré H., Cockman-Thomas R., Caudill J.D., Asher L.S., Armstrong K.L., Huroeder B., et al. Experimental African HEV infection in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J. Med. Virol.* 1998; 55(3): 197–202. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199807\)55:3<197::AID-JMV3>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199807)55:3<197::AID-JMV3>3.0.CO;2-X)
22. Lu L., Ching K.Z., de Paula V.S., Nakano T., Siegl G., Weitz M., et al. Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate). *J. Gen. Virol.* 2004; 85(10): 2943–52. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80304-0>
23. Cristina J., Costa-Mattioli M. Genetic variability and molecular evolution of hepatitis A virus. *Virus Res.* 2007; 127(2): 127–57. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.01.005>
24. Costa-Mattioli M., Di Napoli A., Ferre V., Billaud S., Perez-Bercoff R., Cristina J. Genetic variability of hepatitis A virus. *J. Gen. Virol.* 2003; 84(Pt. 12): 3191–201. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19532-0>
25. Khanna B., Spelbring J.E., Innis B.L., Robertson B.H. Characterization of a genetic variant of human hepatitis A virus. *J. Med. Virol.* 1992; 36(2): 118–24. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890360208>
26. Lemon S.M., LeDuc J.W., Binn L.N., Escajadillo A., Ishak K.G. Transmission of hepatitis A virus among recently captured Panamanian owl monkeys. *J. Med. Virol.* 1982; 10(1): 25–36. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890100105>
27. Анджапаридзе А.Г., Каретный Ю.В., Корзая Л.И., Балаян М.С., Титова И.П., Замятина Н.А. Эпизоотия гепатита А среди африканских зеленых мартышек, содержащихся в условиях вивария. *Вопросы вирусологии.* 1989; 34(3): 292–6.
28. Arankalle V.A., Ramakrishnan J. Simian hepatitis A virus derived from a captive rhesus monkey in India is similar to the strain isolated from wild African green monkeys in Kenya. *J. Viral. Hepat.* 2009; 16(3): 214–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2008.01060.x>
29. Bennett A.J., Sibley S.D., Lauck M., Weny G., Nyeroba D., Tumukunde A., et al. Naturally circulating Hepatitis A virus in olive baboons, Uganda. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(7): 1308–10. <https://doi.org/10.3201/eid2207.151837>
30. Dogadov D.I., Korzaya L.I., Karlsen A.A., Kyuregyan K.K. Molecular genetic identification of isolates of the hepatitis A virus (HAV) from monkeys at Adler primate center. *J. Med. Primatol.* 2018; 47(2): 87–92. <https://doi.org/10.1111/jmp.12333>
31. Анджапаридзе А.Г., Полещук В.Ф., Замятина Н.А., Савинов А.П., Гавриловская И.Н., Балаян М.С. Спонтанный гепатит у яванской макаки, подвергнутой воздействию иммунодепрессантов. *Вопросы вирусологии.* 1985; (4-С): 468–73.
32. Tsarev S.A., Emerson S.U., Balayan M.S., Ticehurst J., Purcell R.H. Simian hepatitis A virus (HAV) strain AGM-27: comparison of genome structure and growth in cell culture with other HAV strains. *J. Gen. Virol.* 1991; 72(7): 1677–83. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-7-1677>
33. Raychaudhuri G., Govindarajan S., Shapiro M., Purcell R.H., Emerson S.U. Utilization of chimeras between human (HM-175) and simian (AGM-27) strains of hepatitis A virus to study the molecular basis of virulence. *J. Virol.* 1998; 7(4): 7467–75. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.9.7467-7475.1998>
34. Лапин Б.А., Джикидзе Э.К., Крылова Р.И., Стасилевич З.К., Яковлева Л.А. *Проблемы инфекционной патологии обезьян*. М.: РАМН; 2004.
35. Полещук В.Ф., Балаян М.С., Анджапаридзе А.Г., Соболь А.В., Докин В.П., Гуляева Т.В. и др. Моделирование гепатита А и энтерально передающегося гепатита А и В (гепатит Е) на тамаринах *Saguinus mustax*. *Вопросы вирусологии.* 1990; 35(5): 379–82.
36. Полещук В.Ф., Михайлов М.И., Замятина Н.А. Приматные модели вирусных гепатитов человека. *Вопросы вирусологии.* 2006; 51(4): 6–13.
37. ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Genus: Hepeviridae; 2021. Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/hepeviridae
38. Balayan M.S., Andjaparidze A.G., Savinskaya S.S., Ketiladze E.S., Braginsky D.M., Savinov A.P., et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology.* 1983; 20(1): 23–31. <https://doi.org/10.1159/000149370>
39. Hirano M., Ding X., Li T.C., Takeda N., Kawabata H., Koizumi N., et al. Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepatol. Res.* 2003; 27(1): 1–5. [https://doi.org/10.1016/S1386-6346\(03\)00192-X](https://doi.org/10.1016/S1386-6346(03)00192-X)
40. Nakamura S., Tsuchiya H., Okahara N., Nakagawa T., Ohara N., Yamamoto H., et al. Epidemiology of hepatitis E virus in indoor-captive cynomolgus monkey colony. *J. Vet. Med. Sci.* 2012; 74(3): 279–83. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0394>
41. Yamamoto H., Li T.C., Koshimoto C., Ito K., Kita M., Miyashita N., et al. Serological evidence for hepatitis E virus infection in laboratory monkeys and pigs in animal facilities in Japan. *Exp. Anim.* 2008; 57(4): 367–76. <https://doi.org/10.1538/expanim.57.367>
42. Корзая Л.И., Кебурия В.В., Догадов Д.И., Лапин Б.А., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Маркёры гепатита Е у населения Большого Сочи и обезьян Адлерского приматологического центра. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61(4): 176–80. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-4-176-180>
43. Корзая Л.И., Догадов Д.И., Гончаренко А.М., Карлсен А.А., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Распространение маркёров респираторных вирусов человека среди обезьян Адлерского приматологического центра. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(6): 425–33. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-77>
44. Yamamoto H., Suzuki J., Matsuda A., Ishida T., Ami Y., Suzuki Y., et al. Hepatitis E virus outbreak in monkey facility, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(12): 2032–4. <https://doi.org/10.3201/eid1812.120884>
45. Huang F., Yu W., Hua X., Jing S., Zeng W., He Z. Seroepidemiology and molecular characterization of hepatitis E virus in Macaca Mulatta from a village in Yunnan, China, where infection with this virus is endemic. *Hepat. Mon.* 2011; 11(9): 745–9. <https://doi.org/10.5812/kowsar.1735143X.730>
46. Yang F., Duan S., Guo Y., Li Y., Yoshizaki S., Takeda N., et al. Current status of hepatitis E virus infection at a rhesus monkey farm in China. *Vet. Microbiol.* 2019; 230: 244–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.01.021>
47. Dogadov D.I., Korzaya L.I., Kyuregyan K.K., Karlsen A.A., Kichatova V.S., Potemkin I.A., et al. Natural infection of captive cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with hepatitis E virus genotype 4. *Arch. Virol.* 2019; 164(10): 2515–8. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04337-3>
48. Кюрегян К.К., Полещук В.Ф., Гордейчук И.В., Гуляева Т.В., Исаева О.В., Морозов И.А. и др. Моделирование вирусного гепатита Е на игрунковых обезьянах. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2015; 160(9): 355–9. <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3173-0>
49. Gordeychuk I., Kyuregyan K., Kondrashova A., Bayurova E., Gulyaev S., Gulyaeva T., et al. Immunization with recombinant ORF2 p551 protein protects common marmosets (*Callithrix jacchus*) against homologous and heterologous hepatitis E virus challenge. *Vaccine.* 2022; 40(1): 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.11.042>
50. Longer C.F., Denny S.L., Caudill J.D., Miele T.A., Asher L.V., Myint K.S., et al. Experimental hepatitis E: pathogenesis in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J. Infect. Dis.* 1993; 168(3): 602–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/168.3.602>
51. Van Cuyck-Gandré H., Cockman-Thomas R., Caudill J.D., Asher L.S., Armstrong K.L., Huroeder B., et al. Experimental African

- HEV infection in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J. Med. Virol.* 1998; 55(3): 197–202. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199807\)55:3<197::AID-JMV3>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199807)55:3<197::AID-JMV3>3.0.CO;2-X)
52. Tsarev S.A., Tsareva T.S., Emerson S.U., Rippey M.K., Zack P., Shapiro M., et al. Experimental hepatitis E in pregnant rhesus monkeys: failure to transmit hepatitis E virus (HEV) to offspring and evidence of naturally acquired antibodies to HEV. *J. Infect. Dis.* 1995; 172(1): 31–7. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.1.31>
 53. de Carvalho L.G., Marchevsky R.S., dos Santos D.R., de Oliveira J.M., de Paula V.S., Lopes L.M., et al. Infection by Brazilian and Dutch swine hepatitis E virus strains induces haematological changes in *Macaca fascicularis*. *BMC Infect. Dis.* 2013; 13(495): 495. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-495>
 54. Purcell R.H., Engle R.E., Rood M.P., Kabrane-Lazizi Y., Nguyen H.T., Govindarajan S., et al. Hepatitis E virus in rats, Los Angeles, California, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(12): 2216–22. <https://doi.org/10.3201/eid1712.110482>
 55. Yang F., Li Y., Li Y., Jin W., Duan S., Xu H., et al. Experimental Cross-Species Transmission of Rat Hepatitis E Virus to Rhesus and Cynomolgus Monkeys. *Viruses.* 2022; 14(2): 293. <https://doi.org/10.3390/v14020293>
 56. Huang F.F., Sun Z.F., Emerson S.U., Purcell R.H. Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(6): 1609–18. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79841-0>
 57. Михайлов М.И., Кюрегян К.К., Груздева К.Н. Вирус гепатита Е птиц. *Мир вирусных гепатитов.* 2005; (10): 8–11.
 14. Korzaya L.I., Lapin B.A., Shevtsova Z.V., Krilova R.I. Spontaneous and experimental hepatitis A in Old World monkeys are the models of human hepatitis A. *Baltic J. Lab. Animal. Sci.* 2001; 11(2): 135–41.
 15. Dogadov D.I., Korzaya L.I., Kyuregyan K.K., Karlsen A.A., Mikhaylov M.I., Lapin B.A. Markers of hepatitis A in the monkeys of the Adlers primate center. *Voprosy virusologii.* 2019; 64(5): 246–9. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2019-64-5-246-249> (in Russian)
 16. Korzaya L.I., Keburiya V.V., Goncharenko A.M., Dogadov D.I., Lapin B.A. Markers of laboratory primates' viral infections. In: *Materials of the 2nd International Scientific Conference «Fundamental and Applied Aspects of Medical Primatology» [Materialy vtoroy mezhduнародной nauchnoy konferentsii «Fundamental'nye i prikladnye aspekty meditsinskoy primatologii»]*. Sochi; 2011: 79–88. (in Russian)
 17. Drewe J.A., O'Riain M.J., Beamish E., Currie H., Parsons S. Survey of infections transmissible between baboons and humans, Cape Town, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(2): 298–301. <https://doi.org/10.3201/eid1802.111309>
 18. Gust I.D., Lehmann N.I., Crowe S., McCrorie M., Locarnini S.A., Lucas C.R. The origin of the HM175 strain of hepatitis A virus. *J. Infect. Dis.* 1985; 151(2): 365–7. <https://doi.org/10.1093/infdis/151.2.365>
 19. Balayan M.S., Kusov Yu.Yu., Andjaparidze A.G., Tsarev S.A., Sverdlov E.D., Chizhikov V.E., et al. Variations in genome fragments coding for RNA polymerase in human and simian hepatitis A viruses. *FEBS Lett.* 1989; 247(2): 425–8. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81384-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81384-5)
 20. Nainan O.V., Margolis H.S., Robertson B.H., Balayan M., Brinton M.A. Sequence analysis of a new hepatitis A virus naturally infecting cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J. Gen. Virol.* 1991; 72(7): 1685–9. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-7-1685>
 21. Van Cuyck-Gandr e H., Cockman-Thomas R., Caudill J.D., Asher L.S., Armstrong K.L., Hauroeder B., et al. Experimental African HEV infection in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J. Med. Virol.* 1998; 55(3): 197–202. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199807\)55:3<197::AID-JMV3>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199807)55:3<197::AID-JMV3>3.0.CO;2-X)
 22. Lu L., Ching K.Z., de Paula V.S., Nakano T., Siegl G., Weitz M., et al. Characterization of the complete genomic sequence of genotype II hepatitis A virus (CF53/Berne isolate). *J. Gen. Virol.* 2004; 85(10): 2943–52. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80304-0>
 23. Cristina J., Costa-Mattioli M. Genetic variability and molecular evolution of hepatitis A virus. *Virus Res.* 2007; 127(2): 127–57. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.01.005>
 24. Costa-Mattioli M., Di Napoli A., Ferre V., Billaudel S., Perez-Bercoff R., Cristina J. Genetic variability of hepatitis A virus. *J. Gen. Virol.* 2003; 84(Pt. 12): 3191–201. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19532-0>
 25. Khanna B., Spelbring J.E., Innis B.L., Robertson B.H. Characterization of a genetic variant of human hepatitis A virus. *J. Med. Virol.* 1992; 36(2): 118–24. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890360208>
 26. Lemon S.M., LeDuc J.W., Binn L.N., Escajadillo A., Ishak K.G. Transmission of hepatitis A virus among recently captured Panamanian owl monkeys. *J. Med. Virol.* 1982; 10(1): 25–36. <https://doi.org/10.1002/jmv.1890100105>
 27. Andzhaparidze A.G., Karetnyy Yu.V., Korzaya L.I., Balayan M.S., Titova I.P., Zamyatina N.A. Hepatitis A epizootic among African green monkeys kept in an animal house. *Voprosy virusologii.* 1989; 34(3): 292–6. (in Russian)
 28. Arankalle V.A., Ramakrishnan J. Simian hepatitis A virus derived from a captive rhesus monkey in India is similar to the strain isolated from wild African green monkeys in Kenya. *J. Viral. Hepat.* 2009; 16(3): 214–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2008.01060.x>
 29. Bennett A.J., Sibley S.D., Lauck M., Weny G., Hyeroba D., Tumukunde A., et al. Naturally circulating Hepatitis A virus in olive baboons, Uganda. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(7): 1308–10. <https://doi.org/10.3201/eid2207.151837>
 30. Dogadov D.I., Korzaya L.I., Karlsen A.A., Kyuregyan K.K. Molecular genetic identification of isolates of the hepatitis A virus (HAV) from monkeys at Adler primate center. *J. Med. Primatol.* 2018; 47(2): 87–92. <https://doi.org/10.1111/jmp.12333>
 31. Andzhaparidze A.G., Poleshchuk V.F., Zamyatina N.A., Savinov A.P., Gavrilovskaya I.N., Balayan M.S. Spontaneous hepatitis in *Macaca fascicularis* treated with immunosuppressing drugs. *Voprosy virusologii.* 1985; (4-S): 468–73. (in Russian)

REFERENCES

1. Drexler J.F., Corman V.M., Lukashev A.N., van den Brand J.M.A., Gmyl A.P., Br unink S., et al. The Hepatovirus Ecology Consortium. Evolutionary origins of hepatitis A virus in small mammals. *PNAS.* 2015; 112(49): 15190–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516992112>
2. Sridhar S., Teng J.L.L., Chiu T.H., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. Hepatitis E virus genotypes and evolution: emergence of camel hepatitis E variants. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(4): 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms18040869>
3. Batts W., Yun S., Hedrick R., Winton J. A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Res.* 2011; 158(1-2): 116–23. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.03.019>
4. ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Genus: Hepatovirus; 2021. Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/picornaviridae/709/genus-hepatovirus
5. Hillis W.D. An outbreak of infectious hepatitis among chimpanzee handlers at a United States Air Force base. *Am. J. Hyg.* 1961; 73: 316–28. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120191>
6. Mosely J.W., Reinhardt H.P., Hassler F.R. Chimpanzee-associated hepatitis: an outbreak in Oklahoma. *JAMA.* 1967; 199(10): 105–7.
7. Robertson B.H., Jansen R.W., Khanna B., Totsuka A., Nainan O.V., Siegl G., et al. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. *J. Gen. Virol.* 1992; 73(6): 1365–77. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-6-1365>
8. Robertson B.H. Viral hepatitis and primates: historical and molecular analysis of human and nonhuman primate hepatitis A, B, and the GB-related viruses. *J. Viral. Hepat.* 2001; 8(4): 233–42. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.2001.00295.x>
9. Ruddy S.J., Mosley J.W., Held J.R. Chimpanzee-associated viral hepatitis in 1963. *Am. J. Epidemiol.* 1967; 86(3): 634–40. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120772>
10. Burke D.S., Graham R.R., Heisey G.B., Coursaget R., Levesque B., Gretilat E., et al. Hepatitis A virus in primates outside captivity. *Lancet.* 1981; 2(8252): 928. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(81\)91411-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(81)91411-2)
11. Smith M.S., Swanepoel P.J., Bootsma M. Hepatitis A in nonhuman primates in nature. *Lancet.* 1980; 2(8206): 1241–2. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(80\)92495-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(80)92495-2)
12. Kalter S.S., Heberling R.L., Cooke A.W., Barry J.D., Tian P.Y., Northam W.J. Viral infections of nonhuman primates. *Lab. Anim. Sci.* 1997; 47(5): 461–8.
13. Purcell R.H., Emerson S.U. Animal models of hepatitis A and E. *ILAR J.* 2001; 42(2): 161–77. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031815>

32. Tsarev S.A., Emerson S.U., Balayan M.S., Ticehurst J., Purcell R.H. Simian hepatitis A virus (HAV) strain AGM-27: comparison of genome structure and growth in cell culture with other HAV strains. *J. Gen. Virol.* 1991; 72(7): 1677–83. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-7-1677>
33. Raychaudhuri G., Govindarajan S., Shapiro M., Purcell R.H., Emerson S.U. Utilization of chimeras between human (HM-175) and simian (AGM-27) strains of hepatitis A virus to study the molecular basis of virulence. *J. Virol.* 1998; 7(4): 7467–75. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.9.7467-7475.1998>
34. Lapin B.A., Dzhikidze E.K., Krylova R.I., Stasilevich Z.K., Yakovleva L.A. *Problems of Infectious Pathology in Monkeys [Problemy infektsionnoy patologii obez'yan]*. Moscow: RAS Publishing; 2004: 29–31. (in Russian)
35. Poleshchuk V.F., Balayan M.S., Andzhaparidze A.G., Sobol' A.V., Dokin V.P., Gulyaeva T.V., et al. The modelling of hepatitis A and of enterally transmitted non-A, non-B hepatitis (hepatitis E) in *Saguinus mystax* tamarins. *Voprosy virusologii.* 1990; 35(5): 379–82. (in Russian)
36. Poleshchuk V.F., Mikhaylov M.I., Zamyatina N.A. Primate models of human viral hepatitis. *Voprosy virusologii.* 2006; 51(4): 6–13. (in Russian)
37. ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. Genus: Hepeviridae; 2021. Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/hepeviridae
38. Balayan M.S., Andzhaparidze A.G., Savinskaya S.S., Ketiladze E.S., Braginsky D.M., Savinov A.P., et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology.* 1983; 20(1): 23–31. <https://doi.org/10.1159/000149370>
39. Hirano M., Ding X., Li T.C., Takeda N., Kawabata H., Koizumi N., et al. Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepatol. Res.* 2003; 27(1): 1–5. [https://doi.org/10.1016/S1386-6346\(03\)00192-X](https://doi.org/10.1016/S1386-6346(03)00192-X)
40. Nakamura S., Tsuchiya H., Okahara N., Nakagawa T., Ohara N., Yamamoto H., et al. Epidemiology of hepatitis E virus in indoor-captive cynomolgus monkey colony. *J. Vet. Med. Sci.* 2012; 74(3): 279–83. <https://doi.org/10.1292/jvms.11-0394>
41. Yamamoto H., Li T.C., Koshimoto C., Ito K., Kita M., Miyashita N., et al. Serological evidence for hepatitis E virus infection in laboratory monkeys and pigs in animal facilities in Japan. *Exp. Anim.* 2008; 57(4): 367–76. <https://doi.org/10.1538/expanim.57.367>
42. Korzaya L.I., Keburiya V.V., Dogadov D.I., Lapin B.A., Kyuregyan K.K., Mikhaylov M.I. Markers of hepatitis E among the population of the Greater Sochi and in monkeys of the Adler primate center. *Voprosy virusologii.* 2016; 61(4): 176–80. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-4-176-180> (in Russian)
43. Korzaya L.I., Dogadov D.I., Goncharenko A.M., Karlsen A.A., Kyuregyan K.K., Mikhaylov M.I. Prevalence of laboratory markers of human respiratory viruses in monkeys of Adler primate center. *Voprosy virusologii.* 2021; 66(6): 425–33. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-77> (in Russian)
44. Yamamoto H., Suzuki J., Matsuda A., Ishida T., Ami Y., Suzuki Y., et al. Hepatitis E virus outbreak in monkey facility, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(12): 2032–4. <https://doi.org/10.3201/eid1812.120884>
45. Huang F., Yu W., Hua X., Jing S., Zeng W., He Z. Seroepidemiology and molecular characterization of hepatitis E virus in Macaca Mulatta from a village in Yunnan, China, where infection with this virus is endemic. *Hepat. Mon.* 2011; 11(9): 745–9. <https://doi.org/10.5812/kowsar.1735143X.730>
46. Yang F., Duan S., Guo Y., Li Y., Yoshizaki S., Takeda N., et al. Current status of hepatitis E virus infection at a rhesus monkey farm in China. *Vet. Microbiol.* 2019; 230: 244–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.01.021>
47. Dogadov D.I., Korzaya L.I., Kyuregyan K.K., Karlsen A.A., Kichatova V.S., Potemkin I.A., et al. Natural infection of captive cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with hepatitis E virus genotype 4. *Arch. Virol.* 2019; 164(10): 2515–8. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04337-3>
48. Kyuregyan K.K., Poleshchuk V.F., Gordeychuk I.V., Gulyaeva T.V., Isaeva O.V., Morozov I.A., et al. Simulation of viral hepatitis E in marmosets. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny.* 2015; 160(9): 355–9. <https://doi.org/10.1007/s10517-016-3173-0> (in Russian)
49. Gordeychuk I., Kyuregyan K., Kondrashova A., Bayurova E., Gulyaev S., Gulyaeva T., et al. Immunization with recombinant ORF2 p551 protein protects common marmosets (*Callithrix jacchus*) against homologous and heterologous hepatitis E virus challenge. *Vaccine.* 2022; 40(1): 89–99. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.11.042>
50. Longer C.F., Denny S.L., Caudill J.D., Miele T.A., Asher L.V., Myint K.S., et al. Experimental hepatitis E: pathogenesis in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J. Infect. Dis.* 1993; 168(3): 602–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/168.3.602>
51. Van Cuyck-Gandré H., Cockman-Thomas R., Caudill J.D., Asher L.S., Armstrong K.L., Hauroeder B., et al. Experimental African HEV infection in cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). *J. Med. Virol.* 1998; 55(3): 197–202. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9071\(199807\)55:3<197::AID-JMV3>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9071(199807)55:3<197::AID-JMV3>3.0.CO;2-X)
52. Tsarev S.A., Tsareva T.S., Emerson S.U., Rippey M.K., Zack P., Shapiro M., et al. Experimental hepatitis E in pregnant rhesus monkeys: failure to transmit hepatitis E virus (HEV) to offspring and evidence of naturally acquired antibodies to HEV. *J. Infect. Dis.* 1995; 172(1): 31–7. <https://doi.org/10.1093/infdis/172.1.31>
53. de Carvalho L.G., Marchevsky R.S., dos Santos D.R., de Oliveira J.M., de Paula V.S., Lopes L.M., et al. Infection by Brazilian and Dutch swine hepatitis E virus strains induces haematological changes in *Macaca fascicularis*. *BMC Infect. Dis.* 2013; 13(495): 495. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-495>
54. Purcell R.H., Engle R.E., Rood M.P., Kabrane-Lazizi Y., Nguyen H.T., Govindarajan S., et al. Hepatitis E virus in rats, Los Angeles, California, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(12): 2216–22. <https://doi.org/10.3201/eid1712.110482>
55. Yang F., Li Y., Li Y., Jin W., Duan S., Xu H., et al. Experimental Cross-Species Transmission of Rat Hepatitis E Virus to Rhesus and Cynomolgus Monkeys. *Viruses.* 2022; 14(2): 293. <https://doi.org/10.3390/v14020293>
56. Huang F.F., Sun Z.F., Emerson S.U., Purcell R.H. Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *J. Gen. Virol.* 2004; 85(6): 1609–18. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79841-0>
57. Mikhaylov M.I., Kyuregyan K.K., Gruzdeva K.N. Avian hepatitis E virus. *Mir virusnykh gepatitov.* 2005; (10): 8–11. (in Russian)

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

https://doi.org/10.36233/0507-4088-111

© НОВИКОВ Д.В., МЕЛЕНТЬЕВ Д.А., 2022



Энтеровирусные (*Picornaviridae: Enterovirus*) (неполио) вакцины

Новиков Д.В.¹, Мелентьев Д.А.^{1,2}

¹ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, 603950, Нижний Новгород, Россия;

²ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского», 603022, Нижний Новгород, Россия

Неполиомиелитные энтеровирусы (НПЭВ) распространены повсеместно и являются одними из основных возбудителей заболеваний вирусной этиологии у детей. Наиболее часто НПЭВ инфицируют новорождённых и детей младшего возраста, что связано с отсутствием у них антител. У детей клинические проявления могут варьировать от острых лихорадочных заболеваний до тяжёлых осложнений, требующих госпитализации и приводящих в ряде случаев к инвалидности или летальному исходу. Заражение НПЭВ способно приводить к тяжёлым последствиям, таким как полиомиелитоподобные заболевания, серозный менингит, менингоэнцефалит, миокардит и др. Наиболее перспективной стратегией профилактики таких заболеваний является вакцинация. На территории России обнаружена циркуляция не менее 53 типов НПЭВ. Однако эпидемическое значение имеют возбудители экзантемных форм заболевания, асептического менингита и миокардита. При этом частота обнаружения НПЭВ в субъектах Российской Федерации характеризуется неравномерностью распределения и сезонными подъёмами. В обзоре обсуждается эпидемическая значимость разных типов энтеровирусов, в том числе актуальных для Российской Федерации, а также современные технологии, применяемые при создании энтеровирусных вакцин для профилактики тяжёлых заболеваний.

Ключевые слова: *неполиомиелитные энтеровирусы; вакцина; полиомиелитоподобные заболевания; энтеровирусная инфекция; вирусоподобные частицы*

Для цитирования: Новиков Д.В., Мелентьев Д.А. Энтеровирусные (*Picornaviridae: Enterovirus*) (неполио) вакцины. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(3): 185–192. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-111>

Для корреспонденции: Новиков Дмитрий Викторович, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии Нижегородского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия. E-mail: novikov.dv75@mail.ru

Участие авторов: Новиков Д.В., Мелентьев Д.А. – анализ литературы, написание текста статьи, утверждение окончательного варианта статьи.

Финансирование. Исследование проведено в рамках государственного задания Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор).

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

Поступила 26.04.2022

Принята в печать 02.06.2022

Опубликована 30.06.2022

REVIEW ARTICLE

https://doi.org/10.36233/0507-4088-111

Enteroviral (*Picornaviridae: Enterovirus*) (nonpolio) vaccines

Dmitriy V. Novikov¹, Dmitriy A. Melentev^{1,2}

¹Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 603950, Nizhny Novgorod, Russia;

²N.I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 603022, Nizhny Novgorod, Russia

Non-polio enteroviruses (NPEVs) are ubiquitous and are one of the main causative agents of viral infections in children. NPEVs most commonly infect newborns and young children, due to their lack of antibodies. In children, clinical manifestations can range from acute febrile illness to severe complications that require hospitalization and lead in some cases to disability or death. NPEV infections can have severe consequences, such as polio-like diseases, serous meningitis, meningoencephalitis, myocarditis, etc. The most promising strategy for preventing such diseases is vaccination. No less than 53 types of NPEVs have been found to circulate in Russia. However, of epidemic importance are the causative agents of exanthemic forms of the disease, aseptic meningitis and

myocarditis. At the same time, the frequency of NPEV detection in the constituent entities of the Russian Federation is characterized by uneven distribution and seasonal upsurges. The review discusses the epidemic significance of different types of enteroviruses, including those relevant to the Russian Federation, as well as current technologies used to create enterovirus vaccines for the prevention of serious diseases.

Keywords: *Non-polio enteroviruses; vaccine; polio-like diseases; enterovirus infection; virus-like particles*

For citation: Novikov D.V., Melentev D.A. Enteroviral (*Picornaviridae: Enterovirus*) (nonpolio) vaccines. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(3): 185–192 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-111>

For correspondence: Dmitri V. Novikov, Ph.D. (Biol.), Senior Researcher of Laboratory of Immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russia. E-mail: novikov.dv75@mail.ru

Information about the authors:

Novikov D.V., <https://orcid.org/0000-0001-7049-6935>

Melentyev D.A., <https://orcid.org/0000-0002-2441-6874>

Contribution: Novikov D.V., Melentev D.A., literature analysis, writing of the text, approval of the final version of the article.

Funding. The study was funded by the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor) as part of the federal program.

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

Received 26 April 2022

Accepted 02 June 2022

Published 30 June 2022

Введение

Энтеровирусы (*Viruses, Riboviria, Orthornavirae, Pisuviricota, Pisoniviricetes, Picornavirales, Picornaviridae, Enterovirus*) – повсеместно распространённые небольшие (около 30 нм) безоболочечные вирусы с геномом, представленным рибонуклеиновой кислотой (РНК) позитивной полярности. Энтеровирусы инфицируют широкий круг позвоночных животных. По данным Международного комитета по таксономии вирусов, в настоящее время к роду *Enterovirus* относят более 300 представителей. На основе генетических, иммунологических характеристик и сродства вирусов к рецепторам клетки род разделяют на 15 видов: 12 видов *Enterovirus*, обозначенных буквами от А до L, и 3 вида *Rhinovirus* – от А до С [1]. Базируясь на серологических и генетических характеристиках, внутри видов выделяют различные типы вирусов [2].

Среди собственно энтеровирусов патогенными для человека являются энтеровирусы 106 типов, относящиеся к четырем видам: *Enterovirus A* – 20 типов, *Enterovirus B* – 59 типов, *Enterovirus C* – 23 типа, *Enterovirus D* – 4 типа. К неполиомиелитным энтеровирусам (НПЭВ) относятся вирусы 103 типов, за исключением полиовирусов 1, 2, 3-го типа вида *Enterovirus C* [3]. Изучение глобальной распространённости и распределения типов НПЭВ показало, что представители вида *Enterovirus B* обнаруживаются по всему миру. В то же время представители *Enterovirus A* чаще других обнаруживаются в Азии, а *Enterovirus C* – в Африке [4].

Энтеровирусы – это широко распространённые вирусные агенты, являющиеся одним из основных возбудителей заболеваний человека вирусной этиологии. Например, в США энтеровирусы вызывают не менее 10–15 млн симптоматических инфекций в год [5]. НПЭВ имеют большую значимость в инфекционной патологии детей первых лет жизни, периодически вызывая массовые вспышки [6]. В Российской Феде-

рации многолетняя динамика заболеваемости энтеровирусной инфекцией характеризовалась устойчивой тенденцией к росту и периодическими подъемами. До пандемии COVID-19 средний показатель заболеваемости энтеровирусными инфекциями составлял 7,02 на 100 тыс. населения, при этом удельный вес детей до 17 лет был более 90% [7]. Однако при проведении противоэпидемических мероприятий по профилактике новой коронавирусной инфекции зарегистрирован спад заболеваемости, вызванной НПЭВ. Это указывает на возможное уменьшение иммунной прослойки к НПЭВ и риск эпидемического подъёма заболеваемости в последующие годы [8].

Целью настоящей работы является обзор современных данных о заболеваниях, вызываемых НПЭВ, их распространённости, существующих и новых подходах к разработке вакцин для профилактики энтеровирусной (неполио) инфекции.

Заболевания, вызванные неполиомиелитными энтеровирусами

НПЭВ являются причиной широкого спектра заболеваний, включая энцефалит, менингит, миокардит, экзантему полости рта и конечностей (HFMD – Hand, Foot and Mouth Disease), конъюнктивит, респираторные и желудочно-кишечные заболевания, но большинство инфекций, связанных с НПЭВ, остаются бессимптомными. НПЭВ легко передаются от человека к человеку с использованием фекально-орального механизма или воздушно-капельным путём и могут поражать людей разных возрастных групп. Симптомы появляются через 3–7 дней после заражения. С появлением симптомов вирусная РНК детектируется в периферической крови, носоглоточных смывах и фекалиях, а при наличии осложнений – в спинномозговой жидкости [9]. У взрослых заболевания обычно протекают бессимптомно или характеризуются лёгким течением, которое в основ-

ном описывается как респираторное. Наиболее часто НПЭВ инфицируют новорождённых и детей младшего возраста, что связано с отсутствием у них антител. У детей клинические проявления могут варьировать от острых лихорадочных заболеваний до тяжёлых осложнений, требующих госпитализации и приводящих в ряде случаев к инвалидности или летальному исходу. Например, в Восточной и Юго-Восточной Азии частота госпитализаций с диагнозом HFMD составила около 6% от всех заболевших, из которых у 20% развивались осложнения, связанные с поражением центральной нервной системы, а 5% умирали [10]. Причины неблагоприятного течения заболевания остаются во многом непонятными. Однако в ряде исследований было показано, что генетические особенности хозяина и чрезмерная продукция различных цитокинов (цитокиновый шторм) коррелируют с тяжёлым течением заболевания [11].

НПЭВ разных типов могут быть причиной сходных по клинике заболеваний. При этом установлена преимущественная связь определённых типов энтеровируса со специфической клинической картиной. Так, представители вида *Enterovirus A* ответственны более чем за 90% случаев энтеровирусной экзантемы, которая может проявляться в форме HFMD, атипичной экзантемы и герпетической ангины [12]. Основными возбудителями, вызывающими вспышки HFMD во всём мире, являются *Enterovirus (EV) A71 (EV-A71)* [13] и *Coxsackievirus (CV) A16 (CVA16)* [14]. С начала XXI в. в странах Азиатско-Тихоокеанского региона к ним присоединился CVA6 [15], а также CVA10, который сформировал вариант с повышенной нейровирулентностью [16]. Представители вида *Enterovirus B* чаще вызывают такие серьёзные, требующие госпитализации заболевания, как серозный энтеровирусный менингит, энцефалит, миелит и миокардит. Этиологическими агентами энтеровирусного менингита преимущественно являются типы *Echovirus (E) – E6, E7, E9, E11, E30* и др. Фактически вспышки асептического менингита и энцефалита по всему миру в основном связаны с различными типами *Echovirus* [17] и CVB5 [18]. Вирусы CVB6 являются этиологической причиной разных клинических форм заболевания, включая HFMD и острый миокардит. В США CVB3 ежегодно вызывает 20 000–40 000 случаев острого миокардита, при этом у 3–8 из каждых 100 тыс. больных развивается дилатационная кардиомиопатия [19]. НПЭВ вида *Enterovirus C* могут вызывать HFMD, герпангину, асептический менингит и др. Особое эпидемическое значение приобрёл вариант CVA24v, вызвавший вспышки острого геморрагического конъюнктивита в ряде стран [20]. EV-D68, относящийся к виду *Enterovirus D*, известен как вирус, вызывающий вспышки полиомиелитоподобных острых вялых миелитов, в том числе с летальными исходами, в США и некоторых странах Европы с 2014 г. Циркуляция этого вируса зафиксирована в Западной Европе, Северной Америке, Африке, Юго-Восточной Азии [21].

На территории России обнаружена циркуляция не менее 53 типов НПЭВ: *Enterovirus A (CVA2-A6,*

A8, A10, A14, A16, EV-A71, A76, A120); Enterovirus B (CVA9, CVB1-6, E1-7, E9, E11, E13-19, E21, E22, E24, E29, E30, E31, E33, EV-B75); Enterovirus C (CVA1, A13, A17, A20, A21, A22, A24, EV-C99, C113, C116); Enterovirus D (EV-D68). Однако эпидемическое значение имеют возбудители экзантемных форм заболевания (CVA6, CVA10, CVA16, EV-A71), асептического менингита (E30, E6, CVB5) и миокардита (CVB3). Суммарная доля данных вирусов превышает 50% от всех НПЭВ, идентифицированных на территории России [22, 23]. При этом частота обнаружения НПЭВ в субъектах Российской Федерации характеризуется неравномерностью распределения и сезонными подъёмами. Дальневосточный федеральный округ характеризуется наиболее высокой частотой обнаружения НПЭВ, а на Кавказе НПЭВ детектируются реже, чем в других регионах. Сезонный подъём заболеваемости, вызванный НПЭВ, регистрируется в августе–сентябре [7].

Структурная организация энтеровирусов

Геном энтеровирусов представлен однонитевой линейной РНК позитивной полярности размером 7,1–7,4 kb и включает концевые нетранслируемые регионы, фланкирующие одну открытую рамку считывания, кодирующую полипротеин размером 2100 аминокислот. В процессе трансляции происходит каскад расщепления полипротеина вирусными протеазами 2A и 3C сначала на три белка-предшественника (P1, P2 и P3), затем на функциональные белки. P1 расщепляется на четыре структурных белка (VP1, VP2, VP3, VP4), а P2 и P3 – на семь неструктурных белков (P2-2Apro, 2B, 2C, P3-3A, 3B, 3Cpro, 3Dpol). Четыре структурных белка путём самосборки формируют основной строительный блок капсида вириона – протомер. Пять протомеров образуют пентамер, а 12 пентамеров и вирусный геном образуют икосаэдральный вирион диаметром 30 нм с pseudo-T = 3 типом симметрии. Белки VP1, VP2 и VP3, представленные на поверхности вириона, формируют структуры, отвечающие за распознавание рецептора [24].

Капсидные белки являются основными антигенами вириона. На белках VP1, VP2 и VP3 обнаружены линейные и конформационные эпитопы, связывание с которыми антител приводит к нейтрализации вируса [25]. Высокая варибельность аминокислотных последовательностей поверхностных белков НПЭВ приводит к тому, что антитела, нейтрализующие один тип вируса, не способны нейтрализовать другие типы. Неструктурные белки также содержат В- и Т-клеточные эпитопы, некоторые из которых вызывают перекрестные иммунные реакции с разными типами НПЭВ [11].

Иммунный ответ на неполиомиелитные энтеровирусы

К настоящему времени известно, что для эффективной защиты организма от инфекции НПЭВ достаточно нейтрализующих антител, которые в большинстве случаев предотвращают заражение или останавлива-

ют прогрессирование заболевания. На примере больных HFMD было показано, что антитела класса IgM к вирусу EV-A71 детектировались уже через день после появления клинических симптомов, а антитела класса IgG – на 3–6-й день. Продукция нейтрализующих антител в большинстве случаев приводит к выздоровлению. У пациентов с поражением центральной нервной системы титры нейтрализующих антител не отличались от соответствующих титров у пациентов с лёгким течением HFMD. После выздоровления антитела IgM сохранялись в сыворотке крови в течение месяцев, а IgG детектировались несколько лет [26]. Следует отметить, что антитела класса IgG против НПЭВ могут передаваться от матери к плоду и сохраняться в периферической крови ребёнка в течение нескольких месяцев после рождения [27].

Сероэпидемиологические исследования показали, что частота обнаружения антител к НПЭВ варьирует в зависимости от типа вируса, возрастной группы населения, времени и места проведения исследования. Общей закономерностью является увеличение частоты обнаружения антител к НПЭВ с увеличением возраста детей. У младенцев 5–12 мес частота обнаружения антител составляет 4–18%, а в возрастной группе 7–19 лет она возрастает до 30–50% с последующим сохранением данного показателя у взрослых [28].

Вакцины против неполиомиелитных энтеровирусов

В связи со значимостью в инфекционной патологии детей ведется разработка вакцин против разных эпидемических типов НПЭВ. Эпидемии, связанные с EV-A71, стали серьёзной угрозой для общественного здравоохранения в Азиатско-Тихоокеанском регионе, что определило усилия в первую очередь китайских исследователей по разработке типоспецифических вакцин для профилактики HFMD. Наибольшее распространение приобрела классическая технология получения вакцин путём инактивации цельных вирионов. Тремя разработчиками (Sinovac Biotech, Beijing Vigoo Biological и Китайской академией медицинских наук) были получены три инактивированные вакцины против EV-A71. В клинических испытаниях все три вакцины показали безопасность и высокую эффективность для профилактики заболеваний, ассоциированных с EV-A71. В настоящее время китайскими компаниями получена лицензия на производство инактивированных вакцин против EV-A71 для детей до 5 лет. При этом вакцина фирмы Sinovac Biotech, основанная на использовании вируса субгенотипа С4, показала 95% эффективность против HFMD, вызванной EV-A71, и 100% защиту от инфекции EV-A71 с неврологическими симптомами [29]. Вакцина вызывала устойчивый, в течение 5 лет, иммунитет против различных генотипов EV-A71. В связи с этим Всемирная организация здравоохранения полагает, что она может быть использована во всём мире [30]. На Тайване для производства инактивированной вакцины против EV-A71 использовали вирус генотипа В4. Вакцина вызывала продукцию нейтрализующих антител против EV-A71 разных генотипов и не обла-

дала серьёзными побочными эффектами, а антитела сохранялись не менее 2 лет. В настоящий момент вакцина проходит 3-й этап испытаний [31]. Имеются сообщения о разработке типоспецифических моновалентных и комбинированных вакцин на основе инактивированных вирусов CVA16, CVA6, CVA10. По результатам доклинических испытаний хорошую иммуногенность и протективные свойства показали моновалентная вакцина против CVA16 и двухвалентная против EV-A71 и CVA16 [32].

Ведутся исследования, направленные на получение живых вакцин на основе аттенуированных вирусов. В процессе адаптации CVA16 к диплоидной линии эмбриональных клеток лёгких человека KMB17 был получен аттенуированный штамм K168-8Ac. При вакцинации макак резусов штаммом K168-8Ac была показана высокая эффективность защиты от инфекции CVA16 [33]. Для получения аттенуированных вирусов широко применяется создание инфекционных клонов комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты НПЭВ. На примере EV-A71 определено, что мутации в 5'-нетранслируемом регионе РНК или аминокислотные замены в белках вируса приводят к снижению вирулентности *in vitro* и *in vivo*. Установлено, что замена цитозина на урацил в позиции 158 РНК снижала скорость трансляции полипротеина и вирулентность EV-A71 [34]. Аминокислотные замены в VP1 (G64R или G64T) и 3D полимеразе (S264L и L123F) также снижали вирулентность EV-A71 [35, 36]. Р.Т.И. Yee и соавт. сконструировали штамм EV-A71 (pYU), в геном которого были встроены нуклеотидные последовательности, являющиеся мишенью для двух микроРНК (let-7a и miR-124a). Это приводило к уменьшению числа копий РНК вируса по сравнению с диким типом в клетках, имеющих различное тканевое происхождение. Вакцинация штаммом pYU защищала мышей от смертельной дозы EV-A71 [37]. В США группой учёных создан живой ослабленный штамм CVB3 (Mt10), имеющий аминокислотную замену в VP1 (H790A). Иммунизация мышей штаммом Mt10 защищала их как от миокардита, так и от панкреатита [38].

Следует отметить, что живые аттенуированные вакцины являются высокоиммуногенными препаратами, однако их использование для создания поливалентных энтеровирусных вакцин несёт риски. Для НПЭВ показано, что межвидовая и внутривидовая рекомбинации между геномами являются одним из факторов формирования новых эпидемических вариантов. При попадании вакцинных штаммов в организм, инфицированный диким вирусом, возникает риск формирования вариантов НПЭВ с непредсказуемыми свойствами [39].

В качестве альтернативы инактивированным и живым аттенуированным вакцинам разрабатываются субъединичные вакцины. К настоящему времени в аминокислотных последовательностях поверхностных белков НПЭВ обнаружено множество консервативных линейных эпитопов, являющихся мишенями для нейтрализующих антител. Использование пептида SP70 VP1 EV-A71 (208–222 аминокислоты) для вакцинации показало, что антисыворотка против SP70 пас-

сивно защищала новорождённых мышей как от гомологичных, так и от гетерологичных штаммов EV-A71. Y.X. Li и соавт. разработали пептид, состоящий из трёх линейных эпитопов белка VP1 EV-A71, последовательно соединённых линкером (Gly4Ser). Однако, несмотря на применение адъювантов, титры нейтрализующих антител после иммунизации мышей пептидами были в 4 раза ниже, чем у мышей, иммунизированных инактивированной вакциной [40].

Для повышения иммуногенности субъединичных вакцин проводятся исследования по встраиванию пептидов поверхностных белков НПЭВ в другие вирусы и вирусоподобные частицы (ВпЧ). X. Tian и соавт. сообщили о включении эпитопа SP70 EV-A71 в экспонируемые на поверхности домены гексона аденовируса III типа (*Mastadenovirus: Human adenovirus B: Human adenovirus 3*). Конструкция была способна вызывать гуморальный ответ, специфичный для эпитопа SP70 [41]. Основной антиген (НВс) вируса гепатита В (*Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*) был использован для формирования вирусоподобных частиц с экспонируемым на поверхности эпитопом VP2 CVA10 (136–150 а.к.). Такие ВпЧ вызывали сильный гуморальный ответ у мышей, а антитела нейтрализовали как штамм-прототип, так и другие клинические изоляты CVA10 [42]. L. Jiang и соавт. сконструировали Р-частицы норовируса (*Caliciviridae: Norovirus*), экспонирующие на поверхности эпитопы капсидных белков EV-A71. Наибольшую эффективность показал эпитоп VP3 (176–190 аминокислоты), использование которого в составе Р-частицы для иммунизации самок мышей позволяло защитить рождённых ими мышат от летальной дозы EV-A71 в период лактации [43]. В нашей работе на основе белка VP1 норовируса были получены ВпЧ, презентующие на поверхности полноразмерный VP1 E30 [44].

При исследовании самосборки вирионов НПЭВ было установлено, что для формирования ВпЧ энтеровирусов достаточна совместная экспрессия только Р1 и 3С областей генома. Причём самосборка происходила при экспрессии в клетках как насекомых [45], так и дрожжей [46]. Данное наблюдение было использовано для получения ВпЧ НПЭВ в качестве антигена для вакцины. Группа исследователей из Китая на основе ВпЧ основных возбудителей HFMD (EV-A71, CVA16, CVA6, CVA10) создала четырехвалентную вакцину и продемонстрировала её способность вызывать у мышей протективный иммунитет против исследуемых вирусов. Титры нейтрализующих антител были сравнимы с соответствующими моновалентными вакцинами и защищали мышей как от единичного, так и от смешанного инфицирования вирусами EV-A71, CVA16, CVA6, CVA10 [47]. Подобным образом были получены ВпЧ EV-A71 генотипа С4а, явившегося причиной вспышки HFMD в Корее в 2009 г., при которой заболевание характеризовалось частыми поражениями центральной нервной системы [48]. Также с использованием клеток насекомых получены ВпЧ CVB3 и CVB1 и разработана технология их производства с повышенным выходом и чистотой про-

дукта [49]. В целом показано, что такие ВпЧ индуцируют сильный и длительный гуморальный иммунный ответ и перспективны для разработки высокоэффективных вакцин против энтеровирусов.

Совместная экспрессия белка-предшественника Р1 и протеазы 3CD также приводила к самосборке ВпЧ энтеровирусов в дрожжах. С. Zhang и соавт. получили высокий выход рекомбинантных ВпЧ EV-A71 в клетках *Pichia pastoris*. При иммунизации мышей такие ВпЧ индуцировали высокие титры антител, способных нейтрализовать различные штаммы EV-A71. Что ещё более важно, иммунизация самок защищала рождённых ими мышат от летального исхода при заражении EV-A71 [50]. Z. Yang и соавт. сообщили о получении штамма *P. pastoris* с высоким уровнем продукции ВпЧ, который составил 270 мг/л [51]. Опубликованы результаты успешных доклинических испытаний данной кандидатной вакцины на грызунах и приматах, что послужило основанием для проведения клинических испытаний [52]. Также в клетках *P. pastoris* получены ВпЧ EV-D68. Мыши, иммунизированные такими ВпЧ, продуцировали антитела, нейтрализующие вирус в условиях *in vitro*. Вакцинация самок защищала рождённых ими мышат-сосунков от летальных доз вируса. Пассивный перенос сывороток, содержащих антитела против полученных ВпЧ, обеспечивал полную защиту мышей-реципиентов [53]. L. Sherry и соавт. с использованием генетического материала термостабильного мутантного штамма PV-1 получили в *P. pastoris* ВпЧ, которые имели общие характеристики с ВпЧ, продуцируемыми клетками млекопитающих. Авторы заключили, что ВпЧ полиовируса, полученные в дрожжах, являются многообещающей системой для крупномасштабного производства полиовирусных вакцин [54].

Заключение

НПЭВ являются одними из основных склонных к эпидемическому распространению возбудителей заболеваний вирусной этиологии у детей младшего возраста, вызывающих заболевания с различной клинической картиной. В связи с этим в мире ведется разработка вакцин против разных эпидемических типов НПЭВ. Для предотвращения вспышек экзантемных заболеваний в Юго-Восточной Азии разработаны инактивированные типоспецифические вакцины для профилактики HFMD, связанной с ЭВ-A71, разрабатываются поливалентные вакцины на основе инактивированных вирусов CVA16, CVA6, CVA10. Также исследуется применимость альтернативных подходов, основанных на аттенуированных вирусах, субъединичных вакцинах и ВпЧ. Обзор литературных данных показал, что ВпЧ являются привлекательной платформой для разработки более безопасных вакцин против как заболеваний, вызванных НПЭВ, так и полиомиелита. В ВпЧ отсутствует вирусный геном, они безопасны в производстве и применении. Развитие биотехнологии на современном этапе позволяет использовать ВпЧ для разработки поливалентных энтеровирусных вакцин нового поколения, облада-

ющих высокой иммуногенностью и возможностью непрерывной модернизации, позволяющей заменять антигены в составе вакцины на актуальные.

ЛИТЕРАТУРА

- International committee on taxonomy of viruses (ICTV). Genus: Enterovirus. Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus
- Oberste M.S., Maher K., Kilpatrick D.R., Pallansch M.A. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J. Virol.* 1999; 73(3): 1941–8. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.3.1941-1948.1999>
- Simmonds P., Gorbalenya A.E., Harvala H., Hovi T., Knowles N.J., Lindberg A.M., et al. Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses. *Arch. Virol.* 2020; 165(3): 793–7. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04520-6>
- Brouwer L., Moreni G., Wolthers K.C., Pajkrt D. World-wide prevalence and genotype distribution of enteroviruses. *Viruses.* 2021; 13(3): 434. <https://doi.org/10.3390/v13030434>
- Wells A.I., Coyne C.B. Enteroviruses: A gut-wrenching game of entry, detection, and evasion. *Viruses.* 2019; 11(5): 460. <https://doi.org/10.3390/v11050460>
- Harvala H., Benschop K.S.M., Berginc N., Midgley S., Wolthers K., Simmonds P., et al. European non-polio enterovirus network: introduction of hospital-based surveillance network to understand the true disease burden of non-polio enterovirus and parechovirus infections in Europe. *Microorganisms.* 2021; 9(9): 1827. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091827>
- Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году». М.; 2020.
- Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году». М.; 2021.
- Cheng H.Y., Huang Y.C., Yen T.Y., Hsia S.H., Hsieh Y.C., Li C.C., et al. The correlation between the presence of viremia and clinical severity in patients with enterovirus 71 infection: a multi-center cohort study. *BMC Infect. Dis.* 2014; 14: 417. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-417>
- Koh W.M., Badaruddin H., La H., Chen M.I.C., Cook A.R. Severity and burden of hand, foot and mouth disease in Asia: a modeling study. *BMJ Glob. Health.* 2018; 3(1): e000442. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2017-000442>
- Aw-Yong K.L., NikNadia N.M.N., Tan C.W., Sam I.C., Chan Y.F. Immune responses against enterovirus A71 infection: Implications for vaccine success. *Rev. Med. Virol.* 2019; 29(5): e2073. <https://doi.org/10.1002/rmv.2073>
- Ni H., Yi B., Yin J., He T., Du Y., Wang J., et al. Epidemiological and etiological characteristics of hand, foot and mouth disease in Ningbo, China, 2008–2011. *J. Clin. Virol.* 2012; 54(4): 342–8. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.04.021>
- Yee P.T.I., Poh L.C. Impact of genetic changes, pathogenicity and antigenicity on Enterovirus-A71 vaccine development. *Virology.* 2017; 506: 121–9. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.03.017>
- Mao Q., Wang Y., Yao X., Bian L., Wu X., Xu M., et al. Coxsackievirus A16: epidemiology, diagnosis, and vaccine. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2014; 10(2): 360–7. <https://doi.org/10.4161/hv.27087>
- Li J.L., Yuan J., Yang F., Wu Z.Q., Hu Y.F., Xue Y., et al. Epidemic characteristics of hand, foot, and mouth disease in southern China, 2013: coxsackievirus A6 has emerged as the predominant causative agent. *J. Infect.* 2014; 69(3): 299–303. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.04.001>
- Yang Q., Ding J., Cao J., Huang Q., Hong C., Yang B. Epidemiological and etiological characteristics of hand, foot, and mouth disease in Wuhan, China from 2012 to 2013: outbreaks of coxsackieviruses A10. *J. Med. Virol.* 2015; 87(6): 954–60. <https://doi.org/10.1002/jmv.24151>
- Kim H.J., Kang B., Hwang S., Hong J., Kim K., Cheon D.S. Epidemics of viral meningitis caused by echovirus 6 and 30 in Korea in 2008. *Virol. J.* 2012; 9: 38. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-38>
- Chen P., Tao Z., Song Y., Liu G., Wang H., Liu Y., et al. A coxsackievirus B5-associated aseptic meningitis outbreak in Shandong Province, China in 2009. *J. Med. Virol.* 2013; 85(3): 483–9. <https://doi.org/10.1002/jmv.23478>
- Kim D.S., Nam J.H. Characterization of attenuated coxsackievirus B3 strains and prospects of their application as live-attenuated vaccines. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2010; 10(2): 179–90. <https://doi.org/10.1517/14712590903379502>
- Sousa I.P. Jr., Burlandy F.M., Ferreira J.L., Alves J.C.S., Sousa-Júnior E.C., Tavares F.N., da Silva E.E. Re-emergence of a coxsackievirus A24 variant causing acute hemorrhagic conjunctivitis in Brazil from 2017 to 2018. *Arch. Virol.* 2019; 164(4): 1181–5. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04157-5>
- Holm-Hansen C.C., Midgley S.E., Fischer T.K. Global emergence of enterovirus D68: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* 2016; 16(5): e64–75. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00543-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00543-5)
- Golitsyna L.N., Zverev V.V., Fomina S.G., Sozonov D.V., Novikova N.A. Enterovirus infection in the Russian Federation in 2008–2018. *Infektsiya i immunitet.* 2018; 8(4): 558. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2018-4-3.16>
- Сапег Е.Ю., Бутакова Л.В., Троценко О.Е., Зайцева Т.А., Гарбуз Ю.А., Балахонов С.В. и др. Роль молекулярно-генетических методов исследования в выявлении потенциальных рисков завоза энтеровирусной инфекции на территорию Хабаровского края. *Здоровье населения и среда обитания.* 2018; (2): 44–51. <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2018-299-2-44-51>
- Yuan J., Shen L., Wu J., Zou X., Gu J., Chen J., et al. Enterovirus A71 proteins: structure and function. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 286. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00286>
- Huang K.A. Structural basis for neutralization of enterovirus. *Curr. Opin. Virol.* 2021; 51: 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.10.006>
- Yang C., Deng C., Wan J., Zhu L., Leng Q. Neutralizing antibody response in the patients with hand, foot and mouth disease to enterovirus 71 and its clinical implications. *Virol. J.* 2011; 8(1): 306. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-306>
- Luo S.T., Chiang P.S., Chao A.S., Liou G.Y., Lin R., Lin T.Y., et al. Enterovirus 71 maternal antibodies in infants, Taiwan. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(4): 581–4. <https://doi.org/10.3201/eid1504.081550>
- Zhu R., Cheng T., Yin Z., Liu D., Xu L., Li Y., et al. Serological survey of neutralizing antibodies to eight major enteroviruses among healthy population. *Emerg. Microbes Infect.* 2018; 7(1): 2. <https://doi.org/10.1038/s41426-017-0003-z>
- Zhu F., Xu W., Xia J., Liang Z., Liu Y., Zhang X., et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of an enterovirus 71 vaccine in China. *N. Engl. J. Med.* 2014; 370(9): 818–28. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304923>
- Lei D., Griffiths E., Martin J. WHO working group meeting to develop WHO Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of enterovirus 71 vaccines. *Vaccine.* 2020; 38(32): 4917–23. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.05.001>
- Huang L.M., Chiu C.H., Chiu N.C., Lin C.Y., Li M.T., Kuo T.Y., et al. Immunogenicity, safety, cross-reaction, and immune persistence of an inactivated enterovirus A71 vaccine in children aged from two months to 11 years in Taiwan. *Vaccine.* 2019; 37(13): 1827–35. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.02.023>
- Cai Y., Ku Z., Liu Q., Leng Q., Huang Z. A combination vaccine comprising of inactivated enterovirus 71 and coxsackievirus A16 elicits balanced protective immunity against both viruses. *Vaccine.* 2014; 32(21): 2406–12. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.03.012>
- Yang T., Xie T., Li H., Song X., Yue L., Wang X., et al. Immune responses of a CV-A16 live attenuated candidate strain and its protective effects in rhesus monkeys. *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9(1): 2136–46. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1823889>
- Yeh M.T., Wang S., Yu C.K., Lin K.H., Lei H.Y., Su I.J., et al. A single nucleotide in stem loop II of 5'-untranslated region contributes to virulence of enterovirus 71 in mice. *PLoS One.* 2011; 6(11): e27082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027082>
- Meng T., Kwang J. Attenuation of human enterovirus 71 high-replication-fidelity variants in AG129 mice. *J. Virol.* 2014; 88(10): 5803–15. <https://doi.org/10.1128/JVI.00289-14>
- Tsa Y.H., Huang S.W., Hsieh W.S., Cheng C.K., Chang C.F., Wang Y.F., et al. Enterovirus A71 containing codon deoptimized VP1 and high-fidelity polymerase as next-generation vaccine candidate. *J. Virol.* 2019; 93(13): e02308-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.02308-1>
- Yee P.T.I., Tan S.H., Ong K.C., Tan K.O., Wong K.T., Hassan S.S., et al. Development of live attenuated Enterovirus 71 vaccine strains

- that confer protection against lethal challenge in mice. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 4805. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41285-z>
38. Lasrado N., Gangaplara A., Massilamany C., Arumugam R., Shelbourn A., Rasquinha M.T., et al. Attenuated strain of CVB3 with a mutation in the CAR interacting region protects against both myocarditis and pancreatitis. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 12432. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90434-w>
39. Muslin C., Kain A.M., Bessaud M., Blondel B., Delpeyroux F. Recombination in enteroviruses, a multi-step modular evolutionary process. *Viruses.* 2019; 11(9): 859. <https://doi.org/10.3390/v11090859>
40. Anasir M.I., Poh C.L. Advances in antigenic peptide-based vaccine and neutralizing antibodies against viruses causing hand, foot, and mouth disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(6): 1256. <https://doi.org/10.3390/ijms20061256>
41. Tian X., Su X., Li X., Li H., Li T., Zhou Z., et al. Protection against enterovirus 71 with neutralizing epitope incorporation within adenovirus type 3 hexon. *PLoS One.* 2012; 7(7): e41381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041381>
42. Dai W., Xiong P., Zhang X., Liu Z., Chen J., Zhou Y., et al. Recombinant virus-like particle presenting a newly identified coxsackievirus A10 neutralization epitope induces protective immunity in mice. *Antiviral Res.* 2019; 164: 139–46. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.02.016>
43. Jiang L., Fan R., Sun S., Fan P., Su W., Zhou Y., et al. A new EV71 VP3 epitope in norovirus P particle vector displays neutralizing activity and protection in vivo in mice. *Vaccine.* 2015; 33(48): 6596–603. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.10.104>
44. Новиков Д.В., Мелентьев Д.А., Мохонов В.В., Кашников А.Ю., Новикова Н.А., Лапин В.А. и др. Получение вирусоподобных частиц норовируса (Caliciviridae; Norovirus), содержащих белок VP1 энтеровируса Echovirus 30 (Picornaviridae; Enterovirus). *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(5): 383–9. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-79>
45. Chung C.Y., Chen C.Y., Lin S.Y., Chung Y.C., Chiu H.Y., Chi W.K., et al. Enterovirus 71 virus-like particle vaccine: improved production conditions for enhanced yield. *Vaccine.* 2010; 28(43): 6951–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.052>
46. Li H.Y., Han J.F., Qin C.F., Chen R. Virus-like particles for enterovirus 71 produced from *Saccharomyces cerevisiae* potently elicits protective immune responses in mice. *Vaccine.* 2013; 31(32): 3281–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.019>
47. Zhang W., Dai W., Zhang C., Zhou Y., Xiong P., Wang S., et al. A virus-like particle-based tetravalent vaccine for hand, foot, and mouth disease elicits broad and balanced protective immunity. *Emerg. Microbes Infect.* 2018; 7(1): 94. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0094-1>
48. Kim H.J., Son H., Lee S.W., Yoon Y., Hyeon J.-Y., Chung G.T., et al. Efficient expression of enterovirus 71 based on virus-like particles vaccine. *PLoS One.* 2019; 14(3): e0210477. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210477>
49. Hankaniemi M.M., Baikoghli M.A., Stone V.M., Xing L., Vaatainen O., Soppela S., et al. Structural insight into CVB3-VLP non-adjuvanted vaccine. *Microorganisms.* 2020; 8(9): 1287. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091287>
50. Zhang C., Ku Z., Liu Q., Wang X., Chen T., Ye X., et al. High-yield production of recombinant virus-like particles of enterovirus 71 in *Pichia pastoris* and their protective efficacy against oral viral challenge in mice. *Vaccine.* 2015; 33(20): 2335–41. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.034>
51. Yang Z., Gao F., Wang X., Shi L., Zhou Z., Jiang Y., et al. Development and characterization of an enterovirus 71 (EV71) virus-like particles (VLPs) vaccine produced in *Pichia pastoris*. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2020; 16(7): 1602–10. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1649554>
52. Wang Z., Zhou C., Gao F., Zhu Q., Jiang Y., Ma X., et al. Preclinical evaluation of recombinant HFMD vaccine based on enterovirus 71 (EV71) virus-like particles (VLP): Immunogenicity, efficacy and toxicology. *Vaccine.* 2021; 39(31): 4296–305. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.06.031>
53. Zhang C., Zhang X., Zhang W., Dai W., Xie J., Ye L., et al. Enterovirus D68 virus-like particles expressed in *Pichia pastoris* potently induce neutralizing antibody responses and confer protection against lethal viral infection in mice. *Emerg. Microbes Infect.* 2018; 7(1): 3. <https://doi.org/10.1038/s41426-017-0005-x>
54. Sherry L., Grehan K., Snowden J.S., Knight M.L., Adeyemi O.O., Rowlands D.J., et al. Comparative molecular biology approaches for the production of poliovirus virus-like particles using *Pichia pastoris*. *mSphere.* 2020; 5(2): e00838-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00838-19>

References

- International committee on taxonomy of viruses (ICTV). Genus: Enterovirus. Available at: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/picornaviridae/681/genus-enterovirus
- Oberste M.S., Maher K., Kilpatrick D.R., Pallansch M.A. Molecular evolution of the human enteroviruses: correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification. *J. Virol.* 1999; 73(3): 1941–8. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.3.1941-1948.1999>
- Simmonds P., Gorbalenya A.E., Harvala H., Hovi T., Knowles N.J., Lindberg A.M., et al. Recommendations for the nomenclature of enteroviruses and rhinoviruses. *Arch. Virol.* 2020; 165(3): 793–7. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04520-6>
- Brouwer L., Moreni G., Wolthers K.C., Pajkrt D. World-wide prevalence and genotype distribution of enteroviruses. *Viruses.* 2021; 13(3): 434. <https://doi.org/10.3390/v13030434>
- Wells A.I., Coyne C.B. Enteroviruses: A gut-wrenching game of entry, detection, and evasion. *Viruses.* 2019; 11(5): 460. <https://doi.org/10.3390/v11050460>
- Harvala H., Benschop K.S.M., Berginc N., Midgley S., Wolthers K., Simmonds P., et al. European non-polio enterovirus network: introduction of hospital-based surveillance network to understand the true disease burden of non-polio enterovirus and parechovirus infections in Europe. *Microorganisms.* 2021; 9(9): 1827. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091827>
- State report «On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2019». Moscow; 2020. (in Russian)
- State report «On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2020». Moscow; 2021. (in Russian)
- Cheng H.Y., Huang Y.C., Yen T.Y., Hsia S.H., Hsieh Y.C., Li C.C., et al. The correlation between the presence of viremia and clinical severity in patients with enterovirus 71 infection: a multi-center cohort study. *BMC Infect. Dis.* 2014; 14: 417. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-417>
- Koh W.M., Badaruddin H., La H., Chen M.I.C., Cook A.R. Severity and burden of hand, foot and mouth disease in Asia: a modeling study. *BMJ Glob. Health.* 2018; 3(1): e000442. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2017-000442>
- Aw-Yong K.L., NikNadia N.M.N., Tan C.W., Sam I.C., Chan Y.F. Immune responses against enterovirus A71 infection: Implications for vaccine success. *Rev. Med. Virol.* 2019; 29(5): e2073. <https://doi.org/10.1002/rmv.2073>
- Ni H., Yi B., Yin J., He T., Du Y., Wang J., et al. Epidemiological and etiological characteristics of hand, foot and mouth disease in Ningbo, China, 2008–2011. *J. Clin. Virol.* 2012; 54(4): 342–8. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.04.021>
- Yee P.T.I., Poh L.C. Impact of genetic changes, pathogenicity and antigenicity on Enterovirus-A71 vaccine development. *Virology.* 2017; 506: 121–9. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.03.017>
- Mao Q., Wang Y., Yao X., Bian L., Wu X., Xu M., et al. Coxsackievirus A16: epidemiology, diagnosis, and vaccine. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2014; 10(2): 360–7. <https://doi.org/10.4161/hv.27087>
- Li J.L., Yuan J., Yang F., Wu Z.Q., Hu Y.F., Xue Y., et al. Epidemic characteristics of hand, foot, and mouth disease in southern China, 2013: coxsackievirus A6 has emerged as the predominant causative agent. *J. Infect.* 2014; 69(3): 299–303. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.04.001>
- Yang Q., Ding J., Cao J., Huang Q., Hong C., Yang B. Epidemiological and etiological characteristics of hand, foot, and mouth disease in Wuhan, China from 2012 to 2013: outbreaks of coxsackieviruses A10. *J. Med. Virol.* 2015; 87(6): 954–60. <https://doi.org/10.1002/jmv.24151>
- Kim H.J., Kang B., Hwang S., Hong J., Kim K., Cheon D.S. Epidemics of viral meningitis caused by echovirus 6 and 30 in Korea in 2008. *Virol. J.* 2012; 9: 38. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-38>
- Chen P., Tao Z., Song Y., Liu G., Wang H., Liu Y., et al. A coxsackievirus B5-associated aseptic meningitis outbreak in Shandong Province, China in 2009. *J. Med. Virol.* 2013; 85(3): 483–9. <https://doi.org/10.1002/jmv.23478>

19. Kim D.S., Nam J.H. Characterization of attenuated coxsackievirus B3 strains and prospects of their application as live-attenuated vaccines. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2010; 10(2): 179–90. <https://doi.org/10.1517/14712590903379502>
20. Sousa I.P. Jr., Burlandy F.M., Ferreira J.L., Alves J.C.S., Sousa-Júnior E.C., Tavares F.N., da Silva E.E. Re-emergence of a coxsackievirus A24 variant causing acute hemorrhagic conjunctivitis in Brazil from 2017 to 2018. *Arch. Virol.* 2019; 164(4): 1181–5. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04157-5>
21. Holm-Hansen C.C., Midgley S.E., Fischer T.K. Global emergence of enterovirus D68: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* 2016; 16(5): e64–75. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00543-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00543-5)
22. Golitsyna L.N., Zverev V.V., Fomina S.G., Sozonov D.V., Novikova N.A. Enterovirus infection in the Russian Federation in 2008–2018. *Infektsiya i immunitet.* 2018; 8(4): 558. <https://doi.org/10.15789/2220-7619-2018-4-3.16>
23. Sapaga E.Yu., Butakova L.V., Trotsenko O.E., Zaytseva T.A., Garbuz Yu.A., Balakhonov S.V., et al. The role of molecular genetic analysis in detection of potential importation of enterovirus infection in the Khabarovsk region. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya.* 2018; (2): 44–51. <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2018-299-2-44-51> (in Russian)
24. Yuan J., Shen L., Wu J., Zou X., Gu J., Chen J., et al. Enterovirus A71 proteins: structure and function. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 286. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00286>
25. Huang K.A. Structural basis for neutralization of enterovirus. *Curr. Opin. Virol.* 2021; 51: 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.10.006>
26. Yang C., Deng C., Wan J., Zhu L., Leng Q. Neutralizing antibody response in the patients with hand, foot and mouth disease to enterovirus 71 and its clinical implications. *Virol. J.* 2011; 8(1): 306. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-306>
27. Luo S.T., Chiang P.S., Chao A.S., Liou G.Y., Lin R., Lin T.Y., et al. Enterovirus 71 maternal antibodies in infants, Taiwan. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(4): 581–4. <https://doi.org/10.3201/eid1504.081550>
28. Zhu R., Cheng T., Yin Z., Liu D., Xu L., Li Y., et al. Serological survey of neutralizing antibodies to eight major enteroviruses among healthy population. *Emerg. Microbes Infect.* 2018; 7(1): 2. <https://doi.org/10.1038/s41426-017-0003-z>
29. Zhu F., Xu W., Xia J., Liang Z., Liu Y., Zhang X., et al. Efficacy, safety, and immunogenicity of an enterovirus 71 vaccine in China. *N. Engl. J. Med.* 2014; 370(9): 818–28. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304923>
30. Lei D., Griffiths E., Martin J. WHO working group meeting to develop WHO Recommendations to assure the quality, safety and efficacy of enterovirus 71 vaccines. *Vaccine.* 2020; 38(32): 4917–23. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.05.001>
31. Huang L.M., Chiu C.H., Chiu N.C., Lin C.Y., Li M.T., Kuo T.Y., et al. Immunogenicity, safety, cross-reaction, and immune persistence of an inactivated enterovirus A71 vaccine in children aged from two months to 11 years in Taiwan. *Vaccine.* 2019; 37(13): 1827–35. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.02.023>
32. Cai Y., Ku Z., Liu Q., Leng Q., Huang Z. A combination vaccine comprising of inactivated enterovirus 71 and coxsackievirus A16 elicits balanced protective immunity against both viruses. *Vaccine.* 2014; 32(21): 2406–12. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.03.012>
33. Yang T., Xie T., Li H., Song X., Yue L., Wang X., et al. Immune responses of a CV-A16 live attenuated candidate strain and its protective effects in rhesus monkeys. *Emerg. Microbes Infect.* 2020; 9(1): 2136–46. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1823889>
34. Yeh M.T., Wang S., Yu C.K., Lin K.H., Lei H.Y., Su I.J., et al. A single nucleotide in stem loop II of 5'-untranslated region contributes to virulence of enterovirus 71 in mice. *PLoS One.* 2011; 6(11): e27082. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027082>
35. Meng T., Kwang J. Attenuation of human enterovirus 71 high-replication-fidelity variants in AG129 mice. *J. Virol.* 2014; 88(10): 5803–15. <https://doi.org/10.1128/JVI.00289-14>
36. Tsa Y.H., Huang S.W., Hsieh W.S., Cheng C.K., Chang C.F., Wang Y.F., et al. Enterovirus A71 containing codon deoptimized VP1 and high-fidelity polymerase as next-generation vaccine candidate. *J. Virol.* 2019; 93(13): e02308-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.02308-1>
37. Yee P.T.I., Tan S.H., Ong K.C., Tan K.O., Wong K.T., Hassan S.S., et al. Development of live attenuated Enterovirus 71 vaccine strains that confer protection against lethal challenge in mice. *Sci. Rep.* 2019; 9(1): 4805. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41285-z>
38. Lasrado N., Gangaplara A., Massilamany C., Arumugam R., Shelbourn A., Rasquinha M.T., et al. Attenuated strain of CVB3 with a mutation in the CAR interacting region protects against both myocarditis and pancreatitis. *Sci. Rep.* 2021; 11(1): 12432. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90434-w>
39. Muslin C., Kain A.M., Bessaud M., Blondel B., Delpeyroux F. Recombination in enteroviruses, a multi-step modular evolutionary process. *Viruses.* 2019; 11(9): 859. <https://doi.org/10.3390/v11090859>
40. Anasir M.I., Poh C.L. Advances in antigenic peptide-based vaccine and neutralizing antibodies against viruses causing hand, foot, and mouth disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2019; 20(6): 1256. <https://doi.org/10.3390/ijms20061256>
41. Tian X., Su X., Li X., Li H., Li T., Zhou Z., et al. Protection against enterovirus 71 with neutralizing epitope incorporation within adenovirus type 3 hexon. *PLoS One.* 2012; 7(7): e41381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041381>
42. Dai W., Xiong P., Zhang X., Liu Z., Chen J., Zhou Y., et al. Recombinant virus-like particle presenting a newly identified coxsackievirus A10 neutralization epitope induces protective immunity in mice. *Antiviral Res.* 2019; 164: 139–46. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.02.016>
43. Jiang L., Fan R., Sun S., Fan P., Su W., Zhou Y., et al. A new EV71 VP3 epitope in norovirus P particle vector displays neutralizing activity and protection in vivo in mice. *Vaccine.* 2015; 33(48): 6596–603. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.10.104>
44. Novikov D.V., Melent'ev D.A., Mokhonov V.V., Kashnikov A.Yu., Novikova N.A., Lapin V.A., et al. Construction of norovirus (Caliciviridae: Norovirus) virus-like particles containing VP1 of the Echovirus 30 (Picornaviridae: Enterovirus: Enterovirus B). *Voprosy virusologii.* 2021; 66(5): 383–9. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-79> (in Russian)
45. Chung C.Y., Chen C.Y., Lin S.Y., Chung Y.C., Chiu H.Y., Chi W.K., et al. Enterovirus 71 virus-like particle vaccine: improved production conditions for enhanced yield. *Vaccine.* 2010; 28(43): 6951–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.052>
46. Li H.Y., Han J.F., Qin C.F., Chen R. Virus-like particles for enterovirus 71 produced from *Saccharomyces cerevisiae* potently elicits protective immune responses in mice. *Vaccine.* 2013; 31(32): 3281–7. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.05.019>
47. Zhang W., Dai W., Zhang C., Zhou Y., Xiong P., Wang S., et al. A virus-like particle-based tetravalent vaccine for hand, foot, and mouth disease elicits broad and balanced protective immunity. *Emerg. Microbes Infect.* 2018; 7(1): 94. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0094-1>
48. Kim H.J., Son H., Lee S.W., Yoon Y., Hyeon J.-Y., Chung G.T., et al. Efficient expression of enterovirus 71 based on virus-like particles vaccine. *PLoS One.* 2019; 14(3): e0210477. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210477>
49. Hankaniemi M.M., Baikoghli M.A., Stone V.M., Xing L., Vaatainen O., Soppela S., et al. Structural insight into CVB3-VLP non-adjuvanted vaccine. *Microorganisms.* 2020; 8(9): 1287. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091287>
50. Zhang C., Ku Z., Liu Q., Wang X., Chen T., Ye X., et al. High-yield production of recombinant virus-like particles of enterovirus 71 in *Pichia pastoris* and their protective efficacy against oral viral challenge in mice. *Vaccine.* 2015; 33(20): 2335–41. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.03.034>
51. Yang Z., Gao F., Wang X., Shi L., Zhou Z., Jiang Y., et al. Development and characterization of an enterovirus 71 (EV71) virus-like particles (VLPs) vaccine produced in *Pichia pastoris*. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2020; 16(7): 1602–10. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1649554>
52. Wang Z., Zhou C., Gao F., Zhu Q., Jiang Y., Ma X., et al. Preclinical evaluation of recombinant HFMD vaccine based on enterovirus 71 (EV71) virus-like particles (VLP): Immunogenicity, efficacy and toxicology. *Vaccine.* 2021; 39(31): 4296–305. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.06.031>
53. Zhang C., Zhang X., Zhang W., Dai W., Xie J., Ye L., et al. Enterovirus D68 virus-like particles expressed in *Pichia pastoris* potently induce neutralizing antibody responses and confer protection against lethal viral infection in mice. *Emerg. Microbes Infect.* 2018; 7(1): 3. <https://doi.org/10.1038/s41426-017-0005-x>
54. Sherry L., Grehan K., Snowden J.S., Knight M.L., Adeyemi O.O., Rowlands D.J., et al. Comparative molecular biology approaches for the production of poliovirus virus-like particles using *Pichia pastoris*. *mSphere.* 2020; 5(2): e00838-19. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00838-19>

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

https://doi.org/10.36233/0507-4088-113

© ОЖМЕГОВА Е.Н., БОБКОВА М.Р., 2022

Лекарственная устойчивость ВИЧ: прежние и современные тенденции

Ожмегова Е.Н., Бобкова М.Р.

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

ВИЧ-инфекция является неизлечимым заболеванием, однако эффективная антиретровирусная терапия (АРТ) позволяет добиться установления неопределяемой вирусной нагрузки, сохранения функции иммунной системы и здоровья пациента. В связи с постоянным ростом применения АРТ и высокой изменчивостью ВИЧ, особенно у пациентов, получающих по разным причинам так называемую субоптимальную терапию, растёт частота возникновения лекарственной устойчивости (ЛУ). В свою очередь, наличие ЛУ у ВИЧ-инфицированного пациента влияет на эффективность терапии, что влечёт за собой ограничение выбора и удорожание схем лечения, прогрессирование заболевания и, следовательно, повышенный риск летального исхода, а также передачи инфекции партнёрам. Рассмотрены основные проблемы ЛУ, её виды и причины развития, а также факторы, связанные с её развитием. Описаны основные мутации ЛУ по каждому из классов препаратов.

Ключевые слова: вирус иммунодефицита человека 1-го типа (ВИЧ-1); лекарственная устойчивость; мутации лекарственной устойчивости; антиретровирусная терапия; субоптимальная терапия; неопределяемая вирусная нагрузка

Для цитирования: Ожмегова Е.Н., Бобкова М.Р. Лекарственная устойчивость ВИЧ: прежние и современные тенденции. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(3): 193–205. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-113>

Для корреспонденции: Ожмегова Екатерина Никитична, младший научный сотрудник лаборатории вирусов лейкозов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия. E-mail: ozhmegova.eka@gmail.com

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

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.04.2022

Принята в печать 02.06.2022

Опубликована 30.06.2022

REVIEW ARTICLE

https://doi.org/10.36233/0507-4088-113

HIV drug resistance: past and current trends

Ekaterina N. Ozhmegova, Marina R. Bobkova

FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia

HIV infection is incurable, but effective antiretroviral therapy (ART) makes it possible to achieve an undetectable viral load (VL), to preserve the function of the immune system and to prevent the patient's health. Due to the constant increase in the use of ART and the high variability of HIV, especially in patients receiving so-called suboptimal therapy for various reasons, the incidence of drug resistance (DR) is increasing. In turn, the presence of DR in an HIV-infected patient affects the effectiveness of therapy, which leads to a limited choice and an increase in the cost of treatment regimens, disease progression and, consequently, an increased risk of death, as well as transmission of infection to partners. The main problems of drug resistance, its types and causes, as well as factors associated with its development are considered. The main drug resistance mutations for each of the drug classes are described.

Keywords: human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1); drug resistance; drug resistance mutations; antiretroviral therapy; suboptimal therapy; undetectable viral load

For citation: Ozhmegova E.N., Bobkova M.R. HIV drug resistance: past and current trends. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(3): 193–205 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-113>

For correspondence: Ekaterina N. Ozhmegova, Junior Researcher, Laboratory of Leukemia Viruses, Institute of Virology named after D.I. Ivanovskiy of National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, 123098, Moscow, Russia. E-mail: ozhmegova.eka@gmail.com

Information about the authors:

Ozhmegova E.N., <https://orcid.org/0000-0002-3110-0843>

Bobkova M.R., <https://orcid.org/0000-0001-5481-8957>

Contribution. All of the authors made an equal contribution to the research and analysis and to the preparation of the article, and read and approved the final version before publication.

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

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Received 29 April 2022

Accepted 02 June 2022

Published 30 June 2022

Введение

По состоянию на 31 декабря 2021 г. в Российской Федерации общее количество лиц, живущих с вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), составило 1 137 596 чел., тогда как в 2020 г. этот показатель составлял 1 104 768 чел. (данные Федерального научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИДом Роспотребнадзора) [1]. Продолжает регистрироваться значительное количество новых случаев заражения ВИЧ-инфекцией. В 2021 г. сообщалось о 71 019 новых случаях выявления ВИЧ-инфекции. Сейчас люди, живущие с ВИЧ, зарегистрированы во всех субъектах Российской Федерации, а число смертей продолжает сохраняться на высоком уровне (424 974 чел. в 2021 г. за весь период наблюдения).

Внедрение антиретровирусной терапии (АРТ) и её эффективность в борьбе с ВИЧ побудили многие авторитетные мировые организации разработать специальные программы, обеспечивающие улучшение показателей, связанных с ВИЧ-инфекцией, по всем направлениям, начиная со снижения её распространённости и заканчивая качеством жизни пациентов. Помимо обеспечения АРТ всех инфицированных лиц, независимо от клинических проявлений рекомендовано применять АРТ в до- и постконтактной профилактике, а также для предотвращения вертикальной передачи ВИЧ от матери к ребёнку [2].

В 2014 г. Объединенная программа Организации Объединенных Наций по ВИЧ/СПИДу (ЮНЭЙДС) представила новую стратегию по противодействию эпидемии ВИЧ – 90–90–90, в рамках которой к 2020 г. доля пациентов, знающих о своём диагнозе, должна была составить 90%, при этом необходимо было довести долю пациентов в мире, получающих АРТ, до 90%, а у 90% из них АРТ должна была быть успешной, иными словами, вирусная нагрузка (ВН) не должна была определяться.

К сожалению, программа 90–90–90 не дала ожидаемых результатов, и в настоящее время реально достигнутые показатели в мире составляют 84–73–66 (знают о своем ВИЧ-статусе / из них получают АРТ / из них достигли вирусной супрессии) [1]. Тем не менее значительный рост охвата АРТ отмечается во всех

странах мира, включая Россию, где этот показатель изменился с 35,5 до 56,4% за последние 5 лет [1]. При этом эффективность лечения остаётся на недостаточном уровне, составляя 46,4%.

В связи с постоянным ростом применения АРТ и высокой изменчивостью ВИЧ, особенно под воздействием АРТ у пациентов, получающих так называемую субоптимальную терапию, когда концентрация в клетках лекарственного препарата по разным причинам не достигает эффективного значения, растёт число случаев возникновения лекарственной устойчивости (ЛУ). В свою очередь, наличие ЛУ у ВИЧ-инфицированного пациента влияет на эффективность терапии, что влечёт за собой ограничение выбора и удорожание схем лечения, прогрессирование заболевания и, следовательно, повышенный риск летального исхода. ВН при неэффективности терапии становится определяемой, а значит, риск передачи инфекции сохраняется.

Всё вышесказанное указывает на то, что, несмотря на существование оптимизированных клинических рекомендаций и успехи науки в создании новых препаратов, которые обладают большей эффективностью в борьбе с ВИЧ, эпидемия продолжает развиваться, а вместе с ней и ЛУ, поэтому актуальность данной темы не вызывает никаких сомнений.

Проблема лекарственной устойчивости ВИЧ-1

Наряду с хорошо известной и описанной в клинической бактериологии концепцией устойчивости к антибиотикам проблема устойчивости к противовирусным препаратам становится обычной темой и в клинической вирусологии. Она связана прежде всего с увеличением доступности и расширением использования противовирусных препаратов. Ранее в мировой науке уже наблюдались случаи устойчивости к ацикловиру и ганцикловиру у людей, инфицированных герпесом [3], а также к ламивудину среди людей, больных гепатитом В [4], однако в полном масштабе проблема обозначилась, когда речь зашла о лечении ВИЧ-инфицированных пациентов.

В начале 1990-х гг. впервые были разработаны антиретровирусные препараты (АРВП) прямого противовирусного действия, которые воздействуют

непосредственно на вирусные ферменты, тем или иным способом ингибируя способность вируса к репликации. Уже в первые годы применения препаратов АРТ был описан феномен ЛУ (резистентности) ВИЧ. Мутации резистентности, возникая в геноме вируса, как правило, придают ему устойчивость к препарату ценой некоторого снижения репликативной способности, однако в условиях применения препарата позволяют сохранить способность к размножению и, таким образом, имеют преимущество перед вирусом дикого типа.

В наши дни в связи с широким использованием АРТ независимо от клинических проявлений в до- и пост-контактной профилактике, а также для исключения вертикальной передачи ВИЧ от матери к ребёнку наблюдается увеличение абсолютного числа неуспешных случаев на уровне популяции, что ставит под угрозу долгосрочную эффективность рекомендованных схем лечения, в особенности наименее затратных режимов первого ряда АРТ.

Так, в крупных европейских исследованиях сообщается, что в популяциях, где устойчивость к компонентам стандартной терапии первой линии выявляется ещё до начала АРТ, вероятность вирусологического неуспеха в течение 12 мес после начала АРТ составляет 15,1% [5, 6]. Вирусологический неуспех в течение 12 мес у людей, получающих АРТ первой линии, был также продемонстрирован в исследованиях на африканской когорте пациентов. Так, было установлено, что в странах Африки к югу от Сахары до 24% пациентов, получающих АРТ первого ряда, имеют вирусологический неуспех в течение 12 мес после начала лечения, связанный, скорее всего, с субоптимальным соблюдением режима терапии. Среди этих пациентов от 53 до 90% имеют вирусы с клинически значимой ЛУ ВИЧ-1 к нуклеозидным (ННИОТ) и нуклеозидным (НИОТ) ингибиторам обратной транскриптазы (ОТ) [7].

В период с 2014 по 2018 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) проводила исследования передающейся ЛУ (т.е. устойчивости у пациентов, не получавших лечения и инфицированных резистентными штаммами вируса). Как было показано, в 12 из 18 стран, представивших свои данные, наиболее часто применяемыми препаратами АРТ были ННИОТ эфавиренз (EFV) и (или) невирапин (NVP), при этом распространённость мутаций ЛУ ВИЧ к ННИОТ среди взрослых превышала 10% [2]. В исследованиях у нелеченых пациентов в Южной Африке распространённость устойчивости к ННИОТ составляла 38% [8, 9]. Присутствие растущей доли ВИЧ-инфицированного населения, являющегося носителем устойчивых вирусов, может прогрессивно увеличить риск передачи устойчивых штаммов ВИЧ.

Известно, что люди, инфицированные заведомо устойчивыми штаммами ВИЧ, могут неоптимально реагировать уже на первую схему АРТ [10], при этом любая выявленная мутация ЛУ ВИЧ может иметь клинические последствия. Ключевые данные, подтверждающие такую стратегию, представлены в ис-

следованиях [11], которые продемонстрировали, что ответ на раннюю терапию (при острой инфекции) был скомпрометирован наличием ЛУ.

Всё вышеперечисленное указывает на существование высокого риска неэффективности АРТ, и поэтому формирование общенационального подхода к профилактике развития резистентности ВИЧ к АРВП является актуальной задачей.

Для прекращения дальнейшего распространения и появления новых устойчивых вариантов ВИЧ ВОЗ разработала рекомендации по надзору за распространением резистентности ВИЧ к АРВП [2]. Данные рекомендации включают в себя несколько видов мероприятий и исследований, в частности анализ индикаторов раннего предупреждения и распространённости резистентности ВИЧ на старте лечения (первичная устойчивость) и у пациентов на первой линии терапии (в том числе отдельно у детей в возрасте до 18 мес). Помимо мониторинга резистентности среди наивных пациентов, а также пациентов на первой линии терапии, необходимо осуществлять надзор за пациентами, находящимися на АРТ второй и последующих линий.

Значительными препятствиями на пути к эффективному надзору за ЛУ ВИЧ в России являются ограниченные возможности местных лабораторий, их неадекватная общая инфраструктура и, возможно, ограниченное понимание ценности эпиднадзора за феноменом ЛУ ВИЧ и того, как можно использовать его результаты для оптимизации лечения пациентов и политики закупки лекарственных средств.

Факторы возникновения мутаций лекарственной устойчивости

Непосредственным поводом для формирования и эволюции ЛУ ВИЧ является недостаточная концентрация лекарств в клетках, продуцирующих вирус; причины этого будут далее обсуждаться. В таких условиях вирус приобретает возможность размножаться в присутствии препарата; при этом особенность ВИЧ, связанная с наличием этапа обратной транскрипции в жизненном цикле вируса, приводит к возникновению множества мутаций во всех участках генома ВИЧ. ЛУ связана с возникновением мутаций в нуклеотидных последовательностях, кодирующих мишени АРТ, – ОТ, протеазе, интегразе, а также поверхностных белках и корцепторах.

Устойчивость ВИЧ может возникать, если мутации устойчивости появляются под действием лекарственных препаратов; в таком случае ЛУ называют приобретённой. Если происходит заражение устойчивым штаммом вируса ранее неинфицированного человека, то такую устойчивость называют передающейся. С целью мониторинга ЛУ ВИЧ ВОЗ также вводит понятие устойчивости перед началом лечения. Так называют устойчивость у наивных пациентов, т.е. никогда не принимавших АРТ, либо у пациентов, повторно начинающих лечение после перерыва [12–14]; в эту же группу включаются матери, получавшие кратковременную профилактическую АРТ в период родов.

ВОЗ выделяет 4 группы факторов, связанных с возникновением резистентности ВИЧ [15]:

1) зависящие от свойств и способа употребления АРВП, в частности, противовирусной активности, фармакокинетики, переносимости препарата, лекарственных взаимодействий, а также генетического барьера резистентности. Примерами также могут быть неправильно подобранная схема терапии, неправильная дозировка, несоблюдение диетических требований;

2) зависящие от биологии вируса, а именно от его способности к репликации, наличия первичной резистентности, а также субтипа ВИЧ и полиморфных мутаций, ассоциированных с резистентностью;

3) зависящие от поведения пациента. Здесь важнейшим обстоятельством является возможная недостаточная приверженность пациента к терапии, в том числе связанная со стигмой и дискриминацией;

4) зависящие от организации лечения, а именно закупка и своевременная поставка АРВП, доступ пациентов к различным видам мониторинга (в первую очередь определения ВН) и медицинской помощи. Нарушения в данном пункте являются распространённой причиной развития ЛУ ВИЧ. В статье [16] авторы указали, что 71% пациентов сталкивались со сбоем в поставке препаратов.

Факторы, связанные с антиретровирусными препаратами

Основным свойством препаратов АРТ, связанным с резистентностью, является генетический барьер, т.е. число мутаций, необходимых вирусу для достижения состояния устойчивости. Для выбора схемы лечения этот показатель очень важен, хотя не является единственным, так как нужно учитывать многие другие факторы, включая эффективность, отсутствие побочных эффектов и стоимость препаратов.

Ещё одно качество препаратов АРТ, принимаемое к рассмотрению при выборе схемы, – фармакологический барьер резистентности, т.е. кратность превышения действующей концентрации препарата (стандартной дозировки) над концентрацией, подавляющей размножение вируса в клетках. Этот показатель сильно варьирует между препаратами, при этом высокобарьерные препараты имеют очевидное преимущество перед другими.

АРВП, входящие в состав АРТ, нередко склонны к побочным эффектам, которые проявляются на ранних этапах приёма препаратов и с течением времени могут исчезнуть. Примерами таких побочных эффектов являются рвота, диарея, сыпь, головная боль и пр. Некоторые из этих побочных эффектов непосредственно снижают концентрацию лекарств в клетках, другие приводят к отказу пациентов от дальнейшего приёма АРТ и фактическому снижению приверженности. Любое из этих событий может привести к формированию ЛУ-штаммов ВИЧ уже в первые месяцы приёма АРТ.

Другой фактор из этой группы – лекарственные взаимодействия, которые имеются в среднем у 70–80% пациентов, получающих терапию ингибиторами протеазы (ИП) [17].

Лекарственные взаимодействия, которые могут возникать между как несколькими АРВП, так и АРВП и препаратами других классов, включая даже средства растительного происхождения, делают невозможной АРТ или существенно снижают её эффект, создавая условия для возникновения и эволюции ЛУ-штаммов. Даже в случаях 100% приверженности взаимодействующие лекарства могут не проявить своего эффекта полностью, если не поддерживается концентрация каждого из них, достаточная для ингибирования ферментов ВИЧ.

Лекарственные взаимодействия можно подразделить на фармакодинамические и фармакокинетические. К фармакокинетическим относят все виды взаимодействия, которые так или иначе приводят к изменению действующей концентрации лекарственных препаратов на этапах абсорбции, распределения, связывания с белками, метаболизма или элиминации. Фармакодинамические взаимодействия основаны на вмешательстве в механизмы действия препаратов, при этом их концентрация может не изменяться. Чаще всего такие взаимодействия происходят на этапах контакта препаратов с рецепторами и могут обладать как подобным (агонистическим), так и блокирующим (антагонистическим) действием, изменяя эффективность связывания и продолжительность воздействия препарата на рецептор.

Проблемы для АРТ могут создавать любые виды лекарственных взаимодействий, которые могут привести к увеличению или уменьшению эффекта лекарственного средства и повлиять на вирусологический ответ. Например, снижение интенсивности выведения лекарства из организма может подвергнуть пациента повышенному риску развития дозозависимой токсичности и привести к побочным эффектам. Напротив, усиление метаболизма АРВП может понизить концентрацию лекарства в клетках, продуцирующих вирус, и способствовать формированию резистентных вирусов [18]. При назначении или смене одного или нескольких препаратов в схеме АРТ клиницисты должны учитывать возможность всех межлекарственных взаимодействий, способных ограничить эффект терапии.

Также немаловажным фактором является правильно подобранная дозировка препарата. В рутинной практике обычно применяются стандартные дозы препаратов в комбинированных схемах АРТ, однако в условиях персонализированной медицины стало возможным обеспечить корректную дозу и кратность приёма препарата с помощью терапевтического мониторинга лекарственных средств (TDM – Therapeutic Drug Monitoring) с использованием измерения концентрации лекарств в организме пациентов. Такой подход уже применяется в сложных случаях лечения и в дальнейшем будет расширяться.

Факторы, связанные с биологией вируса иммунодефицита

Установлено, что репликация ВИЧ происходит с большой скоростью: в сутки в организме образуются 10^9 вирусных частиц, при этом фермент ОТ не обладает способностью к самокоррекции, вслед-

ствие чего в каждом цикле репликации в популяции вирусов у пациента происходит около 10^4 – 10^5 ошибок (мутаций) на каждую пару оснований [19], среди которых могут быть мутации ЛУ ВИЧ.

Мутации устойчивости возникают у вирусов случайно и могут фиксироваться в вирусной популяции при наличии селективного давления лекарственного средства в случае неоптимального лечения. Мутации устойчивости также могут обнаруживаться, если пациент изначально был инфицирован ЛУ-штаммом.

Устойчивые вирусы обычно обладают сниженной репликативной способностью и имеют преимущества в размножении только в присутствии лекарств. Стойкая вирусемия на фоне АРТ, как правило, приводит к дальнейшему накоплению мутаций и снижает репликацию вируса дикого типа, однако прекращение АРТ может вызвать относительно быстрое исчезновение мутантов и возвращение вирусов дикого типа из-за их более высокой репликативной способности (фитнеса).

Процесс возвращения чувствительных вирусов может происходить по усложненным сценариям в случаях, когда вирус в ходе формирования устойчивости приобретает несколько мутаций, каждая из которых вносит свой вклад в устойчивость и репликативную способность ВИЧ. Мутации, повышающие фитнес вируса, и даже нейтральные мутации имеют тенденцию надолго сохраняться в популяции; иногда на протяжении долгого времени популяция ВИЧ состоит из нескольких вариантов с разными заменами в одном и том же положении генома.

Факторы, зависящие от пациента

Лечение ВИЧ-инфекции проводится пожизненно и требует от пациентов точного соблюдения рекомендаций врачей и режима терапии. Соблюдение режима АРТ и диспансерного наблюдения, психоэмоциональное состояние пациента, связанное с давлением общества в виде стигмы и дискриминации, должны рассматриваться в едином контексте своевременности и эффективности терапии. В настоящее время важнейшее значение приобретает выполнение задачи привлечения и удержания пациентов в рамках существующей системы помощи. Прекращение или кратковременное прерывание терапии у пациента с явной или низкой вирусемией не рекомендуется, так как это может привести к быстрому увеличению рибонуклеиновой кислоты ВИЧ и снижению количества CD4-лимфоцитов, а также увеличить риск клинического прогрессирования [20].

Приверженность

Наиболее полное определение приверженности звучит как соответствие поведения пациента рекомендациям врача, включая приём препаратов, диету и (или) изменение образа жизни. ВОЗ рекомендует считать значение приверженности, при котором наблюдается наилучший вирусологический ответ на проводимую терапию, превышающим 95%, при этом средним уровнем считается 85–94%, а низким – ≤ 85%.

Недостаточная приверженность пациента к терапии является одной из причин развития ЛУ, при этом максимальная вероятность резистентности наблюдается при показателях приверженности от 70 до 95% [21]. Современные АРВП стали более эффективными и относительно «прощающими» пропущенные дозы, поэтому вирусологический успех и профилактика резистентности могут быть достигнуты с уровнями приверженности около 80–85% [22].

Приверженность пациентов к АРТ по-прежнему связана с многочисленными препятствиями, такими как стигма, дискриминация, социальный статус, доступ к медицинской помощи, употребление психоактивных веществ. Немаловажным фактором, при котором у пациентов с ВИЧ-инфекцией встаёт вопрос о приёме комбинированной АРТ, – это большое количество таблеток, которые они должны принимать несколько раз в день. Действительно, метаанализ 11 исследований показал, что пациенты, получавшие лечение в виде одной таблетки в день, имели уровень приверженности значительно выше, чем пациенты, получавшие несколько таблеток в день [23], включая бездомных или малообеспеченных пациентов [24].

В настоящее время нет единого метода для точного измерения приверженности к АРТ, и разработка новых стратегий для достижения этой цели продолжает оставаться в центре внимания. Среди наиболее часто используемых методов контроля приверженности к лечению ВИЧ – измерение ВН, анализ своевременности диспансерного наблюдения, измерение остатка лекарств и т.д.

Формирование приверженности пациентов к диспансерному наблюдению и лечению ВИЧ-инфекции осуществляется в рамках мультипрофессионального пациент-ориентированного подхода с использованием технологии консультирования, общения и доверительного взаимодействия с пациентом.

Стигма и дискриминация

Стигма и дискриминация издавна являются препятствиями, мешающими осуществлению эффективной профилактики и лечения ВИЧ как на уровне общественного здравоохранения, так и в отношении отдельных лиц. Более того, стигма и дискриминация зачастую направлены против ключевых групп населения, подверженных повышенному риску ВИЧ-инфицирования, включая секс-работников, мужчин, практикующих секс с мужчинами, потребителей инъекционных наркотиков.

Анализ уровня распространённости стигмы и дискриминации среди населения в целом, а также среди медицинских работников обеспечивает глубинный анализ проблемы. Данные можно собирать путём проведения обследований репрезентативной выборки ключевых групп и населения в целом, а также при помощи собеседований с пациентами.

Побочные эффекты

Хорошо известно, что препараты против ВИЧ могут вызывать отрицательные побочные эффекты, наименее тяжёлые из которых включают диарею, тошноту

и рвоту [25], а также отдалённые последствия. К числу последних относятся сердечно-сосудистый риск и начало диабета, заболевания центральной нервной системы, липодистрофия и пр. [26].

Непосредственной причиной нарушения приверженности чаще всего становятся побочные эффекты, появление которых может привести пациента к прекращению лечения [27]. В результате более половины пациентов прекращают терапию в течение нескольких первых месяцев и примерно 20% всех пациентов даже отказываются возобновлять АРТ. В условиях незапланированной остановки АРТ это может стать причиной ЛУ ВИЧ.

Показано, что каждый класс АРВП имеет уникальное соотношение приверженности – устойчивости. Резистентность к терапии с ИП чаще всего возникает при умеренном или высоком уровне приверженности, устойчивость к терапии ННИОТ возникает при низком и умеренном уровнях приверженности, а устойчивость к терапии ИП, усиленной ритонавиром, наиболее вероятно происходит на средних уровнях приверженности [28].

Факторы, зависящие от организации здравоохранения

Национальные системы здравоохранения играют решающую роль в предотвращении появления и передачи ВИЧ с ЛУ. Государственная политика в отношении борьбы с ВИЧ зачастую имеет ограниченную инфраструктуру, нехватку специалистов здравоохранения, непоследовательные цепочки поставок и слабое соблюдение стандартов качества. В ряде исследований, выполненных в разных странах, было указано, что в значительном числе случаев замены схем терапии были связаны не с вирусологическим неуспехом схемы лечения, а с отсутствием препаратов на медицинском складе [16]. Например, по сведениям из более чем 2000 клиник в 50 странах мира, в период с 2004 по 2009 г. документально подтверждены нехватки АРВП примерно в 40% контролируемых пунктов в Африке к югу от Сахары [29].

Большими препятствиями на пути к надзору за ЛУ ВИЧ являются ограниченные возможности местных лабораторий и человеческие ресурсы, а возможно, и ограниченное понимание ценности информации эпиднадзора за резистентностью ВИЧ. Примером одного из надзорных исследований, рекомендуемых ВОЗ, является мониторинг индикаторов раннего предупреждения ЛУ ВИЧ, которые включают охват тестированием на ВН, успех в достижении неопределяемой ВН, удержание на АРТ, нехватку АРВП и соблюдение режима терапии [30]. Своевременное выявление условий, способных повлиять на формирование устойчивых штаммов ВИЧ, было бы способно свести к минимуму возникновение ЛУ и передачу вирусов с ней.

Лекарственная устойчивость к нуклеозидным ингибиторам обратной транскрипции

НИОТ представляют собой аналоги естественных нуклеозидов с изменённой структурой; механизм ин-

гибирования связан с терминацией формирования цепи комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК).

Препараты класса НИОТ – первая в порядке изобретения группа АРВП, широко используемая по сей день. Несмотря на значительную частоту побочных эффектов, эти препараты сохраняют свое значение в качестве базовой схемы АРТ, при этом чаще всего в схемах присутствуют два НИОТ и третий препарат другого класса. Период выведения у этих препаратов короткий, поэтому мутации ЛУ ВИЧ формируются очень часто, особенно при недостаточной приверженности. Кроме этого, данный класс препаратов обладает низким генетическим барьером и широким профилем перекрёстной резистентности [31–33].

ЛУ к НИОТ высоко распространена во всех странах мира и регистрируется в 51–75% случаев приобретённой ЛУ у пациентов с вирусологической неэффективностью [31–33]. В России ЛУ к НИОТ возникла у 74,2% ВИЧ-положительных людей с ВН более 1000 копий/мл [31–33].

Наиболее часто встречается мутация M184V [34], связанная со снижением чувствительности к ламивудину (ЗТС), эмтрицитабину (ФТС) и абакавиру (АВС). Эта мутация была обнаружена в 67,3% случаев вирусологического неуспеха АРТ в России, в других странах этот показатель варьировал от 53 до 65% [33, 35]. Особенность этой мутации состоит в том, что, придавая вирусу устойчивость к перечисленным выше препаратам, она повышает восприимчивость к зидовудину (АЗТ, ЗДВ) и тенофовиру (ТДФ) [36, 37]. Есть данные о том, что эта же мутация препятствует появлению мутаций ЛУ к ИП и даже ИИ; этот феномен связывают с повышением точности работы ОТ, имеющей мутацию M184V [38, 39].

Другая значимая мутация к НИОТ – K65R, которая встречается у 20% российских пациентов с подтверждённой неэффективностью лечения схемами, включающими ТДФ. Несмотря на относительно невысокие уровни сниженной чувствительности, связанной с K65R, эта мутация имеет большое клиническое значение, так как обнаружение сочетания K65R + M184V служит основанием для отмены сразу нескольких часто используемых препаратов – АВС, ТДФ, ставудина (d4T) и ЗТС.

Ввиду решающей роли НИОТ-содержащих АРТ-схем, в частности включающих ТДФ, профилактика ЛУ к НИОТ в условиях высокого бремени инфекции имеет первостепенное значение, а высокая доля резистентных к НИОТ вирусов ставит вопрос о пересмотре рекомендуемых схем АРТ.

Лекарственная устойчивость к нуклеозидным ингибиторам обратной транскрипции

ННИОТ – препараты, которые действуют на активный центр ОТ путём изменения его объёмной структуры, ограничивая подвижность отдельных участков центра относительно друг друга и тем самым препятствуя реакции полимеризации кДНК. ННИОТ обладают низким генетическим барьером (одной мутации до-

статочны для достижения полной нечувствительности) и высоким уровнем перекрёстной устойчивости [40]. Препараты обладают высокой эффективностью в отношении подавления ВН, однако имеют ограничения, связанные с высокой токсичностью, которая включает сыпь, реакции гиперчувствительности и побочные эффекты со стороны центральной нервной системы. Продолжающееся широкое применение ННИОТ объясняется, в частности, их невысокой стоимостью.

Важной особенностью этих препаратов является длительный период выведения, способствующий возникновению мутаций ЛУ ВИЧ, например, в случае относительно длительных перерывов в лечении.

В ряде исследований было показано, что ЛУ к препаратам класса ННИОТ у пациентов, имеющих опыт приёма АРТ, возникает в 36–86% случаев её неуспеха. В некоторых странах отмечается более высокая частота мутаций к ННИОТ по сравнению с НИОТ [31–33]. В России устойчивость к ННИОТ у пациентов, имеющих опыт приёма АРТ, варьирует в пределах 24–70% в зависимости от выборки и региона [33].

Текущие эпидемиологические данные свидетельствуют о растущей распространённости первичной резистентности к ННИОТ, при этом отмечаются значимые различия между странами. Например, 6,9% пациентов без опыта АРТ в США имели мутации ЛУ к ННИОТ [41, 42]. В исследовании ЛУ перед началом исследования, проведенном в Гондурасе, у 26% ВИЧ-инфицированных людей возникали мутации к ННИОТ, в то же время в Европе этот показатель достигал 10% [43].

Наиболее частыми мутациями, связанными с устойчивостью к ННИОТ, являются K103N, Y181C, G190A и K101E, которые придают высокий уровень перекрёстной устойчивости к EFV и NVP – наиболее часто используемыми ННИОТ в ряде стран, в том числе и в России [44]. В недавнем исследовании российских пациентов частота мутаций K103N, Y181C, G190A и K101E составила 20, 19, 37 и 25% соответственно [33].

К классу ННИОТ второго поколения относятся этравирин (ETV) и рилпивирин (RPV). Эти препараты эффективны в отношении вирусов, имеющих мутации к EFV и NVP, однако обладают собственным спектром мутаций ЛУ, к числу которых относятся K101P и Y181I/V. Последним из зарегистрированных препаратов является доравирин (DOR), эффективный против всех вирусов, резистентных к прочим ННИОТ, за исключением имеющих мутацию V106A/M.

Таким образом, препараты класса ННИОТ отличаются наиболее выраженной склонностью к формированию устойчивых вариантов ВИЧ. В сочетании с заметной токсичностью этот факт требует пересмотра состава рекомендуемых схем АРТ.

Лекарственная устойчивость к ингибиторам протеазы

ИП действуют на активный центр фермента, изменяя его структуру так, что его способность к нарезанию субстрата практически полностью блокируется. Свою репутацию высокобарьерных препаратов ИП за-

служили благодаря добавлению к ним ритонавира (r) в низких дозах в качестве бустирующего агента (d4T + 3TC + LPV/r (лопинавир), ABC + 3TC + FPV/r (фосампренавир)). Наиболее часто используются усиленные (бустированные) препараты LPV/r, ATV/r (атазанавир) и DRV/r (дарунавир).

Резистентность к бустированным ИП, используемым в составе первой линии терапии, встречается редко ввиду того, что они обладают очень высоким генетическим и фармакологическим барьером резистентности. Недостатком препаратов этого класса является перекрёстная устойчивость, а также высокий уровень токсических эффектов и в особенности отдалённые последствия применения, что в последние годы стало ограничивать терапию ИП.

Наиболее известные мутации ЛУ, вызывающие устойчивость ко всем ИП, включают M46I/L/V, D30N, V32I, G48V/M, I50V/L, V82A/T/L/F/S/C/M и I84V/A/C, L90M. Замены M46I и M46V встречаются у 10–20% пациентов с неуспехом и снижают чувствительность вируса к ATV, APV, NFV, LPV. В российской когорте пациентов с неуспехом АРТ мутации M46I/L/V и I50V/L встречались с частотой 4,9 и 3,6% соответственно.

Исследуется вероятность возникновения мутаций ЛУ вне участка генома, кодирующего протеазу [45, 46]: в частности, есть данные о том, что мутации в гене *gag* и цитоплазматическом домене gp41 (gp41-CD) способствуют устойчивости к ИП [47].

Лекарственная устойчивость к ингибиторам переноса цепи интегразой

Ингибиторы переноса цепи интегразой (ИИ) ВИЧ включают препараты первого и второго поколений. К первым (ИИ-1) относятся ралтегравир (RAL), который активно использовался в качестве альтернативной схемы у пациентов, имеющих неуспех первой линии терапии, и элвитегравир (ELV). Вторую группу (ИИ-2) составляют долутегравир (DTG), биктегравир (BIC), а также каботегравир (CAB) – первый инъекционный препарат длительного действия. Механизм действия ИИ необычен и связан с удалением двухвалентных катионов Mn⁺⁺ из активного центра фермента. Препараты отличает высокая эффективность в отношении подавления репликации ВИЧ.

Отношение к резистентности у препаратов разных поколений сильно различается. Генетический барьер ИИ-1 можно назвать очень низким, поэтому ЛУ к этим препаратам вырабатывается быстро и часто; кроме того, между RAL и EVG имеется перекрёстная резистентность. Основные мутации ЛУ к ИИ-1 – Q148H/K/R, N155H и Y143C/R/H, для ELV – дополнительно E92Q. К основным указанным мутациям обычно присоединяются вторичные, способные восстанавливать сниженную репликативную способность мутантного вируса и одновременно с этим повышать его устойчивость, иногда многократно.

Частота формирования вирусов, устойчивых к ИИ-1, примерно одинакова во всех странах, и при неуспехе АРТ составляет около 10–15% [48]. В России в каче-

стве ИИ-1 применяется только RAL, частота мутаций к нему –12,1%.

ИИ-2 DTG и BIC способны эффективно ингибировать большинство мутантов ВИЧ-1, устойчивых к RAL и EVG [49–51], за исключением мутации Q148R/H, при этом ИИ-2 отличается значительно более высоким собственным генетическим барьером, что объясняется несколькими причинами. Одна из них заключается в том, что возникающие к DTG мутации R263K и G118R заметно снижают фитнес вируса, а присоединение вторичных мутаций не только не повышает устойчивость, но и дополнительно ограничивает размножение вируса. В совокупности эти события практически полностью препятствуют появлению резистентных к ИИ-2 вариантов ВИЧ, что находит отражение в крайне низкой частоте их встречаемости, несмотря на формально низкий генетический барьер резистентности.

Другая причина, противодействующая появлению резистентных к ИИ-2 мутаций, заключается в особых свойствах молекул этих ингибиторов, которые способны очень тесно контактировать с активным центром фермента и задерживаться там надолго (до недели), продолжая ингибировать интегразу. Этот феномен, получивший название замедленной диссоциации, позволяет на практике использовать понятие простительности (*pharmacokinetic forgiveness*), которое означает, что пропуск очередного приёма препаратов АРТ может допускаться у пациентов, получающих ИИ-2. Это в значительной степени разрешает проблему приверженности, так как применительно к другим препаратам такого допущения быть не может по причине быстрого возникновения резистентных штаммов при снижении концентрации препарата.

Несмотря на фактически высокую защиту от устойчивости, потенциал развития резистентности к DTG сохраняется, оставаясь минимальным. Большинство данных о высокой резистентности к DTG связано с мутациями R263K и G118R, которые, как было сказано выше, снижают репликативную способность вируса. Сведения о генетических механизмах резистентности к DTG были получены от пациентов, ранее уже принимавших RAL или EVG и получавших спасительную терапию DTG [49]. В этих исследованиях пациенты с вирусами, содержащими мутацию Q148R/H в сочетании с мутациями E138K ± G140, которые были получены в ходе лечения RAL и EVG, подвергались повышенному риску вирусологической неудачи лечения DTG. Ряд дополнительных мутаций устойчивости к ИИ, а также N155H, по-видимому, увеличивают риск вирусологического неуспеха на фоне приёма DTG, особенно когда эти мутации присутствуют в сочетании с Q148R/H.

Таким образом, многочисленные исследования генетического барьера устойчивости к DTG, а также сведения о его хорошей переносимости и незначительном числе побочных эффектов дают основания для его использования в составе первой линии терапии ВИЧ (это рекомендуют сейчас все клинические руководства, включая российские), но также указыва-

ют на необходимость продолжения разработок новых препаратов.

Совсем недавно были одобрены два дополнительных препарата, относящихся к классу ИИ, – BIC и CAB. По сравнению с DTG, BIC демонстрирует улучшенный противовирусный потенциал в отношении клинических изолятов, устойчивых к ИИ-1, а также низкую скорость развития мутаций резистентности [52, 53]. В то же время сообщалось, что мутации Q148R и R263K/M50I, как и у DTG, снижают эффективность BIC [53]. Другой недавно одобренный ИИ-2 CAB, который применяется в качестве терапии пролонгированного действия (CAB-LA) в сочетании с RPV, а также для доконтрактной профилактики ВИЧ-инфекции в качестве монотерапии, показал хорошую переносимость и эффективное лечение ВИЧ-инфекции в сочетании с другими обычно используемыми пероральными НИОТ, а также при использовании в инъекционной форме с RPV [54].

Несмотря на все достоинства CAB, уже известны мутации, придающие устойчивость к нему. Так, сообщалось об основных мутациях резистентности R263K и Q148H/K/R, включая G140R и G118R, и дополнительных мутациях N155H, S153FY, G140ACS, E138AKT и T66K. Иными словами, профиль резистентности CAB в основном совпадает с таковым для DTG и требует аналогичного к себе отношения [55].

Таким образом, на сегодняшний день безусловными лидерами по эффективности, переносимости и низкой частоте резистентности являются препараты класса ИИ-2. Тем не менее появляющиеся новые данные о ЛУ у пациентов с опытом приёма АРТ и без него [56–58], а также низкий генетический барьер устойчивости указывают на целесообразность продолжения разработки новых препаратов.

Антиретровирусные препараты пролонгированного действия

Поддержание стойкого подавления ВН остается проблемой лечения ВИЧ отчасти потому, что все доступные пероральные схемы АРТ требуют соблюдения высокого уровня приверженности, на которую могут влиять забывчивость, напряжённый образ жизни, изменения в распорядке дня, депрессия, злоупотребление алкоголем или психоактивными веществами, а также страх раскрытия болезни. Кроме того, так называемая усталость от лечения приводит к снижению бдительности в отношении сохранения приверженности к режимам хронического лечения [59]. Следовательно, улучшенные схемы АРТ со стратегиями менее частого дозирования по-прежнему востребованы у людей, живущих с ВИЧ.

Инъекционные схемы пролонгированного действия – альтернатива, которая поможет освободить пациентов от бремени ежедневных режимов и потенциально обеспечить более высокую приверженность и, таким образом, защиту от резистентности ВИЧ. В ближайшей перспективе в практику будут внедрены инъекционные препараты длительного действия на основе CAB из класса ИИ-2 в сочетании с RPV.

В исследованиях ATLAS, ATLAS-2M и FLAIR [54, 60] была продемонстрирована одинаковая эффективность (93%) комбинации САВ и RPV в виде инъекций каждые 4 нед. либо каждые 8 нед. среди пациентов с опытом приёма АРВП и без него с доказанной вирусологической супрессией; общий уровень удержания участников сохранялся на уровне 93%. Тем не менее случаи неуспеха лечения отмечались и в этих исследованиях.

Ретроспективный анализ генотипической и фенотипической резистентности показал, что геномы ВИЧ пяти из восьми пациентов, имевших определяемую ВН, содержали мутацию L74I, связанную с устойчивостью к ИИ, а также мутации, связанные с устойчивостью к ННИОТ (Y181C + H221Y, Y188Y/F/H/L, Y188L, E138A, E138E/A), в некоторых случаях в сочетании с архивированной основной мутацией, связанной с устойчивостью к ИИ (G140G/R). Отметим, что мутация L74I является характеристической для суб-субтипа А6, доминирующего в России, и встречается у 93% пациентов, не получавших АРТ [61]. Хотя исследования *in vitro* не показали различий в чувствительности к САВ вирусов с мутацией L74I и без неё, клинические данные этому противоречат, и неизвестно, имеют ли вирусы А6 с L74I большую вероятность неуспеха при лечении САВ [60].

В дополнение к указанным разработкам ведутся исследования по таким препаратам, как ленакапавир (ингибитор капсидного белка ВИЧ-1), ислатрапавир (новый аналог нуклеозида ВИЧ-1 – ингибитор транслонки OT) и доравирин из класса ННИОТ. Данные препараты уже показали свою эффективность в клинических исследованиях, а также *in vitro* [62, 63], при этом часть из них также рассчитана на применение в формате пролонгированного действия.

Лекарственная устойчивость при доконтактной профилактике

Немаловажной темой, которая активно обсуждается в последнее время, является ЛУ при доконтактной профилактике (ДКП) ВИЧ-инфекции.

ДКП – это способ предотвращения передачи ВИЧ-инфекции среди наиболее рискованных групп лиц, к которым относятся гомосексуальные и другие мужчины, имеющие половые отношения с мужчинами, трансгендерные лица, работники секс-бизнеса, серодискордантные пары и пр.

Профилактика заражения ВИЧ обычно заключается в пероральном приёме АРВП – комбинации TDF и FTC на постоянной основе аналогично лечению ВИЧ-инфицированных пациентов; иногда период приёма АРТ для ДКП ограничивают до недель и месяцев, если реальный риск заражения заметно уменьшается со временем. Такая схема была рекомендована в 2012 г. FDA (U.S. Food and Drug Administration – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) для мужчин, практикующих секс с мужчинами, и позднее распространялась на другие группы лиц – бисексуальных мужчин, серодискордантные пары, работников

секс-индустрии, а также потребителей инъекционных наркотиков и их партнёров, при этом эффективность профилактики составила не менее 80% [64–66]. В наши дни к этим схемам планируется добавить вагинальное кольцо с ННИОТ дапивирином (DPV) и инъекционный САВ длительного действия (САВ-LA), которые в настоящее время проходят нормативную проверку.

Потенциальная проблема ДКП в отношении резистентности заключается в том, что одни и те же препараты и классы препаратов используются как для профилактики, так и для лечения ВИЧ, например TDF и FTC для пероральной ДКП и для АРТ первого ряда. Расширение использования АРВП для ДКП может способствовать отбору и мутаций ЛУ ВИЧ, что может поставить под угрозу эффективность АРВП как для лечения, так и для профилактики.

Практические наблюдения, сделанные в ходе клинических испытаний и последующего применения, указывают на то, что при хорошей приверженности случаи возникновения ЛУ-штаммов очень редки и составляют около 3% при условии, что ДКП не была назначена в периоде острой инфекции [67], поэтому при установлении острого диагноза ДКП не назначают. Математическое моделирование подтверждает, что число предотвращённых с помощью ДКП случаев ВИЧ-инфекции существенно превосходит число возможных случаев устойчивости.

Заключение

Таким образом, несмотря на очевидные успехи современной АРТ в сохранении и улучшении качества жизни ВИЧ-инфицированных пациентов, проблема ЛУ продолжает сохранять свою актуальность. Имеющиеся данные указывают на необходимость совершенствования схем лечения и отказа от некоторых препаратов, включая ННИОТ, в пользу расширения новых препаратов, и прежде всего ИИ-2, зарекомендовавших себя в качестве менее подверженных формированию мутаций ЛУ ВИЧ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Федеральный научно-методический Центр по профилактике и борьбе со СПИДом. Справка ВИЧ в России на 31.12.2021 г. Available at: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2022/03/Spravka-VICH-v-Rossii-na-31.12.2021-g..pdf>
2. WHO. The HIV drug resistance report – 2012. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/75183>
3. Perera M.R., Wills M.R., Sinclair J.H. HCMV antivirals and strategies to target the latent reservoir. *Viruses*. 2021; 13(5): 817. <https://doi.org/10.3390/v13050817>
4. Frange P., Leruez-Ville M. Maribavir, brincidofovir and letermovir: Efficacy and safety of new antiviral drugs for treating cytomegalovirus infections. *Med. Mal. Infect.* 2018; 48(8): 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2018.03.006>
5. Wittkop L., Gunthard H.F., de Wolf F., Dunn D., Cozzi-Lepri A., de Luca A., et al. Effect of transmitted drug resistance on virological and immunological response to initial combination antiretroviral therapy for HIV (EuroCoord-CHAIN joint project): a European multicohort study. *Lancet Infect. Dis.* 2011; 11(5): 363–71. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70032-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70032-9)
6. Macdonald V., Mbuagbaw L., Jordan M.R., Mathers B., Jay S., Baggaley R., et al. Prevalence of pretreatment HIV drug resistance

- in key populations: a systematic review and meta-analysis. *J. Int. AIDS Soc.* 2020; 23(12): e25656. <https://doi.org/10.1002/jia2.25656>
7. Gupta-Wright A., Fielding K., van Oosterhout J.J., Alufandika M., Grint D.J., Chimbayo E., et al. Virological failure, HIV-1 drug resistance, and early mortality in adults admitted to hospital in Malawi: an observational cohort study. *Lancet HIV.* 2020; 7(9): e620–8. [https://doi.org/10.1016/s2352-3018\(20\)30172-7](https://doi.org/10.1016/s2352-3018(20)30172-7)
 8. Moraka N.O., Garcia-Broncano P., Hu Z., Ajibola G., Bareng O.T., Pretorius-Holme M., et al. Patterns of pretreatment drug resistance mutations of very early diagnosed and treated infants in Botswana. *AIDS.* 2021; 35(15): 2413–21. <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000003041>
 9. Willim R., Shadabi E., Sampathkumar R., Li L., Balshaw R., Kimani J., et al. High level of pre-treatment HIV-1 drug resistance and its association with HLA class I-mediated restriction in the Pumwani Sex Worker cohort. *Viruses.* 2022; 14(2): 273. <https://doi.org/10.3390/v14020273>
 10. Weidle P.J., Mastro T.D., Grant A.D., Nkengasong J., Macharia D. HIV/AIDS treatment and HIV vaccines for Africa. *Lancet.* 2002; 359(9325): 2261–7. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(02\)09297-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(02)09297-8)
 11. Little S.J., Holte S., Routy J.P., Daar E.S., Markowitz M., Collier A.C., et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347(6): 385–94. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa013552>
 12. Blower S., Volberding P. What can modeling tell us about the threat of antiviral drug resistance? *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2002; 15(6): 609–14. <https://doi.org/10.1097/00001432-200212000-00009>
 13. Hecht F.M., Grant R.M., Petropoulos C.J., Dillon B., Chesney M.A., Tian H., et al. Sexual transmission of an HIV-1 variant resistant to multiple reverse-transcriptase and protease inhibitors. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339(5): 307–11. <https://doi.org/10.1056/nejm199807303390504>
 14. Ammaranond P., Cunningham P., Oelrichs R., Suzuki K., Harris C., Leas L., et al. Rates of transmission of antiretroviral drug resistant strains of HIV-1. *J. Clin. Virol.* 2003; 26(2): 153–61. [https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(02\)00114-2](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(02)00114-2)
 15. Bertagnolio S., Beanland R.L., Jordan M.R., Doherty M., Hirschall G. The World Health Organization's response to emerging human immunodeficiency virus drug resistance and a call for global action. *J. Infect. Dis.* 2017; 216(Suppl. 9): S801–4. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix402>
 16. Лага В.Ю., Немыкин А.В., Бегма Е.Н., Страхова А.М., Васильева Н.А., Ожмегова Е.Н. и др. Молекулярно-генетический анализ вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в Республике Крым. *ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии.* 2019; 11(4): 91–7. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2019-11-4-91-97>
 17. Van Cleef G.F., Fisher E.J., Polk R.E. Drug interaction potential with inhibitors of HIV protease. *Pharmacotherapy.* 1997; 17(4): 774–8.
 18. King J.R., Wynn H., Brundage R., Acosta E.P. Pharmacokinetic enhancement of protease inhibitor therapy. *Clin. Pharmacokinet.* 2004; 43(5): 291–310. <https://doi.org/10.2165/00003088-200443050-00003>
 19. Larder B. Mechanisms of HIV-1 drug resistance. *AIDS.* 2001; 15(Suppl. 5): S27–34. <https://doi.org/10.1097/00002030-200100005-00005>
 20. Deeks S.G., Wrin T., Liegler T., Hoh R., Hayden M., Barbour J.D., et al. Virologic and immunologic consequences of discontinuing combination antiretroviral-drug therapy in HIV-infected patients with detectable viremia. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344(7): 472–80. <https://doi.org/10.1056/nejm200102153440702>
 21. Bangsberg D.R., Deeks S.G. Is average adherence to HIV antiretroviral therapy enough? *J. Gen. Intern. Med.* 2002; 17(10): 812–3. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1497.2002.20812.x>
 22. Viswanathan S., Detels R., Mehta S.H., Macatangay B.J., Kirk G.D., Jacobson L.P. Level of adherence and HIV RNA suppression in the current era of highly active antiretroviral therapy (HAART). *AIDS Behav.* 2015; 19(4): 601–11. <https://doi.org/10.1007/s10461-014-0927-4>
 23. Parienti J.J., Bangsberg D.R., Verdon R., Gardner E.M. Better adherence with once-daily antiretroviral regimens: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48(4): 484–8. <https://doi.org/10.1086/596482>
 24. Bangsberg D.R., Ragland K., Monk A., Deeks S.G. A single tablet regimen is associated with higher adherence and viral suppression than multiple tablet regimens in HIV+ homeless and marginally housed people. *AIDS.* 2010; 24(18): 2835–40. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328340a209>
 25. AIDSinfo. Side Effects of Anti-HIV Medications. Available at: <https://doh.dc.gov/sites/default/files/dc/sites/doh/publication/attachments/sideeffectantithivmeds.pdf>
 26. Caramelli B. Cardiovascular risk and metabolic effects in HIV patients. In: *Proceedings of 29th World Congress of Internal Medicine.* Buenos Aires; 2008: 16–20.
 27. Richman D.D. HIV chemotherapy. *Nature.* 2001; 410(6831): 995–1001. <https://doi.org/10.1038/35073673>
 28. Bangsberg D.R., Moss A.R., Deeks S.G. Paradoxes of adherence and drug resistance to HIV antiretroviral therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004; 53(5): 696–9. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh162>
 29. Bennett D.E., Jordan M.R., Bertagnolio S., Hong S.Y., Ravasi G., McMahon J.H., et al. HIV drug resistance early warning indicators in cohorts of individuals starting antiretroviral therapy between 2004 and 2009: World Health Organization global report from 50 countries. *Clin. Infect. Dis.* 2012; 54(Suppl. 4): S280–9. <https://doi.org/10.1093/cid/cis207>
 30. WHO. Global report on early warning indicators of HIV drug resistance – 2016. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246219/9789241511179-eng.pdf?sequence=1>
 31. Rojas Sánchez P., Domínguez S., Jiménez De Ory S., Prieto L., Rojo P., Mellado P., et al. Trends in drug resistance prevalence, HIV-1 variants and clinical status in HIV-1-infected pediatric population in Madrid: 1993 to 2015 analysis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2018; 37(3): e48–57. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000001760>
 32. Schmidt D., Kollan C., Fätkenheuer G., Schülter E., Stellbrink H.J., Noah C., et al. Estimating trends in the proportion of transmitted and acquired HIV drug resistance in a long term observational cohort in Germany. *PLoS One.* 2014; 9(8): e104474. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104474>
 33. Кириченко А.А., Киреев Д.Е., Шлыкова А.В., Лопатухин А.Э., Лаповок И.А., Салеева Д.В. и др. Лекарственная устойчивость ВИЧ-1 у пациентов с вирусологической неэффективностью АРТ в России (2013–2021 гг.). *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2021; 11(3): 53–62. <https://doi.org/10.18565/epidem.2021.11.3.53-62>
 34. Rhee S.Y., Jordan M.R., Raizes E., Chua A., Parkin N., Kantor R., et al. HIV-1 drug resistance mutations: potential applications for point-of-care genotypic resistance testing. *PLoS One.* 2015; 10(12): e0145772. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145772>
 35. Pimentel V., Pingarilho M., Alves D., Diogo I., Fernandes S., Miranda M., et al. Molecular epidemiology of HIV-1 infected migrants followed up in Portugal: Trends between 2001–2017. *Viruses.* 2020; 12(3): 268. <https://doi.org/10.3390/v12030268>
 36. Campbell T.B., Shulman N.S., Johnson S.C., Zolopa A.R., Young R.K., Bushman L., et al. Antiviral activity of lamivudine in salvage therapy for multidrug-resistant HIV-1 infection. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 41(2): 236–42. <https://doi.org/10.1086/430709>
 37. Kuritzkes D.R. Clinical significance of drug resistance in HIV-1 infection. *AIDS.* 1996; 10(Suppl. 5): S27–31. <https://doi.org/10.1097/00002030-199612005-00005>
 38. Turner D., Brenner B., Wainberg M.A. Multiple effects of the M184V resistance mutation in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10(6): 979–81. <https://doi.org/10.1128/cdli.10.6.979-981.2003>
 39. Petrella M., Wainberg M.A. Might the M184V substitution in HIV-1 RT confer clinical benefit? *AIDS Rev.* 2002; 4(4): 224–32.
 40. Melikian G.L., Rhee S.Y., Varghese V., Porter D., White K., Taylor J., et al. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) cross-resistance: implications for preclinical evaluation of novel NNRTIs and clinical genotypic resistance testing. *J. Antimicrob. Chemother.* 2014; 69(1): 12–20. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt316>
 41. Kuritzkes D.R., Lalama C.M., Ribaldo H.J., Marcial M., Meyer W.A. 3rd, Shikuma C., et al. Preexisting resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors predicts virologic failure of an efavirenz-based regimen in treatment-naïve HIV-1-infected subjects. *J. Infect. Dis.* 2008; 197(6): 867–70. <https://doi.org/10.1086/528802>
 42. Gallant J.E., DeJesus E., Arribas J.R., Pozniak A.L., Gazzard B., Campo R.E., et al. Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and efavirenz for HIV. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354(3): 251–60. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051871>

43. Hofstra L.M., Sauvageot N., Albert J., Alexiev I., Garcia F., Struck D., et al. Transmission of HIV drug resistance and the predicted effect on current first-line regimens in Europe. *Clin. Infect. Dis.* 2016; 62(5): 655–63. <https://doi.org/10.1093/cid/civ963>
44. Wensing A.M., Calvez V., Ceccherini-Silberstein F., Charpentier C., Günthard H.F., Paredes R., et al. 2019 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top. Antivir. Med.* 2019; 27(3): 111–21.
45. Fun A., Wensing A.M., Verheyen J., Nijhuis M. Human immunodeficiency virus gag and protease: partners in resistance. *Retrovirology.* 2012; 9: 63. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-9-63>
46. Rabi S.A., Laird G.M., Durand C.M., Laskey S., Shan L., Bailey J.R., et al. Multi-step inhibition explains HIV-1 protease inhibitor pharmacodynamics and resistance. *J. Clin. Invest.* 2013; 123(9): 3848–60. <https://doi.org/10.1172/jci67399>
47. Gupta U., Jain N.K. Non-polymeric nano-carriers in HIV/AIDS drug delivery and targeting. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010; 62(4-5): 478–90. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.018>
48. Orta-Resendiz A., Rodriguez-Diaz R.A., Angulo-Medina L.A., Hernandez-Flores M., Soto-Ramirez L.E. HIV-1 acquired drug resistance to integrase inhibitors in a cohort of antiretroviral therapy multi-experienced Mexican patients failing to raltegravir: a cross-sectional study. *AIDS Res. Ther.* 2020; 17(1): 6. <https://doi.org/10.1186/s12981-020-0262-y>
49. Castagna A., Maggiolo F., Penco G., Wright D., Mills A., Grossberg R., et al. Dolutegravir in antiretroviral-experienced patients with raltegravir- and/or elvitegravir-resistant HIV-1: 24-week results of the phase III VIKING-3 study. *J. Infect. Dis.* 2014; 210(3): 354–62. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu051>
50. Smith S.J., Zhao X.Z., Burke T.R. Jr., Hughes S.H. Efficacies of Cabotegravir and Bictegravir against drug-resistant HIV-1 integrase mutants. *Retrovirology.* 2018; 15(1): 37. <https://doi.org/10.1186/s12977-018-0420-7>
51. Eron J.J., Clotet B., Durant J., Katlama C., Kumar P., Lazzarin A., et al. Safety and efficacy of dolutegravir in treatment-experienced subjects with raltegravir-resistant HIV type 1 infection: 24-week results of the VIKING Study. *J. Infect. Dis.* 2013; 207(5): 740–8. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis750>
52. Mespède T., Wainberg M.A. Resistance against integrase strand transfer inhibitors and relevance to HIV persistence. *Viruses.* 2015; 7(7): 3703–18. <https://doi.org/10.3390/v7072790>
53. Hassounah S.A., Alikhani A., Oliveira M., Bharaj S., Ibanescu R.I., Osman N., et al. Antiviral activity of bictegravir and cabotegravir against integrase inhibitor-resistant SIVmac239 and HIV-1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017; 61(12): e01695-17. <https://doi.org/10.1128/aac.01695-17>
54. Rizzardini G., Overton E.T., Orkin C., Swindells S., Arasteh K., Górgolas Hernández-Mora M., et al. Long-acting injectable cabotegravir + rilpivirine for HIV maintenance therapy: week 48 pooled analysis of phase 3 ATLAS and FLAIR trials. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2020; 85(4): 498–506. <https://doi.org/10.1097/qai.0000000000002466>
55. Anstett K., Brenner B., Mespède T., Wainberg M.A. HIV drug resistance against strand transfer integrase inhibitors. *Retrovirology.* 2017; 14(1): 36. <https://doi.org/10.1186/s12977-017-0360-7>
56. Viani R.M., Alvero C., Fenton T., Acosta E.P., Hazra R., Townley E., et al. Safety, pharmacokinetics and efficacy of dolutegravir in treatment-experienced HIV-1 infected adolescents: Forty-eight-week Results from IMPAACT P1093. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2015; 34(11): 1207–13. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000000848>
57. Cahn P., Pozniak A.L., Mingrone H., Shuldyakov A., Brites C., Andrade-Villanueva J.F., et al. Dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-experienced, integrase-inhibitor-naïve adults with HIV: week 48 results from the randomised, double-blind, non-inferiority SAILING study. *Lancet.* 2013; 382(9893): 700–8. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(13\)61221-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(13)61221-0)
58. Lepik K.J., Harrigan P.R., Yip B., Wang L., Robbins M.A., Zhang W.W., et al. Emergent drug resistance with integrase strand transfer inhibitor-based regimens. *AIDS.* 2017; 31(10): 1425–34. <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000001494>
59. Claborn K.R., Meier E., Miller M.B., Leffingwell T.R. A systematic review of treatment fatigue among HIV-infected patients prescribed antiretroviral therapy. *Psychol. Health Med.* 2015; 20(3): 255–65. <https://doi.org/10.1080/13548506.2014.945601>
60. Overton E.T., Richmond G., Rizzardini G., Jaeger H., Orrell C., Nagimova F., et al. Long-acting cabotegravir and rilpivirine dosed every 2 months in adults with HIV-1 infection (ATLAS-2M), 48-week results: a randomised, multicentre, open-label, phase 3b, non-inferiority study. *Lancet.* 2021; 396(10267): 1994–2005. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)32666-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)32666-0)
61. Kirichenko A., Lapovok I., Baryshev P., van de Vijver D., van Kampen J.J.A., Boucher C.A.B., et al. Genetic features of HIV-1 integrase sub-subtype A6 predominant in Russia and predicted susceptibility to INSTIs. *Viruses.* 2020; 12(8): 838. <https://doi.org/10.3390/v12080838>
62. Marcelin A.G., Charpentier C., Jary A., Perrier M., Margot N., Callebaut C., et al. Frequency of capsid substitutions associated with GS-6207 in vitro resistance in HIV-1 from antiretroviral-naïve and -experienced patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 2020; 75(6): 1588–90. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa060>
63. Grobler J.A., Huang Q., Hazuda D., Lai M. Efficacy of MK-8591M against diverse HIV-1 subtypes and NRTI-resistant clinical isolates. In: *International Congress of Drug Therapy in HIV Infection (HIV Glasgow)*. Glasgow; 2018.
64. Celum C., Baeten J.M. Tenofovir-based pre-exposure prophylaxis for HIV prevention: evolving evidence. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2012; 25(1): 51–7. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834ef5ef>
65. Grant R.M., Lama J.R., Anderson P.L., McMahan V., Liu A.Y., Vargas L., et al. Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363(27): 2587–99. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1011205>
66. Andrei G., Lisco A., Vanpouille C., Introini A., Balestra E., van den Oord J., et al. Topical tenofovir, a microbicide effective against HIV, inhibits herpes simplex virus-2 replication. *Cell Host Microbe.* 2011; 10(4): 379–89. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.08.015>
67. Gibas K.M., van den Berg P., Powell V.E., Krakower D.S. Drug resistance during HIV pre-exposure prophylaxis. *Drugs.* 2019; 79(6): 609–19. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01108-x>

REFERENCES

1. Federal Scientific and Methodological Center for the Prevention and Control of AIDS. HIV certificate in Russia as of 31.12.2021. Available at: <http://www.hivrussia.info/wp-content/uploads/2022/03/Spravka-VICH-v-Rossii-na-31.12.2021-g..pdf> (in Russian)
2. WHO. The HIV drug resistance report – 2012. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/75183>
3. Perera M.R., Wills M.R., Sinclair J.H. HCMV antivirals and strategies to target the latent reservoir. *Viruses.* 2021; 13(5): 817. <https://doi.org/10.3390/v13050817>
4. Frange P., Leruez-Ville M. Maribavir, brincidofovir and letermovir: Efficacy and safety of new antiviral drugs for treating cytomegalovirus infections. *Med. Mal. Infect.* 2018; 48(8): 495–502. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2018.03.006>
5. Wittkop L., Günthard H.F., de Wolf F., Dunn D., Cozzi-Lepri A., de Luca A., et al. Effect of transmitted drug resistance on virological and immunological response to initial combination antiretroviral therapy for HIV (EuroCoord-CHAIN joint project): a European multicohort study. *Lancet Infect. Dis.* 2011; 11(5): 363–71. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(11\)70032-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70032-9)
6. Macdonald V., Mbuagbaw L., Jordan M.R., Mathers B., Jay S., Baggaley R., et al. Prevalence of pretreatment HIV drug resistance in key populations: a systematic review and meta-analysis. *J. Int. AIDS Soc.* 2020; 23(12): e25656. <https://doi.org/10.1002/jia2.25656>
7. Gupta-Wright A., Fielding K., van Oosterhout J.J., Alufandika M., Grint D.J., Chimbayo E., et al. Virological failure, HIV-1 drug resistance, and early mortality in adults admitted to hospital in Malawi: an observational cohort study. *Lancet HIV.* 2020; 7(9): e620–8. [https://doi.org/10.1016/s2352-3018\(20\)30172-7](https://doi.org/10.1016/s2352-3018(20)30172-7)
8. Moraka N.O., Garcia-Broncano P., Hu Z., Ajibola G., Bareng O.T., Pretorius-Holme M., et al. Patterns of pretreatment drug resistance mutations of very early diagnosed and treated infants in Botswana. *AIDS.* 2021; 35(15): 2413–21. <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000003041>
9. Willim R., Shadabi E., Sampathkumar R., Li L., Balshaw R., Kimani J., et al. High level of pre-treatment HIV-1 drug resistance and its association with HLA class I-mediated restriction in the Pumwani Sex Worker cohort. *Viruses.* 2022; 14(2): 273. <https://doi.org/10.3390/v14020273>
10. Weidle P.J., Mastro T.D., Grant A.D., Nkengasong J., Macharia D. HIV/AIDS treatment and HIV vaccines for Africa. *Lancet.* 2002; 359(9325): 2261–7. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(02\)09297-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(02)09297-8)

11. Little S.J., Holte S., Routy J.P., Daar E.S., Markowitz M., Collier A.C., et al. Antiretroviral-drug resistance among patients recently infected with HIV. *N. Engl. J. Med.* 2002; 347(6): 385–94. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa013552>
12. Blower S., Volberding P. What can modeling tell us about the threat of antiviral drug resistance? *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2002; 15(6): 609–14. <https://doi.org/10.1097/00001432-200212000-00009>
13. Hecht F.M., Grant R.M., Petropoulos C.J., Dillon B., Chesney M.A., Tian H., et al. Sexual transmission of an HIV-1 variant resistant to multiple reverse-transcriptase and protease inhibitors. *N. Engl. J. Med.* 1998; 339(5): 307–11. <https://doi.org/10.1056/nejm199807303390504>
14. Ammaranond P., Cunningham P., Oelrichs R., Suzuki K., Harris C., Leas L., et al. Rates of transmission of antiretroviral drug resistant strains of HIV-1. *J. Clin. Virol.* 2003; 26(2): 153–61. [https://doi.org/10.1016/s1386-6532\(02\)00114-2](https://doi.org/10.1016/s1386-6532(02)00114-2)
15. Bertagnolio S., Beanland R.L., Jordan M.R., Doherty M., Hirschall G. The World Health Organization's response to emerging human immunodeficiency virus drug resistance and a call for global action. *J. Infect. Dis.* 2017; 216(Suppl. 9): S801–4. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix402>
16. Laga V.Yu., Nemykin A.V., Begma E.N., Strakhova A.M., Vasil'eva N.A., Ozhmegova E.N., et al. Molecular genetic analysis of HIV-1 variants circulating in the Republic of Crimea. *VICH-infektsiya i immunosupressii.* 2019; 11(4): 91–7. <https://doi.org/10.22328/2077-9828-2019-11-4-91-97> (in Russian)
17. Van Cleef G.F., Fisher E.J., Polk R.E. Drug interaction potential with inhibitors of HIV protease. *Pharmacotherapy.* 1997; 17(4): 774–8.
18. King J.R., Wynn H., Brundage R., Acosta E.P. Pharmacokinetic enhancement of protease inhibitor therapy. *Clin. Pharmacokinet.* 2004; 43(5): 291–310. <https://doi.org/10.2165/00003088-200443050-00003>
19. Larder B. Mechanisms of HIV-1 drug resistance. *AIDS.* 2001; 15(Suppl. 5): S27–34. <https://doi.org/10.1097/00002030-200100005-00005>
20. Deeks S.G., Wrin T., Liegler T., Hoh R., Hayden M., Barbour J.D., et al. Virologic and immunologic consequences of discontinuing combination antiretroviral-drug therapy in HIV-infected patients with detectable viremia. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344(7): 472–80. <https://doi.org/10.1056/nejm200102153440702>
21. Bangsberg D.R., Deeks S.G. Is average adherence to HIV antiretroviral therapy enough? *J. Gen. Intern. Med.* 2002; 17(10): 812–3. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1497.2002.20812.x>
22. Viswanathan S., Detels R., Mehta S.H., Macatangay B.J., Kirk G.D., Jacobson L.P. Level of adherence and HIV RNA suppression in the current era of highly active antiretroviral therapy (HAART). *AIDS Behav.* 2015; 19(4): 601–11. <https://doi.org/10.1007/s10461-014-0927-4>
23. Parienti J.J., Bangsberg D.R., Verdon R., Gardner E.M. Better adherence with once-daily antiretroviral regimens: a meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48(4): 484–8. <https://doi.org/10.1086/596482>
24. Bangsberg D.R., Ragland K., Monk A., Deeks S.G. A single tablet regimen is associated with higher adherence and viral suppression than multiple tablet regimens in HIV+ homeless and marginally housed people. *AIDS.* 2010; 24(18): 2835–40. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e32832840a209>
25. AIDSinfo. Side Effects of Anti-HIV Medications. Available at: <https://doh.dc.gov/sites/default/files/dc/sites/doh/publication/attachments/sideeffectanithivmeds.pdf>
26. Caramelli B. Cardiovascular risk and metabolic effects in HIV patients. In: *Proceedings of 29th World Congress of Internal Medicine.* Buenos Aires; 2008: 16–20.
27. Richman D.D. HIV chemotherapy. *Nature.* 2001; 410(6831): 995–1001. <https://doi.org/10.1038/35073673>
28. Bangsberg D.R., Moss A.R., Deeks S.G. Paradoxes of adherence and drug resistance to HIV antiretroviral therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 2004; 53(5): 696–9. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh162>
29. Bennett D.E., Jordan M.R., Bertagnolio S., Hong S.Y., Ravasi G., McMahon J.H., et al. HIV drug resistance early warning indicators in cohorts of individuals starting antiretroviral therapy between 2004 and 2009: World Health Organization global report from 50 countries. *Clin. Infect. Dis.* 2012; 54(Suppl. 4): S280–9. <https://doi.org/10.1093/cid/cis207>
30. WHO. Global report on early warning indicators of HIV drug resistance – 2016. Available at: <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246219/9789241511179-eng.pdf?sequence=1>
31. Rojas Sánchez P., Domínguez S., Jiménez De Ory S., Prieto L., Rojo P., Mellado P., et al. Trends in drug resistance prevalence, HIV-1 variants and clinical status in HIV-1-infected pediatric population in Madrid: 1993 to 2015 analysis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2018; 37(3): e48–57. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000001760>
32. Schmidt D., Kollan C., Fätkenheuer G., Schülter E., Stellbrink H.J., Noah C., et al. Estimating trends in the proportion of transmitted and acquired HIV drug resistance in a long term observational cohort in Germany. *PLoS One.* 2014; 9(8): e104474. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104474>
33. Kirichenko A.A., Kireev D.E., Shlykova A.V., Lopatukhin A.E., Lapovok I.A., Saleeva D.V., et al. HIV-1 drug resistance in patients with virological inefficiency on ART in Russia in 2013–2021. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni. Aktual'nye voprosy.* 2021; 11(3): 53–62. <https://doi.org/10.18565/epidem.2021.11.3.53-62> (in Russian)
34. Rhee S.Y., Jordan M.R., Raizes E., Chua A., Parkin N., Kantor R., et al. HIV-1 drug resistance mutations: potential applications for point-of-care genotypic resistance testing. *PLoS One.* 2015; 10(12): e0145772. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145772>
35. Pimentel V., Pingarilho M., Alves D., Diogo I., Fernandes S., Miranda M., et al. Molecular epidemiology of HIV-1 infected migrants followed up in Portugal: Trends between 2001–2017. *Viruses.* 2020; 12(3): 268. <https://doi.org/10.3390/v12030268>
36. Campbell T.B., Shulman N.S., Johnson S.C., Zolopa A.R., Young R.K., Bushman L., et al. Antiviral activity of lamivudine in salvage therapy for multidrug-resistant HIV-1 infection. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 41(2): 236–42. <https://doi.org/10.1086/430709>
37. Kuritzkes D.R. Clinical significance of drug resistance in HIV-1 infection. *AIDS.* 1996; 10(Suppl. 5): S27–31. <https://doi.org/10.1097/00002030-199612005-00005>
38. Turner D., Brenner B., Wainberg M.A. Multiple effects of the M184V resistance mutation in the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2003; 10(6): 979–81. <https://doi.org/10.1128/cdli.10.6.979-981.2003>
39. Petrella M., Wainberg M.A. Might the M184V substitution in HIV-1 RT confer clinical benefit? *AIDS Rev.* 2002; 4(4): 224–32.
40. Melikian G.L., Rhee S.Y., Varghese V., Porter D., White K., Taylor J., et al. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor (NNRTI) cross-resistance: implications for preclinical evaluation of novel NNRTIs and clinical genotypic resistance testing. *J. Antimicrob. Chemother.* 2014; 69(1): 12–20. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt316>
41. Kuritzkes D.R., Lalama C.M., Ribaudo H.J., Marcial M., Meyer W.A. 3rd, Shikuma C., et al. Preexisting resistance to nonnucleoside reverse-transcriptase inhibitors predicts virologic failure of an efavirenz-based regimen in treatment-naïve HIV-1-infected subjects. *J. Infect. Dis.* 2008; 197(6): 867–70. <https://doi.org/10.1086/528802>
42. Gallant J.E., DeJesus E., Arribas J.R., Pozniak A.L., Gazzard B., Campo R.E., et al. Tenofovir DF, emtricitabine, and efavirenz vs. zidovudine, lamivudine, and efavirenz for HIV. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354(3): 251–60. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa051871>
43. Hofstra L.M., Sauvageot N., Albert J., Alexiev I., Garcia F., Struck D., et al. Transmission of HIV drug resistance and the predicted effect on current first-line regimens in Europe. *Clin. Infect. Dis.* 2016; 62(5): 655–63. <https://doi.org/10.1093/cid/civ963>
44. Wensing A.M., Calvez V., Ceccherini-Silberstein F., Charpentier C., Günthard H.F., Paredes R., et al. 2019 update of the drug resistance mutations in HIV-1. *Top. Antivir. Med.* 2019; 27(3): 111–21.
45. Fun A., Wensing A.M., Verheyen J., Nijhuis M. Human immunodeficiency virus gag and protease: partners in resistance. *Retrovirology.* 2012; 9: 63. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-9-63>
46. Rabi S.A., Laird G.M., Durand C.M., Laskey S., Shan L., Bailey J.R., et al. Multi-step inhibition explains HIV-1 protease inhibitor pharmacodynamics and resistance. *J. Clin. Invest.* 2013; 123(9): 3848–60. <https://doi.org/10.1172/jci67399>
47. Gupta U., Jain N.K. Non-polymeric nano-carriers in HIV/AIDS drug delivery and targeting. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010; 62(4-5): 478–90. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.11.018>
48. Orta-Resendiz A., Rodriguez-Diaz R.A., Angulo-Medina L.A., Hernandez-Flores M., Soto-Ramirez L.E. HIV-1 acquired drug resistance to integrase inhibitors in a cohort of antiretroviral therapy multi-experienced Mexican patients failing to raltegravir: a cross-sectional study. *AIDS Res. Ther.* 2020; 17(1): 6. <https://doi.org/10.1186/s12981-020-0262-y>

49. Castagna A., Maggiolo F., Penco G., Wright D., Mills A., Grossberg R., et al. Dolutegravir in antiretroviral-experienced patients with raltegravir- and/or elvitegravir-resistant HIV-1: 24-week results of the phase III VIKING-3 study. *J. Infect. Dis.* 2014; 210(3): 354–62. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu051>
50. Smith S.J., Zhao X.Z., Burke T.R. Jr., Hughes S.H. Efficacies of Cabotegravir and Bictegravir against drug-resistant HIV-1 integrase mutants. *Retrovirology.* 2018; 15(1): 37. <https://doi.org/10.1186/s12977-018-0420-7>
51. Eron J.J., Clotet B., Durant J., Katlama C., Kumar P., Lazzarin A., et al. Safety and efficacy of dolutegravir in treatment-experienced subjects with raltegravir-resistant HIV type 1 infection: 24-week results of the VIKING Study. *J. Infect. Dis.* 2013; 207(5): 740–8. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis750>
52. Mesplède T., Wainberg M.A. Resistance against integrase strand transfer inhibitors and relevance to HIV persistence. *Viruses.* 2015; 7(7): 3703–18. <https://doi.org/10.3390/v7072790>
53. Hassounah S.A., Alikhani A., Oliveira M., Bharaj S., Ibanescu R.I., Osman N., et al. Antiviral activity of bictegravir and cabotegravir against integrase inhibitor-resistant HIVmac239 and HIV-1. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017; 61(12): e01695-17. <https://doi.org/10.1128/aac.01695-17>
54. Rizzardini G., Overton E.T., Orkin C., Swindells S., Arasteh K., Górgolas Hernández-Mora M., et al. Long-acting injectable cabotegravir + rilpivirine for HIV maintenance therapy: week 48 pooled analysis of phase 3 ATLAS and FLAIR trials. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2020; 85(4): 498–506. <https://doi.org/10.1097/qai.0000000000002466>
55. Anstett K., Brenner B., Mesplede T., Wainberg M.A. HIV drug resistance against strand transfer integrase inhibitors. *Retrovirology.* 2017; 14(1): 36. <https://doi.org/10.1186/s12977-017-0360-7>
56. Viani R.M., Alvero C., Fenton T., Acosta E.P., Hazra R., Townley E., et al. Safety, pharmacokinetics and efficacy of dolutegravir in treatment-experienced HIV-1 infected adolescents: Forty-eight-week Results from IMPAACT P1093. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2015; 34(11): 1207–13. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000000848>
57. Cahn P., Pozniak A.L., Mingrone H., Shuldyakov A., Brites C., Andrade-Villanueva J.F., et al. Dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-experienced, integrase-inhibitor-naïve adults with HIV: week 48 results from the randomised, double-blind, non-inferiority SAILING study. *Lancet.* 2013; 382(9893): 700–8. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(13\)61221-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(13)61221-0)
58. Lepik K.J., Harrigan P.R., Yip B., Wang L., Robbins M.A., Zhang W.W., et al. Emergent drug resistance with integrase strand transfer inhibitor-based regimens. *AIDS.* 2017; 31(10): 1425–34. <https://doi.org/10.1097/qad.0000000000001494>
59. Claborn K.R., Meier E., Miller M.B., Leffingwell T.R. A systematic review of treatment fatigue among HIV-infected patients prescribed antiretroviral therapy. *Psychol. Health Med.* 2015; 20(3): 255–65. <https://doi.org/10.1080/13548506.2014.945601>
60. Overton E.T., Richmond G., Rizzardini G., Jaeger H., Orrell C., Nagimova F., et al. Long-acting cabotegravir and rilpivirine dosed every 2 months in adults with HIV-1 infection (ATLAS-2M), 48-week results: a randomised, multicentre, open-label, phase 3b, non-inferiority study. *Lancet.* 2021; 396(10267): 1994–2005. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)32666-0](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)32666-0)
61. Kirichenko A., Lapovok I., Baryshev P., van de Vijver D., van Kampen J.J.A., Boucher C.A.B., et al. Genetic features of HIV-1 integrase sub-subtype A6 predominant in Russia and predicted susceptibility to INSTIs. *Viruses.* 2020; 12(8): 838. <https://doi.org/10.3390/v12080838>
62. Marcelin A.G., Charpentier C., Jary A., Perrier M., Margot N., Callebaut C., et al. Frequency of capsid substitutions associated with GS-6207 in vitro resistance in HIV-1 from antiretroviral-naïve and -experienced patients. *J. Antimicrob. Chemother.* 2020; 75(6): 1588–90. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa060>
63. Grobler J.A., Huang Q., Hazuda D., Lai M. Efficacy of MK-8591M against diverse HIV-1 subtypes and NRTI-resistant clinical isolates. In: *International Congress of Drug Therapy in HIV Infection (HIV Glasgow)*. Glasgow; 2018.
64. Celum C., Baeten J.M. Tenofovir-based pre-exposure prophylaxis for HIV prevention: evolving evidence. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2012; 25(1): 51–7. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834ef5ef>
65. Grant R.M., Lama J.R., Anderson P.L., McMahan V., Liu A.Y., Vargas L., et al. Preexposure chemoprophylaxis for HIV prevention in men who have sex with men. *N. Engl. J. Med.* 2010; 363(27): 2587–99. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1011205>
66. Andrei G., Lisco A., Vanpouille C., Intorini A., Balestra E., van den Oord J., et al. Topical tenofovir, a microbicide effective against HIV, inhibits herpes simplex virus-2 replication. *Cell Host Microbe.* 2011; 10(4): 379–89. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.08.015>
67. Gibas K.M., van den Berg P., Powell V.E., Krakower D.S. Drug resistance during HIV pre-exposure prophylaxis. *Drugs.* 2019; 79(6): 609–19. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01108-x>

НАУЧНЫЙ ОБЗОР

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-117>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Проблемы специфической профилактики африканской чумы свиней

Власова Н.Н.¹, Верховский О.А.², Алипер Т.И.¹, Капустина О.В.¹, Алексеев К.П.¹, Южаков А.Г.¹, Гулюкин М.И.¹, Гулюкин А.М.¹

¹ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук», 109428, Москва, Россия;

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

В обзоре представлено современное состояние проблемы разработки и применения средств специфической профилактики африканской чумы свиней (АЧС) с кратким описанием её этиологии и патогенеза. Понимание уникальности природы вируса АЧС определило ряд ограничений и сложность решения проблемы создания вакцины, что стимулировало разработку высокоспецифичных методов диагностики для быстрого и точного выявления возбудителя болезни. В связи с этим приводятся результаты исследований, включая собственные, касающиеся сравнительного анализа генома вакцинных и вирулентных штаммов вируса АЧС, а также иммунодиагностических подходов для определения причин высокой вирулентности и низкой протективной активности этого вируса. Особое внимание уделено вопросу, связанному с разработкой безопасных и эффективных вакцин против АЧС. При этом подробно рассматриваются недостатки и возможные преимущества живых аттенуированных (ЖАВ) и рекомбинантных (РВ) вакцин. Приводятся результаты последних исследований по оценке иммуногенности генетически модифицированных вакцин (ГМВ), созданных в различных лабораториях мира. Полученные данные свидетельствуют о том, что вакцинопрофилактика АЧС в настоящее время является наиболее перспективной мерой борьбы с распространением этой болезни в нашей стране и мире, однако предыдущий опыт вакцинации против АЧС выявил ряд проблем её разработки и применения. Отмечен значительный вклад зарубежных исследователей в изучение основ вирулентности этого возбудителя и функций его генов. Возможное дальнейшее распространение АЧС в странах Европы и Азии на приграничных с Россией территориях, а также установленный факт распространения вируса АЧС среди диких кабанов свидетельствуют о постоянной угрозе его повторной интродукции в нашу страну. В заключение подчеркнута важность разработки безопасной вакцины против АЧС и анализа рисков создания искусственных источников возбудителя в природе в результате её применения.

Ключевые слова: африканская чума свиней; структура генома; структура вириона; генетически модифицированный вирус; протективная активность; антителозависимое усиление

Для цитирования: Власова Н.Н., Верховский О.А., Алипер Т.И., Капустина О.В., Алексеев К.П., Южаков А.Г., Гулюкин М.И., Гулюкин А.М. Проблемы специфической профилактики африканской чумы свиней. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(3): 206–216. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-117>

Для корреспонденции: Южаков Антон Геннадиевич, канд. биол. наук, заведующий лабораторией биохимии и молекулярной биологии ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук», 109428, Москва, Россия. E-mail: anton_oskol@mail.ru

Участие авторов: Власова Н.Н., Верховский О.А., Гулюкин А.М., Южаков А.Г. – сбор и обработка материалов; Власова Н.Н., Южаков А.Г., Капустина О.В., Алексеев К.П. – экспериментальные исследования; Власова Н.Н., Верховский О.А., Капустина О.В. – написание текста; Власова Н.Н., Алипер Т.И., Гулюкин А.М., Гулюкин М.И. – резюме, заключение, общая редакция.

Финансирование. Работа выполнена в рамках темы ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН № FGUG-2022-0009.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 24.04.2022

Принята в печать 02.06.2022

Опубликована 30.06.2022

REVIEW ARTICLE

https://doi.org/10.36233/0507-4088-117

Problems of specific prevention of African swine fever

Natalia N. Vlasova¹, Oleg A. Verkhovsky², Taras I. Aliper¹, Olga V. Kapustina¹,
Konstantin P. Alekseev¹, Anton G. Yuzhakov¹, Mikhail I. Gulukin¹, Aleksey M. Gulukin¹

¹Federal Scientific Center All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary named after the honorary K.I. Scriabin and Ya.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, 109428, Moscow, Russia;

²Diagnostic and Prevention Research Institute for Human and Animal Diseases, 123098, Moscow, Russia

This review presents the current state of the problem of development and application of the specific prevention of African swine fever (ASF) with a brief description of its etiology and pathogenesis. The unique nature of the ASF virus (ASFV) determines some limitations and the complexity of solving the problem of vaccine development. Such situation stimulated the development of highly specific diagnostic methods for rapid and accurate detection of the ASFV. In this regard, results of studies, including our own, concerning the comparative analysis of the genome of vaccine and virulent strains of the ASFV, as well as immunodiagnostic approaches to determine causes of high virulence and low protective activity of the ASFV, are briefly presented. Special attention is given to the issue related to the development of safe and effective vaccines against ASF. In this context disadvantages and possible advantages of live attenuated (LAV) and recombinant (RV) vaccines are considered in details. Results of recent studies on the assessment of the immunogenicity of genetically modified vaccines (GMV) which developed in various laboratories around the world are presented. The obtained data indicate that ASF vaccination is currently the most promising measure to stop the spread of this disease in our country and in the world, however, previous experience with ASF vaccination has revealed some problems in its development and application. The significant contribution of foreign researchers to the study of the basics of virulence of this pathogen and the study of its genes functions are noted. The possible further expansion of ASF in Europe and Asia in bordering Russia territories, as well as the established fact of the persistence of ASFV in wild boar population indicate a constant threat of its re-introduction into our country. In conclusion, the importance of developing a safe effective vaccine against ASF and the assessing of the possible risks of creating the artificial sources of the infection in nature as a result of its use is emphasized.

Keywords: *African swine fever; genome and virion structure; genetically modified virus; protective activity; antibody-dependent enhancement*

For citation: Vlasova N.N., Verkhovsky O.A., Aliper T.I., Kapustina O.V., Alekseev K.P., Yuzhakov A.G., Gulukin M.I., Gulukin A.M. Problems of specific prevention of African swine fever. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(3): 206–216. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-117>

For correspondence: Anton G. Yuzhakov, PhD, Head of the Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology of Federal Scientific Center All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary named after the honorary K.I. Scriabin and Y.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences, 109428, Moscow, Russia. E-mail: anton_oskol@mail.ru

Information about the authors:

Vlasova N.N., <https://orcid.org/0000-0001-8707-7710>

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

Kapustina O.V., <https://orcid.org/0000-0002-7382-8656>

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

Yuzhakov A.G., <https://orcid.org/0000-0002-9354-6824>

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

Gulyukin M.I., <https://orcid.org/0000-0002-7489-6175>

Gulyukin A.M., <https://orcid.org/0000-0003-2160-4770>

Contribution: Vlasova N.N., Verkhovsky O.A., Gulukin A.M., Yuzhakov A.G. – collection and processing of materials; Vlasova N.N., Yuzhakov A.G., Kapustina O.V. – experimental research; Vlasova N.N., Verkhovsky O.A., Kapustina O.V. – spelling text; Vlasova N.N., Aliper T.I., Gulukin A.M., Gulyukin M.I. – summary, conclusion, general edition.

Funding. The work was carried out within the scientific theme №FGUG-2022-0009.

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

Received 24 April 2022

Accepted 02 June 2022

Published 30 June 2022

Введение

Динамичность эволюционных процессов в вирусных популяциях, высокая степень изменчивости и способность возбудителей преодолевать защитные барьеры восприимчивого организма, интродук-

ция и распространение эмерджентных инфекций на новых территориях, антропогенное влияние на эпизоотическую ситуацию указывают на неизменную актуальность изучения вирусных инфекций животных и совершенствования средств их диагностики и специфической профилактики [1–3]. Вирус-

ная природа этиологического агента африканской чумы свиней (АЧС) была установлена в 1921 г. Р.Е. Montgomery в исследованиях АЧС, которую он характеризовал как «очень заразную болезнь», вызывающую практически 100% смертность заболевших животных и отличающуюся от классической чумы свиней [4]. Хотя первоначально вирус АЧС отнесен к *Iridoviridae* на основе морфологии вириона, повышение уровня знаний молекулярной биологии привело к его реклассификации в качестве единственного нового члена семейства ДНК-содержащих вирусов *Asfarviridae* [5]. Сегодня вирус АЧС отнесен к суперсемейству крупных нуклеоцитоплазматических вирусов (NCLDV), предположительно имеющих общего предка [6]. Для этого суперсемейства было предложено новое название – *Megavirales*, которое точнее отражает особенности структуры и репродукции его членов [6].

История изучения вируса африканской чумы свиней

На протяжении всей истории изучения АЧС исследователи сталкивались со значительными трудностями как при разработке классификации изолятов вируса АЧС, так и при создании средств специфической профилактики, что было обусловлено многообразием природных изолятов возбудителя, недостаточностью сведений о его геноме, сложностью структуры его вириона и незначительным количеством выживших после болезни животных.

Особо стоит отметить вклад российских учёных в исследование АЧС: впервые в нашей стране Я.Р. Коваленко с группой научных сотрудников Всесоюзного научно-исследовательского института экспериментальной ветеринарии (ВИЭВ) (М.А. Сидоров, Л.Г. Бурба и др.) в 1961–1965 гг. провели важные исследования по изучению АЧС в экспериментальных условиях, заложив основы методов исследования экзотических инфекционных болезней животных. Полученные данные позволили обобщить материалы по биологии вируса, его антигенным свойствам, устойчивости к различным физическим и химическим факторам, сохранению в окружающей среде, клиническому проявлению болезни и патологоанатомическим изменениям [7]. На основании разработок учёных ВИЭВ в 1965 г. была утверждена «Временная инструкция по профилактике и борьбе с африканской чумой свиней», в которой нашли своё отражение методы диагностики и борьбы с АЧС.

Дальнейшие исследования учёных Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной вирусологии и микробиологии (ГНУ ВНИИВВиМ Россельхозакадемии) в 1970–1980-е гг. (Н.И. Митин, Ю.И. Петров и др.) позволили разработать серологическую классификацию природных вирулентных или аттенуированных изолятов и штаммов вируса АЧС, а также первые отечественные вакцины на основе аттенуированных штаммов вируса [8–10]. В дальнейшем В.М. Балышевым и соавт. серологическая классификация была дополнена: на настоящий момент

изоляты вируса АЧС группируются в 9 самостоятельных сероиммунологических типов, а изоляты, серотиповая принадлежность которых не соответствует результатам иммунологической пробы, и новые нетипированные изоляты вируса включены в отдельную, десятую группу [11].

После длительной экспансии вируса АЧС на европейском континенте в 1957–1995 гг. были получены многочисленные данные о возбудителе болезни, патогенезе и иммунитете при АЧС. Однако эффективная и безопасная специфическая профилактика при АЧС до сих пор не разработана. Неудача первых попыток массовой вакцинации была связана с высокой изменчивостью возбудителя и отсутствием контроля и учета наличия векторов передачи – распространения вируса (дикие кабаны и клещи) в полевых условиях, так как после вакцинации животные подвергались множественной реинфекции [12, 13].

Исследования структуры генома и антигенных свойств вируса африканской чумы свиней

Изучение различных изолятов вируса АЧС показало, что компоненты популяции его природных изолятов гетерогенны не только по вирулентным свойствам и способности к репродукции в гетерологических системах [14], но и по серотиповой принадлежности отдельных вариантов [15]. Поскольку при АЧС иммунитет серотипоспецифичен, наличие более 9 серотипов вируса АЧС сильно усложняет задачу разработки вакцины.

При создании вакцины против АЧС определение серотипа циркулирующего вируса является первоочередной задачей для разработки средств специфической профилактики. К сожалению, для определения серотипа *in vitro* вновь выделенного изолята необходима гипериммунная специфическая сыворотка, которую не всегда удается получить даже при использовании фосфонуксусной кислоты, обладающей вирусстатическим действием [16].

Следует подчеркнуть, что вирус АЧС имеет сложную многослойную структуру (**рисунок**) [17]. Его внутриклеточные вирионы имеют электронно-плотный нуклеоид – нуклеопротеиновый кор (диаметр 70–100 нм), покрытый двумя слоями: внутренний – липидный слой, средний – капсид, состоящий из 1892–2172 капсомеров. Капсид имеет икосаэдрическую форму (диаметр 172–191 нм, $T = 189–217$). Внеклеточные вирионы в своей структуре имеют третий липидсодержащий внешний слой (диаметр 175–215 нм) [18]. Такая сложность строения вириона обуславливает высокую устойчивость вируса к факторам как внешней среды, так и иммунной защиты.

Интенсивные исследования структуры генома и антигенных свойств вируса АЧС подтвердили предположение о том, что в его популяциях присутствуют иммунологически и генетически различные варианты [15, 19]. Всего геном вируса АЧС кодирует более 160 различных белков [20], а в состав вириона входит более 50 структурных белков. Их молекулярные массы варьируют от 10 до 150 кДа [21], по функ-

циональным характеристикам они подразделяются на 5 основных групп: белки прикрепления и проникновения; белки, участвующие в морфогенезе вируса; структурные белки; белки, обеспечивающие тропизм и вирулентность вируса; а также регуляторные белки, отвечающие за ингибицию апоптоза, синтеза клеточных белков. К ним относятся ингибиторы гуморального ответа; белки, воздействующие на синтез интерферона; активаторы цитокинов и ингибиторы хемокинов; модуляторы функций основного комплекса гистосовместимости; а также модуляторы цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ, CD8⁺ Т-клетки) и натуральных киллеров (NK-клеток) [22].

Следовательно, белки вируса АЧС играют значительную роль в модуляции иммунного ответа организма-хозяина, что также является одним из факторов, препятствующих созданию вакцины против АЧС. Регуляторные белки вируса АЧС активно подавляют синтез интерферона-β, интерлейкина-8 и усиливают выработку противовоспалительных цитокинов и трансформирующего фактора роста [23]. Разрушение макрофагов вызывает высвобождение цитокинов и фактора некроза опухолей (TNF-α), индуцирующих апоптоз сначала Т-клеток, а потом и В-клеток, что также приводит к угнетению клеточной и гуморальной ветвей иммунного ответа [24]. Помимо индукции апоптоза, TNF-α увеличивает проницаемость сосудов, повышает коагуляцию, способствует образованию тромбов [25].

Вирус АЧС не только подавляет иммунный ответ хозяина, но также модифицирует репликацию в клетках хозяина. Экспрессия гена *J4R* на поздних стадиях инфекционного цикла приводит к образованию продукта, локализованного в ядре и цитоплазме инфицированных клеток, который связывается с комплексом α-цепи созревающего белка, образующего полипептид-ассоциированный комплекс (Nascent Polypeptide Associated Complex, NAC) вблизи клеточной мембраны и в цитоплазме. Предположительно, этот вирусный белок ингибирует транскрипцию генов клетки хозяина [26].

Две переменные области генома вируса АЧС на 3'- и 5'-конце молекулы содержат мультигенные семейства (MGF), которые участвуют в регуляции экспрессии генов и отличаются по количеству tandemных повторов. L. Zsak и соавт. (2001) показали, что члены MGF 360 и 530 играют важную роль в регуляции тропизма вируса и необходимы для его эффективной репликации в макрофагах [27]. Мутанты вируса с делецией нескольких генов MGF 360 и 530 вызвали раннюю гибель инфицированных макрофагов, что указывает на роль кодируемых вирусом белков в регуляции апоптоза и, соответственно, выживании клеток [27].

Сложноорганизованные вирусы, например вирус простого герпеса, вирус АЧС или вирус осповакцины, имеют гены, не только отвечающие за их репликацию, но и позволяющие ускользать от воздействия факторов иммунологического надзора организма-хозяина [23]. И, наконец, вирус АЧС содержит несколько генов, которые кодируют белки, имеющие гомологию с белками хозяина, что обеспечивает ему своеобразную ми-

микрию в отношении иммунного распознавания [28].

Следовательно, функциональные особенности возбудителя АЧС позволяют ему не только эффективно репродуцироваться в клетках организма свиней, но и в значительной степени перестраивать их функционирование, подавлять синтез протективных антител и снижать активность Т-клеток. Тем не менее, по данным D.L. Rock, создание вакцины против АЧС возможно, поскольку доказано существование протективного иммунитета к гомологичному вирусу, несмотря на то что трудно достичь высокого уровня антител, необходимых для защиты животных при АЧС, причем уровень антител коррелирует со степенью защищенности организма от инфекции [29].

Проблемы создания вакцины против африканской чумы свиней

Современная панзоотия АЧС стимулировала проведение активных научных изысканий в направлении создания эффективной и безопасной вакцины против АЧС, поскольку стратегия стемпинг аут не показывает положительных результатов в сдерживании распространения этой болезни. Многие лаборатории мира

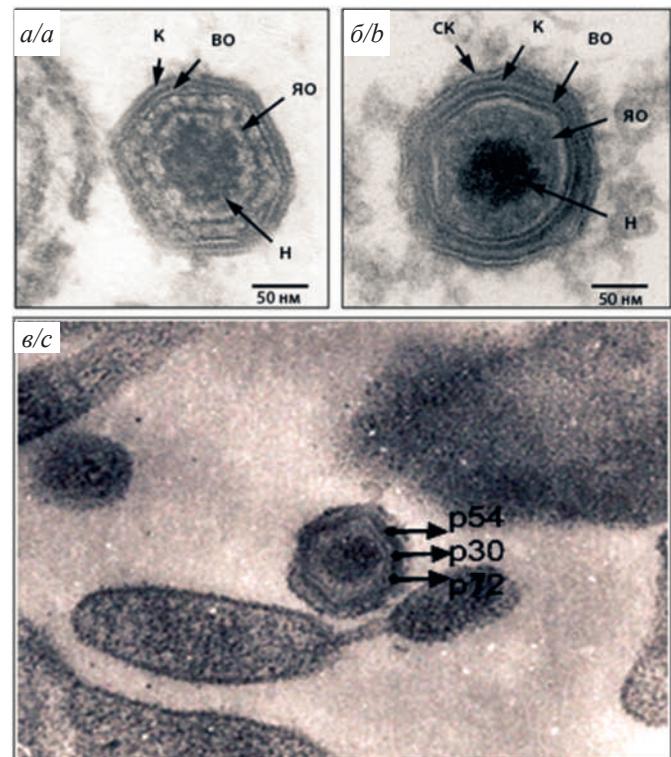


Рис. Структура вириона вируса АЧС: *a* – сформированный внутриклеточный вирион; *б* – зрелый внеклеточный вирион; *в* – локализация структурных протеинов в вирионе [17].

СК – суперкапсид; К – капсид; ВО – внутренняя липидная оболочка; YO (КО) – ядерная или коровая оболочка; Н – нуклеоид [18].

Fig. The structure of the ASF virus virion: *a* – formed intracellular virion; *b* – mature extracellular virion; *c* – localization of structural proteins in the virion [17].

CK – viral envelope; K – capsid; BO – inner lipid envelope; YO (KO) – nuclear or core envelope; H – nucleoid [18].

работают над созданием вакцины по нескольким перспективным направлениям: живые аттенуированные вакцины (ЖАВ), генетически модифицированные вакцины (ГМВ) или маркированные вакцины (МВ), субъединичные вакцины (СВ), а также ДНК-вакцины.

Инактивированные вакцины

Относительно применения инактивированных вакцин (ИВ) при АЧС проведённые исследования однозначно доказали, что инактивированный вирус не стимулирует выработку эффективной защиты [30]. Данный феномен объясняется уникальностью вируса АЧС, которая при инфицировании свиней проявляется в отсутствии синтеза вируснейтрализующих антител (ВНА), обусловленного многослойностью структуры вириона: лишённый суперкапсидной оболочки вирус АЧС сохраняет свою инфекционность, поскольку использует для своего проникновения в чувствительные клетки два различных механизма: рецептор-опосредованный эндоцитоз [17] и макропиноцитоз [31]. Как следствие, при взаимодействии вируса со специфическими антителами нейтрализации его инфекционной активности не происходит.

В более ранних исследованиях вируснейтрализующих антител были получены весьма неоднозначные данные: некоторые учёные предоставили доказательства пассивной защиты при введении антител от выживших свиней. Так, M. V. Vorca и соавт. (1994), D. Onisk и соавт. (1994) показали, что полная или частичная защита может быть достигнута пассивным переносом антител реконвалесцентов. При этом в ряде случаев наличие специфических антител снижало уровень виремии и увеличивало длительность инкубационного периода заболевания [32, 33]. По данным J. M. Escribano и соавт. (2013), индукция специфических антител обеспечивает различные степени защиты, поскольку антитела при АЧС могут индуцировать защиту, кроме вируснейтрализации, с использованием других механизмов, таких как комплемент-зависимый лизис, опсонияция и фагоцитоз, антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность [34]. Однако другие исследователи продемонстрировали результаты экспериментов, достоверно демонстрирующие отсутствие защиты от АЧС при пассивном переносе антител [35]. Кроме того, установлено, что вырабатываемые к некоторым белкам вируса АЧС антитела не только не обладают вируснейтрализующими свойствами и не обеспечивают защиты от болезни, но и нередко приводят к усилению инфекции и ускорению сроков гибели заражённых животных. Этот феномен антителозависимого усиления инфекции детально изучен для других вирусов, размножающихся в клетках иммунной системы [36, 37]. А. С. Першин и соавт. установили, что введение животным иммуноглобулинов от переболевших АЧС свиней на 1–2 дня ускоряет у них сроки развития болезни и наступления гибели [38].

Многочисленными усилиями исследователей определены основные причины отсутствия эффективных вакцин против АЧС: высокая скорость изменчивости

вируса АЧС (скорость замен в нуклеотидных последовательностях геномов вируса АЧС были намного выше, чем ожидалось, по сравнению с другими крупными двухцепочечными вирусами: скорость замен вируса АЧС варьировала от 1024 до 1025 и была сопоставима с РНК-содержащими вирусами, которые обычно имеют от 1022 до 1025 замен/позиция/год [39]); серотипоспецифичный иммунитет (все известные изоляты и штаммы вируса АЧС делятся на 9 серотипов); генетическая и серотиповая гетерогенность состава популяций некоторых изолятов; отсутствие нейтрализации вируса специфическими антителами и наличие антителозависимого усиления при АЧС.

Субъединичные вакцины

Детальное изучение иммунного ответа при АЧС с использованием рекомбинантных белков, проведённое P. Gómez-Puertas и соавт. (1998), позволило установить, что антитела к таким белкам вируса АЧС, как р30 и р54, необходимы для выработки протективного иммунитета [40], а дополнительное введение антител к р72 нарушает его. Кроме того, после иммунизации рекомбинантным р72 также отмечаются более ранние сроки гибели инфицированных вирусом АЧС животных (на 1,5–2 суток) и усиление выраженности клинических признаков по сравнению с контрольными. Эти работы послужили основой для создания субъединичных вакцин против АЧС, поскольку при разработке эффективной и безопасной вакцины следует учитывать наличие феномена антителозависимого усиления и скомпоновать высокоиммуногенный препарат, способный сформировать перевес в динамике антителообразования в пользу протективных антигенов, чтобы избежать усиления инфекции и маскирования вируса антителами к непротективным белкам. Тем не менее на текущий момент создание субъединичных вакцин сильно тормозит то обстоятельство, что ключевые антигены вируса АЧС, участвующие в индукции иммунитета, опосредованного Т-клетками, ещё не определены, существует лишь ограниченное количество протестированных белков:

– иммунизация свиней рекомбинантными р30 и р54 задерживала сроки наступления болезни и виремии, хотя 50% свиней выжили более 45 дней [40];

– как упоминалось ранее, иммунизация рекомбинантными белками р54, р30 и р72 сдерживала начало лихорадки, но не изменяла время наступления гибели [41].

Наравне с р30 и р 54 иммунизация CD2v также приводила к созданию частичной защиты от заражения вирулентным штаммом. Недавние исследования предоставили доказательства того, что белки CD2v и (или) С-типа лектина являются важными для защиты от гомологичной инфекции вируса АЧС [42]: при иммунизации рекомбинантным белком CD2v три свиньи были полностью защищены, у одной не регистрировалась виремия, у двух она снижена в 10–100 раз. В настоящее время группа учёных под руководством Л. К. Dixon активно занимается поисками протективных белков вируса АЧС. Так, L. С. Goatley и соавт. (2020) описали индукцию АЧС-специфических анти-

тел в ответ на иммунизацию различными пулами рекомбинантных белков. Авторам удалось найти композицию из 8 белков, которая обеспечила 100% защиту животных от контрольного заражения вирулентным штаммом вируса АЧС [43]. Однако получены лишь предварительные результаты об основных защитных белках вируса АЧС как возможных компонентах разрабатываемой субъединичной вакцины.

Живые аттенуированные вакцины

На текущий момент одним из перспективных направлений считается создание живых аттенуированных вакцин. Проведённые в различных научных лабораториях исследования по разработке специфических средств профилактики при АЧС показали, что иммунизация аттенуированным вирусом АЧС защищает от заражения близкородственными вирулентными изолятами, т.е. вирулентными изолятами соответствующего серотипа [13, 30, 44]. Анализ иммунного ответа при использовании аттенуированного варианта АЧС помог установить наличие протективного ответа при заражении гомологичным вирулентным вирусом [45]. Установлено, что вакцинация свиней естественно ослабленным штаммом OURT 88/3 защищает их от заражения гомологичными вирулентными штаммами вируса АЧС [45], хотя была показана и частичная перекрестная защита для гетерологичных штаммов вируса. Уровень защиты животных варьировал от 66 до 100% в зависимости от массы тела и возраста свиней, дозы вируса, использованного для контрольного заражения, и пути его введения. В то же время свиньи, иммунизированные против одного серотипа вируса, при заражении вирулентным вирусом другого серотипа гибнут с тяжелейшими клинико-патологическими проявлениями АЧС, хотя у 10–30% иммунизированных особей наблюдается перекрестная защита против гетерологичного вируса АЧС [10].

Анализ данных по развитию устойчивости к АЧС, проведённый специалистами разных стран, позволил сделать вывод, что основным звеном в формировании протективного иммунного ответа у свиней является клеточный иммунитет, опосредованный ЦТЛ, которые прерывают репродукцию вируса в инфицированных клетках [46]. Неудивительно, что репликация вируса АЧС в первую очередь нарушает работу именно этого звена иммунного ответа. При иммунизации животных вакцинами из аттенуированных штаммов специфические антитела и активированные ЦТЛ играют значительную роль в формировании защиты. С. Оуга и соавт. (2004) продемонстрировали, что истощение ЦТЛ снижает или полностью нарушает защиту, сформированную при иммунизации аттенуированным штаммом OURT 88/3 [47]. Вместе с тем интенсивные исследования последних лет показали, что наличие специфических антител и активированных ЦТЛ – далеко не единственное условие устойчивости животных к контрольному заражению. Ранний апоптоз инфицированных клеток также нарушает репродукцию вируса АЧС, поэтому необходимо блокировать работу вирусных ингибиторов. После иммуни-

зации свиней аттенуированным вирусом перекрестная защита при заражении вирулентными изолятами разных генотипов коррелировала с его способностью эффективно стимулировать выработку интерферона- γ лимфоцитами иммунизированных животных [48].

Однако применение аттенуированных вакцин нередко вызывает ряд побочных эффектов: у 2–30% вакцинированных свиней проявлялись осложнения после вакцинации, включая перемежающуюся лихорадку и виремию, риниты, пневмонию, локомоторные нарушения, некротические очаги, аборт и даже гибель подопытных животных. Следовательно, до настоящего момента остаются нерешёнными три основных вопроса, связанных с потенциалом разработки живых аттенуированных штаммов – кандидатов на вакцину против АЧС:

- 1) не изучен потенциал устойчивости животных и передачи вируса в полевых условиях;
- 2) проблемы безопасности: у ослабленных животных наблюдаются такие побочные реакции, как перемежающаяся лихорадка, кардиореспираторные нарушения, геморрагические поражения кожи и скелетно-мышечные поражения;
- 3) живые аттенуированные вакцины обеспечивают самое быстрое достижение результата, но для оценки безопасности их использования в полевых условиях потребуется несколько лет.

Генетически модифицированные вакцины

Дальнейшие исследования применения средств специфической профилактики при АЧС показали наличие иммуносупрессии моноцит-макрофагальной системы, значительно осложняющей эту задачу [49]. Идентификация генов, ответственных за репродукцию вируса в определённых культурах клеток, в клещах и свиньях позволяет направленно вносить изменения в данные гены и получать созданные на основе использования генно-инженерных манипуляций аттенуированные штаммы, лишённые недостатков природно- и лабораторно-ослабленных штаммов.

Исходя из этих целей, современные разработки вакцин против АЧС направлены на создание живых ГМВ с помощью целенаправленной делеции генов. Этот подход обеспечивает возможность дифференциации вакцинированных животных от инфицированных (Differentiating Infected from Vaccinated Animals, DIVA-стратегия). Вакцинация генетически модифицированным вирусом АЧС, полученным путём инактивации определённых генов, ответственных за вирулентность или иммуносупрессию, значительно повышает безопасность вакцин: ГМВ АЧС с делециями в генах тимидинкиназы, *9GL (B119L)*, *DP71L* в MGF 360/505 индуцировали протективный иммунный ответ к заражению гомологичным вирулентным изолятом [50, 51]. В 2020 г. M.V. Ворса и соавт. опубликовали данные о том, что делеции гена *I177L (ASFV-G- Δ I177L)* приводили к полной утрате вирулентности исходного варианта вируса. В результате при экспериментальном заражении исходным вирулентным вирусом Georgia 2007/01 выжили

все 20 животных, вакцинированных ГМВ АЧС [52]. Однако, несмотря на видимый успех такого подхода, до сих пор нет информации о стабильности вакцинного вируса, об отсутствии возможности его реверсии к вирулентному типу, о длительности иммунитета и многих других важных параметрах. Авторы данного исследования имеют патенты 2016–2017 гг. на другие варианты ГМВ АЧС, также предотвращающих гибель животных при контрольном заражении: ГМВ АЧС на основе делеции генов MGF, полученная путём удаления из исходного изолята Georgia 2007/01 генов MGF 360: 12L, 13 и 14L; MGF505: 1R, 2R и 3R, отвечающих за вирулентность; ГМВ АЧС Δ9GL-UK, полученная на основе изолята Georgia 2007/01 за счёт делеции связанных с вирулентностью генов 9GL (B119L) и UK (DP96R) и защищающая от заражения изолятом Georgia 2007/01; ГМВ АЧС ASFV-G, созданная на основе изолята Georgia 2007/01 за счёт делеции фрагмента гена 9GL (B119L) и обеспечивающая защиту от заражения гомологичным изолятом Georgia 2007/01.

Однако в некоторых случаях иммунизация делеционными мутантными вирусами не создаёт защитного эффекта. Так, животные, иммунизированные ГМВ АЧС с удалёнными генами из MGF 360 и 505 и геном 9GL вируса Georgia 2007/1, не приобрели устойчивости к заражению исходным вирусом [53]. Введение модифицированного вируса, полученного путём удаления гена 9GL из генома вирулентного изолята Georgia 2007/1, не создавало защитного эффекта при контрольном заражении исходным штаммом. Опыт с удалением двух генов 9GL и UK продемонстрировал увеличение защитного эффекта по сравнению с удалением только гена 9GL [53].

ДНК-вакцины

США не является единственной страной, пытающейся разработать эффективный препарат для вакцинопрофилактики АЧС. Работа в указанном направлении ведётся в КНР (Zhejiang Nailong Biotechnology Co., Ltd), Испании (UCM – референтная лаборатория OIE), в России (ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ). В Испании разработана экспериментальная вакцина из негемадсорбирующего (свойство напрямую зависит от вирулентности) изолята вируса АЧС 2-го генотипа Lv17/WB/Rie1, выделенного на территории Латвии в 2017 г. от дикого кабана. В геноме данного изолята имеется мутантный ген, кодирующий укороченную версию CD2v-подобного белка, отвечающего за гемадсорбирующие свойства вируса. При оральной иммунизации диких кабанов экспериментальная вакцина обеспечила 92% защиту от заражения вирулентным изолятом вируса АЧС Argm07 (погиб 1 кабан из 12). Авторами проводятся дополнительные исследования по изучению устойчивости, реверсibility и биологических свойств данного изолята [54]. Недавнее изучение CD2v-делеционного мутанта вирулентного изолята вируса АЧС BA71 продемонстрировало возможность выработки протективного иммунитета к за-

ражению как гомологичным, так и гетерологичным вирусом АЧС [55].

Более ранние подходы к разработке защитных средств от АЧС на основе использования ДНК-вакцин также показали неоднозначные результаты. Так, при иммунизации пулами ДНК, кодирующими белки вируса АЧС, достигалась защита на 30–50% (J.M. Argilaguet и соавт. (2012)). Иммунизация плазидами с генами CD2v, p30, p54, слитыми с геном убиквитина, вызывала сильный ЦТЛ-ответ и создавала частичную защиту при отсутствии продукции специфических антител [56]. Установлено, что вакцины на основе ДНК и аттенуированных вирусов индуцируют клеточный и гуморальный специфический иммунный ответ к вирусу АЧС, хотя на сегодняшний день они приводят лишь к частичной защите от заражения [56]. S. Lokhandwala и соавт. (2016) получили устойчивый клеточный и гуморальный иммунный ответ при иммунизации рекомбинантным аденовирусом, продуцирующим определённые белки вируса АЧС, и повторной иммунизации рекомбинантным модифицированным вирусом Анкара (MVA), несущим те же самые гены вируса АЧС. Однако эти эксперименты не были завершены проведением контрольного заражения иммунизированных животных, что не позволило установить положительного результата иммунизации [57].

Возможность выработки протективного иммунитета при АЧС была подтверждена исследованиями по ДНК-иммунизации, демонстрирующими корреляцию между формированием защиты против летального заражения вирусом АЧС и обнаружением большого количества индуцированных ДНК-вакциной антиген-специфических ЦТЛ [58]. Как видно из представленных материалов, все перечисленные варианты вакцин являются экспериментальными образцами, до внедрения которых в сельскохозяйственную практику необходимо дальнейшее изучение этой проблемы.

Таким образом, отсутствие на настоящий момент эффективной и безопасной вакцины против АЧС вызвано не только особенностью структуры вируса АЧС, наличием большого количества белков с функцией подавления иммунного ответа макроорганизма, а также высокой скоростью его изменчивости, но и необходимостью отработки методов исследования и модификации возбудителя, разработки процессов культивирования вакцинного варианта, длительностью отработки оптимальных условий получения вирусосодержащего материала или рекомбинантных антигенов. После получения прототипа вакцины предстоит решение вопросов по организации промышленного производства препарата, оценки его безопасности, разработки подходов к его применению, направленных на предотвращение распространения вируса АЧС. Поскольку современные стандарты OIE требуют применения вакцин, позволяющих дифференцировать вакцинированных и переболевших животных в рамках осуществления DIVA-стратегии, необходимы разработка и валидация сопутствующих

тест-систем, позволяющих дифференцировать вакцинированных и естественно инфицированных или переболевших животных.

Заключение

В завершение обзора следует отметить, что АЧС не единственная инфекция, при которой вакцина не гарантирует эффективной защиты от болезни из-за особенностей возбудителя и его воздействия на иммунную систему: репродуктивно-респираторный синдром свиней, хламидиоз, лейкоз и некоторые другие болезни вирусной или бактериальной этиологии не всегда удаётся победить только с помощью вакцинации [59].

Поэтому создание эффективной и безопасной вакцины против АЧС – это длительный процесс, требующий тесного взаимодействия учёных-исследователей, ветеринарных специалистов и государственных и межгосударственных структур, обеспечивающих как получение разрешения на испытание и использование вакцины, так и повышение уровня биозащиты свиноводческих хозяйств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Mebus C. African swine fever. *Adv. Virus Res.* 1988; 35: 251–69.
2. Dixon L.K., Abrams C.C., Chapman D.G., Zhang F. African swine fever virus. In: Mettenleiter T.C., Sobrino F., eds. *Animal Viruses: Molecular Biology*. Norfolk: Caister Academic Press; 2008: 457–521.
3. Sanchez-Vizcaino J.M., Martinez-Lopez B., Martinez-Aviles M., Martins C., Boinas F., Vial L., et al. Scientific review on African swine fever. *EFSA Supporting Publications*. 2009; 6(8): 5E.
4. Montgomery R.E. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). *J. Comp. Pathol.* 1921; 34: 159–91.
5. Dixon L.K., Costa J.V., Escribano J.M., Rock D.L., Vinuela E., Wilkinson P.J. Family Asfarviridae. In: Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carestens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., eds. *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Summers Academic Press; 2000: 159–65.
6. Colson P., De Lamballerie X., Yutin N., Asgari S., Bigot Y., Bideshi D.K., et al. “Megavirales”, a proposed new order for eukaryotic nucleocytoplasmic large DNA viruses. *Arch. Virol.* 2013; 158(12): 2517–21. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1768-6>
7. Гулюкин М.И. 120 лет Всероссийскому научно-исследовательскому институту экспериментальной ветеринарии имени Я.Р. Коваленко. *Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко*. 2018; 80(1): 12–36. <https://doi.org/10.30917/ATT-PRINT-2018-1>
8. Митин Н.И., Балышев В.М., Федорищев И.В., Шевченко А.А., Петров Ю.И. Схема классификации вируса АЧС. В кн.: *Материалы научной конференции ВНИИВВиМ. Том 1*. Покров; 1986: 69–73.
9. Вишняков И.Ф., Митин Н.И., Петров Ю.И., Черятников Л.Л., Киселев А.В., Бурлаков В.А. и др. Сероиммунологическая классификация природных изолятов вируса африканской чумы свиней. В кн.: *Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии: материалы научно-практической конференции «Классическая чума свиней – неотложные проблемы науки и практики»*. Покров; 1995: 141–3.
10. Бурлаков В.А. *Иммунологические свойства вируса и проблемы разработки средств специфической профилактики АЧС*: Автореф. дисс. д-ра вет. наук. Покров; 1979.
11. Балышев В.М., Книзе А.В., Цыбанов С.Ж. География АЧС и серотиповая гетерогенность возбудителя болезни. В кн.: *Материалы конференции Московской ветеринарной академии*. М.; 1999: 92–4.
12. Manso-Ribeiro J., Nunes-Petisca J.L., Lopez-Fraza F., Sobral M. Vaccination against ASF. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 1963; 60: 921–37.
13. Boinas F., Hutchings G., Dixon L., Wilkinson P. Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal. *J. General Virol.* 2004; 85(Pt. 8): 2177–87. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80058-0>
14. Моргунов Ю.П., Петров Ю.И. Изучение иммунологических свойств вируса АЧС 5 типа: выделение, идентификация и типирование референтного штамма. *Проблемы биологии продуктивных животных*. 2010; (4): 104–11.
15. Балышев В.М., Лагуткин Н.А., Салина М.В., Зубаиров М.М., Федорищев И.В., Карпов Г.М. Экспресс-метод получения типоспецифических референс-сывороток при АЧС. В кн.: *Материалы Международной научно-практической конференции «Диагностика, профилактика и меры борьбы с особо опасными и экзотическими болезнями животных»*. Покров; 1998: 64–5.
16. Carrascosa J.L., Carazo J.M., Carrascosa A.L., Garcia N., Santisteban A., Vinuela E., et al. General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles. *Virology*. 1984; 132(1): 160–72.
17. Salas M.L., Andrés M.G. African swine fever virus morphogenesis. *Virus Res.* 2012; 173(1): 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.09.016>
18. Dixon L.K., Baylis S.A., Vydelingum S., Twigg S.R., Hammond J.M., Hingamp P.M., et al. African swine fever virus genome content and variability. *Arch. Virol. Suppl.* 1993; 7: 185–99. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9300-6_15
19. Dixon L.K., Chapman D.A., Netherton C.L., Upton C. African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res.* 2013; 173: 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.020>
20. Yáñez R.J., Rodríguez J.M., Nogal M.L., Yuste L., Enriquez C., Rodríguez J.F., et al. Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. *Virology*. 1995; 208(1): 249–78. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1149>
21. Gonzalez A., Talavera A., Almendral J.M., Viñuela E. Hairpin loop structure of African swine fever virus DNA. *Nucleic Acids Res.* 1986; 14(17): 6835–44. <https://doi.org/10.1093/nar/14.17.6835>
22. Vlasova N.N., Vlasova A.N. African Swine Fever Virus pathogenesis and vaccine development: challenges and possible approaches. Charter I. In: *Fever: Types, Treatments and Health Risks*. New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2013: 3–26.
23. Dixon L.K., Abrams C.C., Bowick G., Goatley L.C., Kay-Jackson P.C., Chapman D., et al. African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004; 100(3–4): 117–34. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.04.002>
24. Dixon L.K., Abrams C.C., Chapman D.G., Zhang F. African swine fever virus. In: Sobrino T.C.M.F., ed. *Animal Viruses Molecular Biology*. Norwich: Caister Academic Press; 2008: 457–521.
25. Gomez-Villamandos J.C., Bautista M.J., Carrasco L., Chacon-Manrique de Lara F., Hervás J., Wilkinson P.J., et al. Thrombocytopenia associated with apoptotic megakaryocytes in a viral haemorrhagic syndrome induced by a moderately virulent strain of African swine fever virus. *J. Comp. Pathol.* 1998; 118(1): 1–13. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(98\)80023-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(98)80023-6)
26. Goatley L.C., Twigg S.R., Miskin J.E., Monaghan P., St-Arnaud R., Smith G.L., et al. The African swine fever virus protein p72 binds to the alpha chain of nascent polypeptide-associated complex. *J. Virol.* 2002; 76(19): 9991–9. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.19.9991-9999.2002>
27. Zsak L., Lu Z., Burrage T.G., Neilan J.G., Kutish G.F., Moore D.M., et al. African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes are novel macrophage host range determinants. *J. Virol.* 2001; 75(7): 3066–76. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.7.3066-3076.2001>
28. Tulman E.R., Rock D.L. Novel virulence and host range genes of African swine fever virus. *Curr. Opin. Microbiol.* 2001; 4(4): 456–61. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00235-6](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00235-6)
29. Rock D.L. Challenges for African swine fever vaccine development – “...perhaps the end of the beginning.” *Vet. Microbiol.* 2017; 206: 52–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.10.003>
30. Blome S., Gabriel C., Beer M. Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation. *Vaccine*. 2014; 32(31): 3879–82. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.05.051>
31. Alonso C., Galindo I., Cuesta-Geijo M.A., Cabezas M., Hernaiz B., Munoz-Moreno R. African swine fever virus-cell interactions: From virus entry to cell survival. *Virus Res.* 2013; 173(1): 42–57. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.006>
32. Borca M.V., Irusta P., Carrillo C., Afonso C.L., Burrage T., Rock D.L. African swine fever virus structural protein p72 contains

- a conformational neutralizing epitope. *Virology*. 1994; 201(2): 413–8. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1311>
33. Onisk D., Borca M., Kutish S., Kramer E., Irusta P., Rock D.L. Passively transferred African swine fever virus antibodies protect swine against lethal infection. *Virology*. 1994; 198(1): 350–4. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1040>
 34. Escribano J.M., Galindo I., Alonso C. Antibody-mediated neutralization of African swine fever virus: Myths and facts. *Virus Res*. 2013; 173(1): 101–9. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.012>
 35. Ruiz-Gonzalvo F., Carnero M.E., Caballero C., Martínez J. Inhibition of African swine fever infection in the presence of immune sera in vivo and in vitro. *Am. J. Vet. Res*. 1986; 47(6): 1249–52.
 36. Halstead S.B., Chow J., Marchette N.J. Immunologic enhancement of Dengue virus replication. *Nat. New Biol*. 1973; 243(122): 24–6.
 37. Tirado S.M., Yoon K.J. Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease. *Viral Immunol*. 2003; 16(1): 69–86. <https://doi.org/10.1089/088282403763635465>
 38. Першин А.С., Ремыга С.Г., Шевченко И.В., Жуков И.Ю., Шевцов А.А., Ерофеев С.Г. и др. Влияние пассивной иммунизации на клинические и патологоанатомические изменения у свиней, зараженных изолятом Мартинс-Крым 01/16 вируса АЧС. *Ветеринария*. 2018; (1): 25–31. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2018.21.1.25-31>
 39. Hanada K., Suzuki Y., Gojobori T. A large variation in the rates of synonymous substitution for RNA viruses and its relationship to a diversity of viral infection and transmission modes. *Mol. Biol. Evol*. 2004; 21(6): 1074–80. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh109>
 40. Gómez-Puertas P., Rodríguez F., Oviedo J.M., Brun A., Alonso C., Escribano J.M. The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. *Virology*. 1998; 243(2): 461–71. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9068>
 41. Neilan J.G., Zsak L., Lu Z., Burrage T.G., Kutish G.F., Rock D.L. Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology*. 2004; 319(2): 337–42. <https://doi.org/10.1016/j.viro.2003.11.011>
 42. Ruiz-Gonzalvo F., Rodriguez F., Escribano J. Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus. *Virology*. 1996; 218(1): 285–9. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0193>
 43. Goatley L.C., Reis A.L., Portugal R., Goldswain H., Shimmon G.L., Hargreaves Z., et al. A pool of eight virally vectored African swine fever antigens protect pigs against fatal disease. *Vaccines (Basel)*. 2020; 8(2): 234. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020234>
 44. Leitão A., Cartaxeiro C., Coelho R., Cruz B., Parkhouse R.M.E., Portugal F.C., et al. The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response. *J. Gen. Virol*. 2001; 82(Pt. 3): 513–23. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-3-513>
 45. Mulumba-Mfumu L.K., Goatley L.C., Saegerman C., Takamatsu H.H., Dixon L.K. Immunization of African indigenous pigs with attenuated genotype I African swine fever virus OURT88/3 induces protection against challenge with virulent strains of genotype I. *Transbound. Emerg. Dis*. 2016; 63(5): e323–7. <https://doi.org/10.1111/tbed.12303>
 46. Takamatsu H.H., Denyer M.S., Lacasta A., Stirling C.M., Argilagué J.M., Netherton C.L., et al. Cellular immunity in ASFV responses. *Virus Res*. 2013; 173(1): 110–21. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.11.009>
 47. Oura C.A.L., Denyer M.S., Takamatsu H., Parkhouse R.M.E. In vivo depletion of CD8⁺ T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus. *J. Gen. Virol*. 2005; 86(Pt. 9): 2445–50. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81038-0>
 48. Arias M., de la Torre A., Dixon L., Gallardo C., Jori F., Laddomada A., et al. Approaches and perspectives for development of African swine fever virus vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2017; 5(4): 35. <https://doi.org/10.3390/vaccines5040035>
 49. Gallardo C., Soler A., Nieto R., Cano C., Pelayo V., Sánchez M.A., et al. Experimental infection of domestic pigs with African swine fever virus Lithuania 2014 genotype II field isolate. *Transbound. Emerg. Dis*. 2017; 64(1): 300–4. <https://doi.org/10.1111/tbed.12346>
 50. Sanford B., Holinka L., O'Donnell V., Krug P., Carlson J., Alfano M., et al. Deletion of the thymidine kinase gene induces complete attenuation of the Georgia isolate of African swine fever virus. *Virus Res*. 2016; 213: 165–71. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.12.002>
 51. Reis A.L., Abrams C.C., Goatley L.C., Netherton C., Chapman D.G., Sanchez-Cordon P., et al. Deletion of African swine fever virus interferon inhibitors from the genome of a virulent isolate reduces virulence in domestic pigs and induces a protective response. *Vaccine*. 2016; 34(39): 4698–705. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.08.011>
 52. Borca M.V., Ramirez-Medina E., Silva E., Vuono E., Rai A., Pruitt S., et al. Development of a highly effective African Swine Fever virus vaccine by deletion of the I177L gene results in sterile immunity against the current epidemic Eurasia strain. *J. Virol*. 2020; 94(7): e02017-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.02017-19>
 53. O'Donnell V., Holinka L.G., Gladue D.P., Sanford B., Krug P.W., Lu X., et al. African swine fever virus Georgia isolate harboring deletions of MGF360 and MGF505 genes is attenuated in swine and confers protection against challenge with virulent parental virus. *J. Virol*. 2015; 89(11): 6048–56. <https://doi.org/10.1128/JVI.00554-15>
 54. Barasona J.A., Gallardo C., Cadenas-Fernández E., Jurado C., Rive-ra B., Rodríguez-Bertos A., et al. First oral vaccination of Eurasian wild boar against African swine fever virus genotype II. *Front. Vet. Sci*. 2019; 6: 137. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00137>
 55. Monteagudo P.L., Lacasta A., López E., Bosch L., Collado J., Pina-Pedrero S., et al. BA71ΔCD2: a new recombinant live attenuated African swine fever virus with cross-protective capabilities. *J. Virol*. 2017; 91(21): e01058-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01058-17>
 56. Argilagué J.M., Pérez-Martín E., Nofrarias M., Gallardo C., Accensi F., Lacasta A., et al. DNA vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies. *PLoS One*. 2012; 7(9): e40942. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040942>
 57. Lokhandwala S., Petrovan V., Popescu L., Sangewar N., Elijah C., Stoian A., et al. Adenovirus-vectored African Swine Fever Virus antigen cocktails are immunogenic but not protective against intranasal challenge with Georgia 2007/1 isolate. *Vet. Microbiol*. 2019; 235: 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.06.006>
 58. Lacasta A., Ballester M., Monteagudo P.L., Rodríguez J.M., Salas M.L., Accensi F., et al. Expression library immunization can confer protection against lethal challenge with African swine fever virus. *J. Virol*. 2014; 88(22): 13322–32. <https://doi.org/10.1128/JVI.01893-14.58>
 59. Nedosekov V., Martyniuk A., Stepanova T., Yustyniuk V., Gulyukina I., Parshikova A., et al. Chlamydiae of dogs and cats in modern cities. *E3S Web Conf*. 2021; 258: 04004. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202125804004>

References

1. Mebus C. African swine fever. *Adv. Virus Res*. 1988; 35: 251–69.
2. Dixon L.K., Abrams C.C., Chapman D.G., Zhang F. African swine fever virus. In: Mettenleiter T.C., Sobrino F., eds. *Animal Viruses: Molecular Biology*. Norfolk: Caister Academic Press; 2008: 457–521.
3. Sanchez-Vizcaino J.M., Martinez-Lopez B., Martinez-Aviles M., Martins C., Boinas F., Vial L., et al. Scientific review on African swine fever. *EFSA Supporting Publications*. 2009; 6(8): 5E.
4. Montgomery R.E. On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony). *J. Comp. Pathol*. 1921; 34: 159–91.
5. Dixon L.K., Costa J.V., Escribano J.M., Rock D.L., Vinuela E., Wilkinson P.J. Family Asfarviridae. In: Van Regenmortel M.H.V., Fauquet C.M., Bishop D.H.L., Carestens E.B., Estes M.K., Lemon S.M., eds. *Virus Taxonomy: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego: Summers Academic Press; 2000: 159–65.
6. Colson P., De Lamballerie X., Yutin N., Asgari S., Bigot Y., Bideshi D.K., et al. “Megavirales”, a proposed new order for eukaryotic nucleocytoplasmic large DNA viruses. *Arch. Virol*. 2013; 158(12): 2517–21. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1768-6>
7. Gulyukin M.I. 120 years of the All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after Y.R. Kovalenko. *Trudy Vserossiyskogo NII eksperimental'noy veterinarii im. Ya.R. Kovalenko*. 2018; 80(1): 12–36. <https://doi.org/10.30917/ATT-PRINT-2018-1> (in Russian)
8. Mitin N.I., Balyshev V.M., Fedorishchev I.V., Shevchenko A.A., Petrov Yu.I. Classification scheme of the ASF virus. В кн.: *Materials of the Scientific Conference of the All-Russian Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology. Volume 1 [Materialy*

- nauchnoy konferentsii VNIIViM. Tom 1]. Pokrov; 1986: 69–73. (in Russian)
9. Vishnyakov I.F., Mitin N.I., Petrov Yu.I., Cheryatnikov L.L., Kiselev A.V., Burlakov V.A., et al. Seroimmunological classification of natural isolates of the African swine fever virus. In: *Topical Issues of Veterinary Virology: Materials of the Scientific and Practical Conference «Classical Swine Fever – Urgent Problems of Science and Practice» [Aktual'nye voprosy veterinarnoy virusologii: materialy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Klassicheskaya chuma sviney – neotlozhnye problemy nauki i praktiki»]*. Pokrov; 1995: 141–3. (in Russian)
 10. Burlakov V.A. *Immunological properties of the virus and the problems of developing specific ASF prevention tools*: Diss. Pokrov; 1979. (in Russian)
 11. Balyshv V.M., Knize A.V., Tsybanov S.Zh. ASF geography and serotype heterogeneity of the pathogen. In: *Materials of the Conference of the Moscow Veterinary Academy [Materialy konferentsii Moskovskoy veterinarnoy akademii]*. Moscow; 1999: 92–4. (in Russian)
 12. Manso-Ribeiro J., Nunes-Petisca J.L., Lopez-Fraza F., Sobral M. Vaccination against ASF. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 1963; 60: 921–37.
 13. Boinas F., Hutchings G., Dixon L., Wilkinson P. Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from Ornithodoros erraticus inhabiting pig premises in Portugal. *J. General. Virol.* 2004; 85(Pt. 8): 2177–87. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80058-0>
 14. Morgunov Yu.P., Petrov Yu.I. Study of the immunological properties of ASF type 5 virus: isolation, identification and typing of the reference strain. *Problemy biologii produktivnykh zhivotnye.* 2010; (4): 104–11. (in Russian)
 15. Balyshv V.M., Lagutkin N.A., Salina M.V., Zubairov M.M., Fedorishchev I.V., Karpov G.M. Express method of obtaining type-specific reference serums in ASF. In: *Materials of the International Scientific and Practical Conference «Diagnostics, Prevention and Measures to Combat Especially Dangerous and Exotic Animal Diseases» [Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Diagnostika, profilaktika i mery bor'by s osobo opasnymi i ekzoticheskimi boleznyami zhivotnykh»]*. Pokrov; 1998: 64–5. (in Russian)
 16. Carrascosa J.L., Carazo J.M., Carrascosa A.L., Garcia N., Santisteban A., Vinuela E., et al. General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles. *Virology.* 1984; 132(1): 160–72.
 17. Salas M.L., Andrés M.G. African swine fever virus morphogenesis. *Virus Res.* 2012; 173(1): 29–41. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.09.016>
 18. Dixon L.K., Baylis S.A., Vydelingum S., Twigg S.R., Hammond J.M., Hingamp P.M., et al. African swine fever virus genome content and variability. *Arch. Virol. Suppl.* 1993; 7: 185–99. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-9300-6_15
 19. Dixon L.K., Chapman D.A., Netherton C.L., Upton C. African swine fever virus replication and genomics. *Virus Res.* 2013; 173: 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.020>
 20. Yáñez R.J., Rodríguez J.M., Nogal M.L., Yuste L., Enriquez C., Rodríguez J.F., et al. Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. *Virology.* 1995; 208(1): 249–78. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1149>
 21. Gonzalez A., Talavera A., Almendral J.M., Viñuela E. Hairpin loop structure of African swine fever virus DNA. *Nucleic Acids Res.* 1986; 14(17): 6835–44. <https://doi.org/10.1093/nar/14.17.6835>
 22. Vlasova N.N., Vlasova A.N. African Swine Fever Virus pathogenesis and vaccine development: challenges and possible approaches. Charter I. In: *Fevers: Types, Treatments and Health Risks*. New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2013: 3–26.
 23. Dixon L.K., Abrams C.C., Bowick G., Goatley L.C., Kay-Jackson P.C., Chapman D., et al. African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2004; 100(3-4): 117–34. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2004.04.002>
 24. Dixon L.K., Abrams C.C., Chapman D.G., Zhang F. African swine fever virus. In: Sobrino T.C.M.F., ed. *Animal Viruses Molecular Biology*. Norwich: Caister Academic Press; 2008: 457–521.
 25. Gomez-Villamandos J.C., Bautista M.J., Carrasco L., Chacon-Manrique de Lara F., Hervas J., Wilkinson P.J., et al. Thrombocytopenia associated with apoptotic megakaryocytes in a viral haemorrhagic syndrome induced by a moderately virulent strain of African swine fever virus. *J. Comp. Pathol.* 1998; 118(1): 1–13. [https://doi.org/10.1016/s0021-9975\(98\)80023-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9975(98)80023-6)
 26. Goatley L.C., Twigg S.R., Miskin J.E., Monaghan P., St-Arnaud R., Smith G.L., et al. The African swine fever virus protein p72 binds to the alpha chain of nascent polypeptide-associated complex. *J. Virol.* 2002; 76(19): 9991–9. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.19.9991-9999.2002>
 27. Zsak L., Lu Z., Burrage T.G., Neilan J.G., Kutish G.F., Moore D.M., et al. African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes are novel macrophage host range determinants. *J. Virol.* 2001; 75(7): 3066–76. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.7.3066-3076.2001>
 28. Tulman E.R., Rock D.L. Novel virulence and host range genes of African swine fever virus. *Curr. Opin. Microbiol.* 2001; 4(4): 456–61. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00235-6](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00235-6)
 29. Rock D.L. Challenges for African swine fever vaccine development – “...perhaps the end of the beginning.” *Vet. Microbiol.* 2017; 206: 52–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.10.003>
 30. Blome S., Gabriel C., Beer M. Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation. *Vaccine.* 2014; 32(31): 3879–82. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.05.051>
 31. Alonso C., Galindo I., Cuesta-Geijo M.A., Cabezas M., Hernaiz B., Munoz-Moreno R. African swine fever virus-cell interactions: From virus entry to cell survival. *Virus Res.* 2013; 173(1): 42–57. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.12.006>
 32. Borca M.V., Irusta P., Carrillo C., Afonso C.L., Burrage T., Rock D.L. African swine fever virus structural protein p72 contains a conformational neutralizing epitope. *Virology.* 1994; 201(2): 413–8. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1311>
 33. Onisk D., Borca M., Kutish S., Kramer E., Irusta P., Rock D.L. Passively transferred African swine fever virus antibodies protect swine against lethal infection. *Virology.* 1994; 198(1): 350–4. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1040>
 34. Escribano J.M., Galindo I., Alonso C. Antibody-mediated neutralization of African swine fever virus: Myths and facts. *Virus Res.* 2013; 173(1): 101–9. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.10.012>
 35. Ruiz-Gonzalvo F., Carnero M.E., Caballero C., Martínez J. Inhibition of African swine fever infection in the presence of immune sera in vivo and in vitro. *Am. J. Vet. Res.* 1986; 47(6): 1249–52.
 36. Halstead S.B., Chow J., Marchette N.J. Immunologic enhancement of Dengue virus replication. *Nat. New Biol.* 1973; 243(122): 24–6.
 37. Tirado S.M., Yoon K.J. Antibody-dependent enhancement of virus infection and disease. *Viral Immunol.* 2003; 16(1): 69–86. <https://doi.org/10.1089/088282403763635465>
 38. Pershin A.S., Remyga S.G., Shevchenko I.V., Zhukov I.Yu., Shevtsov A.A., Erofeev S.G. Influence of passive immunization on clinical and pathological features of pigs infection with isolate Martins-Crimea 01/16 ASFV. *Veterinariya.* 2018; (1): 25–31. <https://doi.org/10.30896/0042-4846.2018.21.1.25-31> (in Russian)
 39. Hanada K., Suzuki Y., Gojbori T. A large variation in the rates of synonymous substitution for RNA viruses and its relationship to a diversity of viral infection and transmission modes. *Mol. Biol. Evol.* 2004; 21(6): 1074–80. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh109>
 40. Gómez-Puertas P., Rodríguez F., Oviedo J.M., Brun A., Alonso C., Escribano J.M. The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. *Virology.* 1998; 243(2): 461–71. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9068>
 41. Neilan J.G., Zsak L., Lu Z., Burrage T.G., Kutish G.F., Rock D.L. Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology.* 2004; 319(2): 337–42. <https://doi.org/10.1016/j.viro.2003.11.011>
 42. Ruiz-Gonzalvo F., Rodríguez F., Escribano J. Functional and immunological properties of the baculovirus-expressed hemagglutinin of African swine fever virus. *Virology.* 1996; 218(1): 285–9. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0193>
 43. Goatley L.C., Reis A.L., Portugal R., Goldswain H., Shimmion G.L., Hargreaves Z., et al. A pool of eight virally vectored African swine fever antigens protect pigs against fatal disease. *Vaccines (Basel).* 2020; 8(2): 234. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020234>
 44. Leitão A., Cartaxeiro C., Coelho R., Cruz B., Parkhouse R.M.E., Portugal F.C., et al. The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response. *J. Gen. Virol.* 2001; 82(Pt. 3): 513–23. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-3-513>

45. Mulumba-Mfumu L.K., Goatley L.C., Saegerman C., Takamatsu H.H., Dixon L.K. Immunization of African indigenous pigs with attenuated genotype I African swine fever virus OURT88/3 induces protection against challenge with virulent strains of genotype I. *Transbound. Emerg. Dis.* 2016; 63(5): e323–7. <https://doi.org/10.1111/tbed.12303>
46. Takamatsu H.H., Denyer M.S., Lacasta A., Stirling C.M., Argilagué J.M., Netherton C.L., et al. Cellular immunity in ASFV responses. *Virus Res.* 2013; 173(1): 110–21. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.11.009>
47. Oura C.A.L., Denyer M.S., Takamatsu H., Parkhouse R.M.E. In vivo depletion of CD8⁺ T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus. *J. Gen. Virol.* 2005; 86(Pt. 9): 2445–50. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81038-0>
48. Arias M., de la Torre A., Dixon L., Gallardo C., Jori F., Laddomada A., et al. Approaches and perspectives for development of African swine fever virus vaccines. *Vaccines (Basel)*. 2017; 5(4): 35. <https://doi.org/10.3390/vaccines5040035>
49. Gallardo C., Soler A., Nieto R., Cano C., Pelayo V., Sánchez M.A., et al. Experimental infection of domestic pigs with African swine fever virus Lithuania 2014 genotype II field isolate. *Transbound. Emerg. Dis.* 2017; 64(1): 300–4. <https://doi.org/10.1111/tbed.12346>
50. Sanford B., Holinka L., O'Donnell V., Krug P., Carlson J., Alfano M., et al. Deletion of the thymidine kinase gene induces complete attenuation of the Georgia isolate of African swine fever virus. *Virus Res.* 2016; 213: 165–71. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.12.002>
51. Reis A.L., Abrams C.C., Goatley L.C., Netherton C., Chapman D.G., Sanchez-Cordon P., et al. Deletion of African swine fever virus interferon inhibitors from the genome of a virulent isolate reduces virulence in domestic pigs and induces a protective response. *Vaccine*. 2016; 34(39): 4698–705. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.08.011>
52. Borca M.V., Ramirez-Medina E., Silva E., Vuono E., Rai A., Pruitt S., et al. Development of a highly effective African Swine Fever virus vaccine by deletion of the I177L gene results in sterile immunity against the current epidemic Eurasia strain. *J. Virol.* 2020; 94(7): e02017-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.02017-19>
53. O'Donnell V., Holinka L.G., Gladue D.P., Sanford B., Krug P.W., Lu X., et al. African swine fever virus Georgia isolate harboring deletions of MGF360 and MGF505 genes is attenuated in swine and confers protection against challenge with virulent parental virus. *J. Virol.* 2015; 89(11): 6048–56. <https://doi.org/10.1128/JVI.00554-15>
54. Barasona J.A., Gallardo C., Cadenas-Fernández E., Jurado C., Rivera B., Rodríguez-Bertos A., et al. First oral vaccination of Eurasian wild boar against African swine fever virus genotype II. *Front. Vet. Sci.* 2019; 6: 137. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00137>
55. Monteagudo P.L., Lacasta A., López E., Bosch L., Collado J., Pina-Pedrero S., et al. BA71ΔCD2: a new recombinant live attenuated African swine fever virus with cross-protective capabilities. *J. Virol.* 2017; 91(21): e01058-17. <https://doi.org/10.1128/JVI.01058-17>
56. Argilagué J.M., Pérez-Martín E., Nofrarias M., Gallardo C., Accensi F., Lacasta A., et al. DNA vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies. *PLoS One*. 2012; 7(9): e40942. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040942>
57. Lokhandwala S., Petrovan V., Popescu L., Sangewar N., Elijah C., Stoian A., et al. Adenovirus-vectored African Swine Fever Virus antigen cocktails are immunogenic but not protective against intranasal challenge with Georgia 2007/1 isolate. *Vet. Microbiol.* 2019; 235: 10–20. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.06.006>
58. Lacasta A., Ballester M., Monteagudo P.L., Rodríguez J.M., Salas M.L., Accensi F., et al. Expression library immunization can confer protection against lethal challenge with African swine fever virus. *J. Virol.* 2014; 88(22): 13322–32. <https://doi.org/10.1128/JVI.01893-14.58>
59. Nedosekov V., Martyniuk A., Stepanova T., Yustyniuk V., Gulyukina I., Parshikova A., et al. Chlamydiosis of dogs and cats in modern cities. *E3S Web Conf.* 2021; 258: 04004. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202125804004>

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

**НАУЧНАЯ СТАТЬЯ**DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-108>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Идентификация регуляторных некодирующих РНК вируса папилломы человека типа 16 (*Papillomaviridae: Alpharapillomavirus: Human papillomavirus*) в опухолях шейки матки

Киселева Н.П., Федорова М.Д., Заикина А.Э., Елкина Н.В., Голдобина Е.Е*, Елкин Д.С., Абрамов П.М., Павлова Л.С., Винокурова С.В.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Россия

Введение. Вирусы папилломы человека высокого канцерогенного риска признаны этиологическими агентами рака шейки матки. Постоянная экспрессия вирусных онкобелков E6 и E7 необходима для поддержания злокачественного фенотипа опухолевых клеток. Точный механизм регуляции экспрессии вирусных онкогенов в опухолевых клетках до конца не выяснен.

Цель работы – идентификация вирусных некодирующих РНК (нкРНК) при ВПЧ16-положительном раке шейки матки.

Материалы и методы. Для обнаружения вирусных нкРНК в ВПЧ16-положительных первичных плоскоклеточных карциномах шейки матки и клеточных линиях SiHa и CaskI использовали полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией. Для выяснения функций нкРНК использовали метод нокадауна с олигонуклеотидами, комплементарными нкРНК.

Результаты. Мы идентифицировали нкРНК, транскрибируемые в регуляторной области ВПЧ16, в клеточных линиях и в 32 из 32 плоскоклеточных карцином шейки матки с эписомальной или интегративной формами вирусной ДНК. Нокадаун смысловых или антисмысловых цепей нкРНК приводит к снижению или увеличению уровней мРНК онкогенов E6 и E7 в клетках, соответственно. Эти изменения уровней мРНК онкогенов сопровождаются модуляцией уровня белка p53, основной мишени онкобелка E6.

Заключение. Присутствие впервые выявленных регуляторных нкРНК во всех исследованных опухолях и клеточных линиях свидетельствует об их необходимости для поддержания в них постоянной экспрессии онкогенов E6 и E7. Полученные данные могут быть полезны для понимания фундаментальных аспектов регуляции экспрессии вируса в ВПЧ16-позитивных опухолях.

Ключевые слова: вирусы папиллом человека; вирусные некодирующие РНК; рак шейки матки

Для цитирования: Киселева Н.П., Федорова М.Д., Заикина А.Э., Елкина Н.В., Голдобина Е.Е., Елкин Д.С., Абрамов П.М., Павлова Л.С., Винокурова С.В. Идентификация регуляторных некодирующих РНК вируса папилломы человека типа 16 (*Papillomaviridae: Alpharapillomavirus: Human papillomavirus 16*) в опухолях шейки матки. *Вопросы вирусологии.* 2022; 66(3): 217–225. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-108>

Для корреспонденции: Киселева Наталия Петровна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии вирусов ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Россия. E-mail: natalia-kis@yandex.ru

Участие авторов: Киселева Н.П. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Федорова М.Д. – проведение экспериментов, контроль, анализ и представление данных; Заикина А.Э., Елкина Н.В., Голдобина Е.Е., Елкин Д.С., Абрамов П.М. – проведение экспериментов; Павлова Л.С. – сбор клинического материала, анализ историй болезни; Винокурова С.В. – обсуждение и интерпретация результатов, консультативная помощь, редактирование текста, утверждение окончательной версии статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счет Государственного бюджета и поддержано грантом РФФИ (грант 15-15-00125).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (Протокол от 27.01.2022.).

Поступила 04.03.2022
Принята в печать 17.05.2022
Опубликована 30.06.2022

*Настоящий адрес: Gut Phageomics, Lab APC Microbiome Ireland, University College Cork, Ireland

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-108>

Identification regulatory noncoding RNAs of human papilloma virus type 16 (*Papillomaviridae: Alphapapillomavirus: Human papillomavirus*) in cervical tumors

Natalia P. Kisseljova, Maria D. Fedorova, Anastasia E. Zaikina, Nadezhda V. Elkina, Ekaterina E. Goldobina*, Danila S. Elkin, Pavel M. Abramov, Larisa S. Pavlova, Svetlana V. Vinokurova

FSBI «National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin» of the Ministry of Health of Russia, 115478, Moscow, Russia

Introduction. High carcinogenic-risk human papillomaviruses (hrHPVs) are recognized as etiological agents of cervical cancer. Constant expression of the viral oncoproteins, E6 and E7, is required for maintenance of the malignant phenotype of tumor cells. The exact mechanism of regulation of viral oncogenes expression in tumor cells is not fully elucidated.

The **purpose:** identification of viral noncoding RNAs (ncRNAs) in HPV16-positive cervical cancer.

Materials and methods. The reverse transcription polymerase chain reactions were used to detect viral ncRNAs in HPV16-positive primary cervical squamous cell carcinomas and SiHa and CasKi cell lines. The knockdown technique with oligonucleotides complementary to ncRNAs was used to elucidate their functions.

Results. We have identified ncRNAs transcribed in the upstream regulatory region of HPV16 in the cervical carcinoma cell lines and in 32 out of 32 cervical squamous cell carcinomas with episomal or integrated forms of HPV16 DNA. Knockdown of sense or antisense strains of ncRNAs by oligonucleotides results in a decrease or increase of the E6 and E7 oncogenes mRNA levels in cells, respectively. These changes of oncogenes mRNA levels are accompanied by the modulation of the levels of the p53 protein, the main target of the E6 oncoprotein.

Conclusion. The presence of regulatory ncRNAs in all examined tumors and cell lines revealed for the first time indicates their necessity for maintenance of constant expression of E6 and E7 oncogenes in them. The findings can be useful for understanding of the fundamental aspects of the viral expression regulation in HPV16-positive tumors.

Keywords: *human papillomaviruses; viral noncoding RNA; cervical cancer*

For citation: Kisseljova N.P., Fedorova M.D., Zaikina A.E., Elkina N.V., Goldobina E.E., Danila S. Elkin, Abramov P.M., Pavlova L.S., Vinokurova S.V. Identification regulatory noncoding RNAs of human papilloma virus type 16 (*Papillomaviridae: Alphapapillomavirus: Human papillomavirus*) in cervical tumors. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 66(3): 217–225. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-108>

For correspondence: Kisseljova N.P., PhD. Sci. (Biol.), principal researcher of Laboratory of Molecular Biology of viruses, N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russian Federation, 115478, Moscow, Russia. E-mail: natalia-kis@yandex.ru

Information about the authors:

Kisseljova N.P., <https://orcid.org/0000-0003-0236-4548>

Fedorova M.D., <https://orcid.org/0000-0002-8813-7516>

Zaykina A.E., <https://orcid.org/0000-0002-7439-4212>

Elkina N.V., <https://orcid.org/0000-0002-0503-6016>

Goldobina E.E., <https://orcid.org/0000-0003-4036-3415>

Elkin D.S., <https://orcid.org/0000-0002-4793-6063>

Abramov P.M., <https://orcid.org/0000-0002-7995-3490>

Pavlova L.S., <https://orcid.org/0000-0003-3993-4823>

Vinokurova S.V., <https://orcid.org/0000-0003-1615-3928>

Contribution. Kisseljova N.P. – research concept and design, experiments, data analysis and interpretation, writing – original draft; Fedorova M.D. – experiments, monitoring, analyzing and presenting data; Zaykina A.E., Elkina N.V., Goldobina E.E., Elkin D.S., Abramov P.M. – experiments; Pavlova L.S. – collection of clinical material, analysis of case histories; Vinokurova S.V. – supervision, writing – review & editing.

Funding. This work was funded by the State budget and was supported by Russian Scientific Foundation (grant 15-15-00125).

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

Ethics approval. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the FSBI N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russian Federation (Protocol dated 27.01.2022).

Received 04 March 2022

Accepted 17 May 2022

Published 30 June 2022

*Present address: Gut Phageomics, Lab APC Microbiome Ireland, University College Cork, Ireland.

Введение

Инфекция, вызываемая вирусами папилломы человека (ВПЧ), является одной из наиболее распространенных в мире [1]. К злокачественным опухолям, этиологическими агентами которых признаны ВПЧ высокого канцерогенного риска (врВПЧ), относятся большинство опухолей шейки матки, часть опухолей влагалища, вульвы, ануса, пениса и ротоглотки. При этом около 70% ВПЧ-ассоциированных опухолей вызываются врВПЧ типов 16, 18 [2, 3].

Рак шейки матки (РШМ) более чем в 95% случаев имеет вирусную этиологию и является второй по частоте причиной смерти женщин в мире [3]. Несмотря на то что в настоящее время сертифицировано несколько вакцин, предотвращающих инфицирование ВПЧ, изучение ВПЧ остается актуальной задачей по следующим обстоятельствам: 1) существующие вакцины разработаны не против всех типов ВПЧ; 2) вакцины предотвращают инфицирование ВПЧ, но не являются лечебными для инфицированных пациентов и носителей опухолей; 3) отсутствуют эффективные медикаментозные методы лечения ВПЧ-инфекции, избавление от которой является основой профилактики ВПЧ-ассоциированных опухолей.

Геном ВПЧ представлен кольцевой двухцепочечной ДНК. ДНК кодирует ранние (*E*) и поздние (*L*) гены, порядок и уровень экспрессии которых строго регулируется в продуктивном жизненном цикле вируса. Белковые продукты двух генов *E6* и *E7*, взаимодействующие с регуляторами клеточного цикла, играют ключевую роль в обеспечении амплификации вирусных геномов в дифференцирующихся эпителиальных клетках и в дерегуляции клеточного цикла при злокачественной трансформации [4]. В первичных культурах клеток карцином шейки матки и клеточных линиях показано, что для пролиферации и поддержания трансформированного фенотипа клеток необходима постоянная экспрессия в них онкогенов *E6* и *E7*. Подавление экспрессии *E6* и *E7* различными методами приводит к старению клеток и/или активации апоптоза [5–8]. В связи с этим изучение механизмов регуляции экспрессии онкогенов *E6* и *E7* важно для понимания механизмов злокачественной трансформации и поиска мишеней противоопухолевой терапии.

В настоящее время известно, что до 99% генома млекопитающих транскрибируется в различных клетках с образованием коротких и длинных некодирующих РНК (нкРНК), не имеющих открытых рамок считывания. Помимо хорошо известных нкРНК «домашнего хозяйства» (транспортных РНК, рибосомных РНК, теломеразной РНК и др.), идентифицированы регуляторные нкРНК, участвующие в регуляции различных клеточных процессов, включая эпигенетический контроль, транскрипцию и трансляцию генов [9]. Поскольку вирусы используют клеточные системы для транскрипции, процессинга и функционирования их мРНК, очевидно, что могут существовать и вирусные нкРНК. Это предположение в настоящее время подтверждено для двух онкогенных вирусов: вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) (*Herpesviri-*

dae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4) и вируса саркомы Капоши (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Rhadinovirus: Human gammaherpesvirus 8*). Вирусные нкРНК транскрибируются с промоторов полимераз III или II, некоторые из них могут быть полиаденилированы [10, 11]. нкРНК играют важную роль в регуляции транскрипции вирусных генов в жизненных циклах этих вирусов и патогенезе вызываемых ими заболеваний (включая злокачественные новообразования).

В настоящей работе смысловые и антисмысловые транскрипты, перекрывающие более 600 п.н. регуляторной области ВПЧ16 URR (от англ. upstream regulatory region), были идентифицированы в клеточных линиях карцином шейки матки и первичных опухолях. Эти транскрипты принимают участие в регуляции экспрессии онкогенов *E6* и *E7*. Данные о том, что вирусные нкРНК присутствуют в врВПЧ-ассоциированных опухолях, в литературе отсутствуют.

Материалы и методы

Клинический материал

Образцы плоскоклеточных карцином (ПКК) шейки матки были получены от больных НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина в патологоанатомическом отделении, согласно правилам этического комитета центра. Физический статус генома ВПЧ16 был определен с помощью метода АРОТ (от англ. amplification of papillomavirus oncogene transcripts), позволяющего определить, с какого типа генома (интегрированного или эписомального) был считан транскрипт ранних генов ВПЧ. Наличие эписом ВПЧ16 в образцах было подтверждено методом ПЦР ДНК с использованием праймеров, специфичных для полноразмерных генов *E1* и *E2* [12,13].

Клеточные линии

Клеточные линии РШМ человека SiHa и CasKi (American Type Culture Collection, Rockville, MD) культивировали в среде DMEM с 10% эмбриональной бычьей сывороткой, пенициллином, стрептомицином и L-глутамином, в CO₂-инкубаторе при 5% концентрации CO₂ и температуре 37°C. Клетки SiHa содержат геном врВПЧ16, интегрированный в геном клетки (2 копии на 1 клетку) [14]. Клетки CasKi содержат более 600 копий генома врВПЧ16, интегрированных в 11 сайтов разных хромосом в виде тандемных повторов «голова к хвосту» [15].

Выделение РНК

Выделение тотальной РНК из замороженных опухолевых тканей проводили набором PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу фирмы. Концентрацию тотальной РНК определяли по РНК-специфичной флуоресценции на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США).

Полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР)

Для устранения возможного загрязнения ДНК тотальную РНК обрабатывали ДНКазой (Deoxyribonuclease I

Amplification Grade, Invitrogen, США) в соответствии с рекомендациями поставщика. РНК подвергали обратной транскрипции (ОТ-реакция) с использованием случайных гексапраймеров (Litex, РФ) или Random₍₁₀₎ (Evrogen, РФ) и обратной транскриптазы (Super Script III RT, Invitrogen, США) согласно протоколу производителей. Для контроля полноты удаления ДНК параллельно проводили реакцию без добавления обратной транскриптазы для каждого образца РНК. Для анализа направления транскрипции ОТ-реакцию проводили с праймерами, специфичными к 1) смысловой цепи О1-5' (7452 п.н.) GGT TGA AGC TAC AAA ATG G; O2-5' (7617 п.н.) AGT GCA GTG TAA AAA ACA ATG G и 2) к антисмысловой цепи П1 – 5' (6997 п.н.) AGT TTT CTG CAG ACC TAG ATC AG; П2-5' (7340 п.н.) CCT ACT AAT TGT GTT GTG GTT A. Положения праймеров здесь и далее указаны согласно HPV16 AF125673 (GenBank). Для контроля на самопраймирование РНК (способность Отаз инициировать синтез кДНК в отсутствие экзогенных праймеров с двухцепочечной структуры РНК, образующейся на 3'-конце [16]) одновременно проводили реакцию без добавления праймеров. В случае обнаружения самопраймирования РНК для предотвращения амплификации такой кДНК в ПЦР использовали сиквенс-специфичный праймер с адаптером на 5'-конце (3'TGCTACAGCTGAGCTCAGG 5') в ОТ-реакции и адаптер в качестве обратного праймера в ПЦР.

Качество и количество кДНК оценивали с помощью ПЦР с праймерами к «генам домашнего хозяйства»: *HPRT* F-5'CTGGATTACATCAAAGCACTG, R-5'GGATTATACTGCCTGACCAAG (T_{отж} 60°C); *β-глобин* F-5'GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG, R-5'CCACTTCATCCACGTTTACC (T_{отж} 55°C). Состав праймеров, специфичных для ВПЧ, для всех областей URR и условия ПЦР доступны по запросу. Вирус-специфические продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле, очищали и секвенировали для подтверждения их идентичности.

Определение количества копий нкРНК

Количество копий транскриптов ВПЧ16 в двух районах (URR 7340-7452 п.н. и ранние гены (99-226 п.н.) определяли методом ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием кДНК, синтезированной со случайными праймерами, и следующими праймерами и зондами для ПЦР: для URR 7340-7452 п.н. F-5'ССТАСТААТТГТГТТГТГГТТА,

R-5'GGTTGAAGЦТАААААТGG, зонд TaqMan

FAM-АСТАТАТТТГСТАСАТСТГТТТТТГТ-ВНQ1, T_{отж} 54°C;

для области ранних генов ВПЧ 99-226 п.н., F-5'CTG СААТГТТТСAGGACCCAC 3',

R-5'CTCCACGTCGCAGTAACTGTTG 3', зонд TaqMan FAM-АСТТГТАСГТТТСТГСТТГСАТ-ВНQ1, T_{отж} 63°C.

Копийность двух типов транскриптов в образце определяли в трехкратной повторности с использованием стандартных кривых, построенных для каждого опыта с серийными разведениями ДНК клеток SiHa

(2 копии генома ВПЧ16 на 1 клетку) [14]. Количество ВПЧ16-специфических копий рассчитывали на 1 нг исходной тотальной РНК.

Трансфекция клеток олигонуклеотидами

Олигонуклеотиды (ОН) трансфицировали липидным реагентом Silent-Fect (Bio-Rad Laboratories, США) по протоколу, предложенному производителем, в течение 48 ч. Известно, что ОН эффективно функционируют через эндогенные пути РНК-интерференции [17]. Коктейли из 4 ОН, комплементарных смысловой или антисмысловой цепям, трансфицировали по отдельности в трех независимых экспериментах по 3 повтора в каждом из них. Нуклеотидные последовательности и позиции ОН в геноме ВПЧ16:

7331s 5'GUUUCAACACCUACUAAUUGU;

7331as 5'ACAAUUAGUAGGUGUUGAAAC;

7548s 5'AUGCGUGCCAAAUCUUGUUU;

7548as 5'AAACAGGGAUUUGGCACGCAU;

7500s 5'GUUCUAUGUCAGCAACUUAU;

7500as 5'UAUAGUUGCUGACAUAGAAC;

7583s 5'GCUUGCCAACCAUCCAUUGUU;

7583as 5'AACAAUGGAAUGGUUGGCAAGC;

s – ОН является копией смысловой цепи, as – ОН является копией антисмысловой цепи.

Вестерн-блот

Белки экстрагировали буфером RIPA, содержащим коктейль ингибиторов протеаз без ЭДТА (Roche, Германия). Белковые лизаты анализировали в 7% гелях (SDS/PAGE) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-ECL (GE Healthcare/Life Sciences, США) с использованием Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, США). Мембрану блокировали 5% обезжиренным молоком в буфере TBST в течение 1 ч при комнатной температуре, инкубировали с моноклональными антителами к p53 в титре 1:200 (DO-1, MA5-12571, ThermoFisher Scientific, США) или с антителами к GAPDH для контроля нагрузки (GA1R, MA5-15738, ThermoFisher Scientific, США) в титре 1:5000 при 4°C в течение ночи, а затем обрабатывали вторичными козьими антителами к иммуноглобулинам мыши, конъюгированными с пероксидазой хрена (Bio-Rad, США) в титре 1:5000 в течение 2 ч. Белковые полосы визуализировали с помощью Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты

Анализ РНК, транскрибируемых в URR ВПЧ16. Поиск нкРНК осуществляли методом ОТ-ПЦР в регуляторной области URR (рис. 1 а). URR содержит промотор ранних генов, энхансер, точку начала репликации, сайт полиаденилирования поздних генов, сайты узнавания как клеточных, так и вирусных факторов транскрипции и не содержит открытых рамок считывания для белков [18]. Для поиска потенциальных нкРНК мы использовали две клеточные линии карцином шейки матки шейки матки SiHa и CasKi, которые содержат ДНК ВПЧ16, интегрированные

в клеточный геном [14, 15]. Учитывая, что количество копий известных нкРНК на клетку намного меньше, чем у мРНК, и не все из них имеют сигнал полиаденилирования, для синтеза кДНК в этих экспериментах использовали не олиго-dT-праймеры, а случайные праймеры [19].

После получения кДНК с тотальной РНК в ОТ-реакции проводили серию ПЦР с таким расчетом, чтобы продукты ПЦР перекрывали весь район URR и часть прилегающих к нему рамок

считывания для позднего гена L1 и ранних генов (в том числе E6 и E7). Продукты ПЦР были обнаружены на всем протяжении URR (рис. 1 б, в). Результаты указывают на существование транскриптов в этой области ВПЧ16 в обеих клеточных линиях. Обнаруженные транскрипты физически не связаны с мРНК ранних генов, о чем свидетельствует отсутствие продуктов ПЦР в районе 7889-172 п.н. Таким образом, транскрипты были обнаружены в URR ВПЧ16.

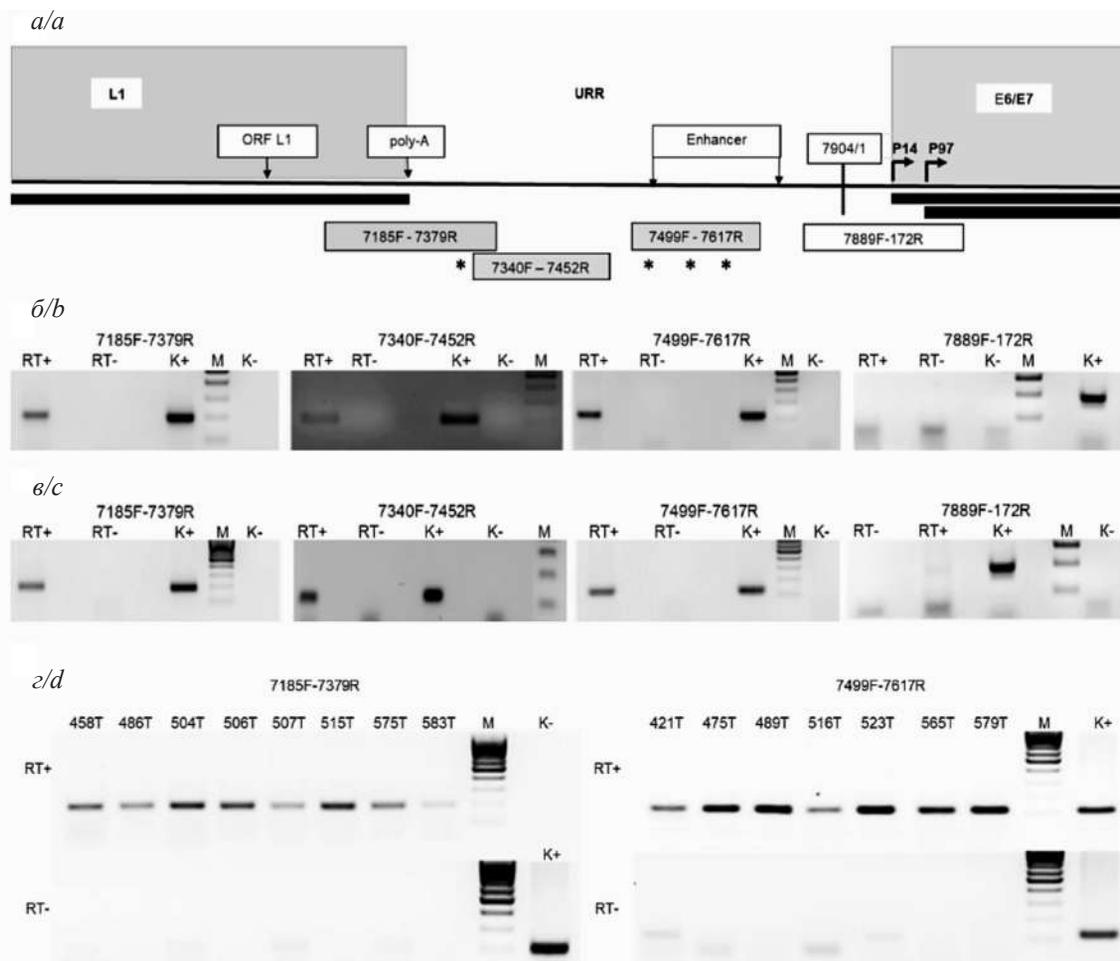


Рис. 1. Анализ транскрипции в районе URR ВПЧ16 методом ОТ-ПЦР. *a*: сплошная линия – схема URR ВПЧ16, расположенного между поздним геном *L1* и ранними генами *E6/E7*; позиции олигонуклеотидов, использованных для нокдауна нкРНК, обозначены звёздочками; изогнутые стрелки – старты транскрипции ранних генов [13]; вертикальная черта – точка начала (1 п.н.) и конца отсчёта (7904 п.н.) нуклеотидов в кольцевом геноме ВПЧ16; ORF L1 – конец рамки считывания вирусного белка L1; polyA – сигнал полиаденилирования РНК поздних генов; чёрные прямоугольники под сплошной линией – транскрипты поздних и ранних генов; серые прямоугольники – продукты ОТ-ПЦР обнаружены; белые прямоугольники – продукты ОТ-ПЦР отсутствуют; цифры внутри прямоугольников – позиции прямого (F) и обратного (R) праймеров (п.н.) согласно сиквенсу ВПЧ16 AF125673 (GenBank); *b-d* – электрофореграммы продуктов ПЦР: *b* – клетки SiHa; *c* – клетки опухоли шейки матки. [RT+] и [RT-] – синтез кДНК проведён в присутствии и отсутствии обратной транскриптазы соответственно; [K+] – ПЦР с ДНК ВПЧ16 (положительный контроль ПЦР); [K-] – H₂O вместо ДНК-матрицы (контроль на контаминацию реактивов ПЦР); M – маркер, 100 п.н.

Fig. 1. Analysis of transcription in the HPV 16 URR by RT-PCR. *a*: solid line – scheme of the HPV16 URR, located between the late gene *L1* and the early genes *E6/E7*; the positions of the oligonucleotides used for knockdown ncRNAs are marked with asterisks; broken arrows – the start of transcription of early genes [13]; vertical line – the beginning (1 bp) and end (7,904 bp) points of the nucleotide count in the HPV16 circular genome; ORF L1 – the end of the open reading frame of the L1 viral protein; polyA – the signal of polyadenylation of late genes. The black rectangles under solid line – transcripts of early and late genes; gray rectangles – RT-PCR products were detected; white rectangles – RT-PCR products were absent; the numbers inside the rectangles – the positions of forward (F) and reverse (R) primers (bp) according to the HPV16 AF125673 (GenBank) sequence; *b-d* – electrophoregrams of PCR products: *b* – SiHa cells; *c* – CasKi cells; *d* – cervical tumors. [RT+] and [RT-] – cDNA synthesis was performed in the presence and absence of reverse transcriptase, respectively; [K+] – PCR with HPV16 DNA (positive control for PCR); [K-] – H₂O instead of the DNA (control for contamination of PCR reagents); M – 100 bp ladder.

Анализ направления транскрипции в URR

URR ВПЧ16 содержит энхансер (в позиции 7529–7752 п.н.) [20]. Известно, что для ряда энхансеров характерна транскрипция нкРНК в двух направлениях [21]. В связи с этим исследовали направление транскрипции в URR в клетках SiHa. Синтез кДНК для этой цели проводили с вирус-специфическими праймерами, комплементарными к смысловой или антисмысловой цепям ДНК. Праймеры были расположены в двух разных областях URR для повышения чувствительности анализа, учитывая низкое число

копий предполагаемых нкРНК (рис. 2). Как следует из результатов, представленных на рис. 2 б и в, в URR от 6997 до 7617 п.н. присутствуют как смысловые, так и антисмысловые транскрипты.

Из полученных результатов следует, что старт транскрипции смысловой цепи – располагается между 6947 и 6997 п.н., а для антисмысловой цепи между 7617 и 7709 п.н. Длина транскриптов, таким образом, составляет не менее 620 п.н., и, следовательно, эти нкРНК можно отнести к категории длинных нкРНК. Эти данные подтверждают отсутствие физической

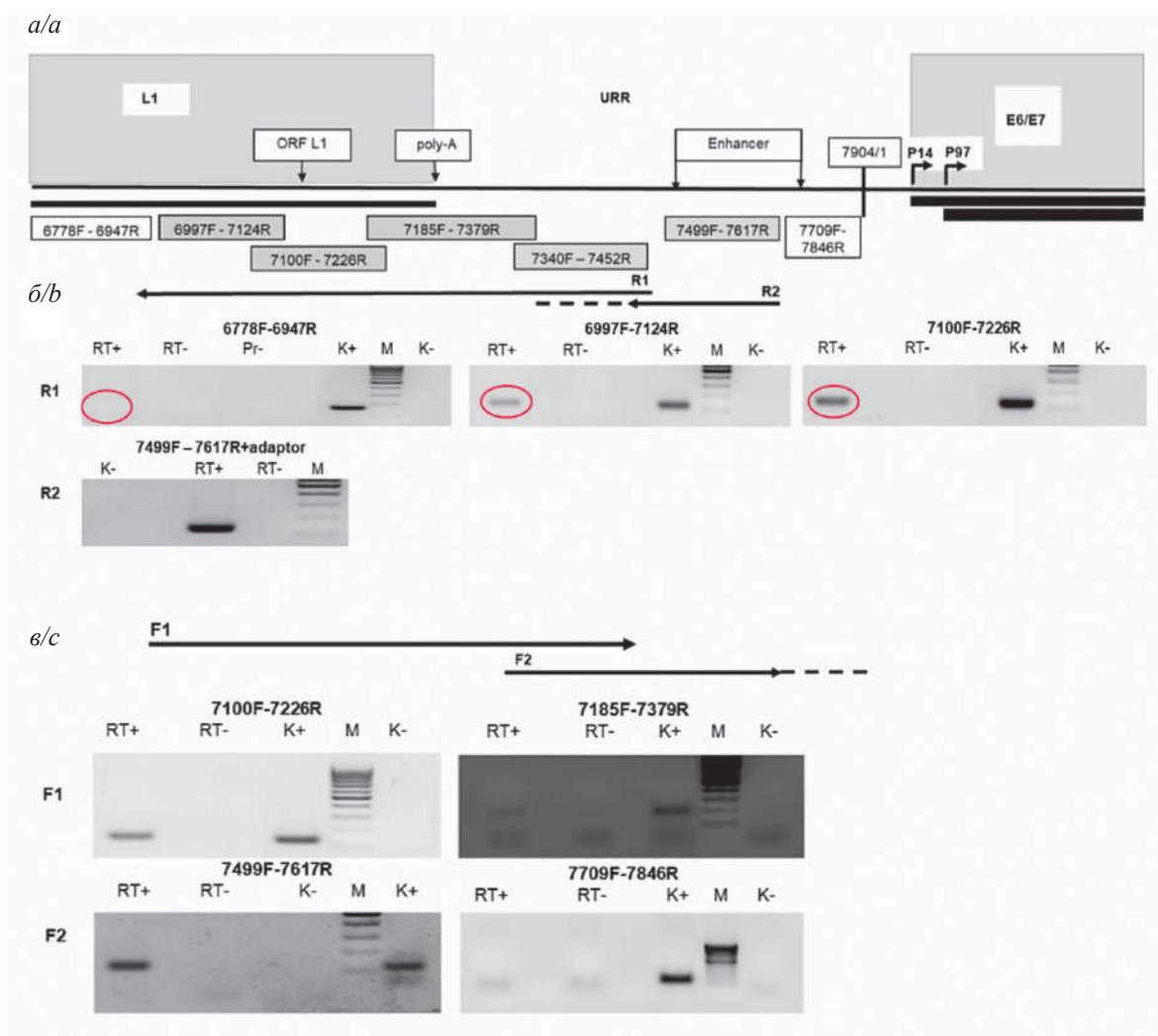


Рис. 2. Анализ направления транскрипции в URR ВПЧ16 методом ОТ-ПЦР в клетках SiHa. *a*: сплошная линия – схема URR ВПЧ16, обозначения как в подписи к рис. 1, *a*. F1, F2 и R1, R2 – генспецифические праймеры для синтеза кДНК с антисмысловой и смысловой цепей соответственно; *б*, *в* – анализ продуктов ОТ-ПЦР методом электрофореза в агарозном геле. [RT+] и [RT–] – синтез кДНК проведён в присутствии и отсутствии обратной транскриптазы соответственно; [K+] – ПЦР с ДНК SiHa (положительный контроль ПЦР); [K–] – H₂O вместо ДНК-матрицы (контроль на контаминацию реактивов ПЦР); [Pr–] – ПЦР без праймеров (контроль на самопраймирование РНК), адаптор – см. раздел «Материалы и методы»; цифры – позиции всех элементов в п.н. согласно сиквенсу ВПЧ16 AF125673 (GenBank); M – маркер, 100 п.н. Овал указывает позицию продукта ПЦР в геле.

Fig. 2. Analysis of the transcription direction in the HPV16 URR of SiHa cells by RT-PCR. *a*: the solid line is a scheme of the HPV16 URR, designations like in legend of Fig. 1 *a*. F1, F2 and R1, R2 are gene-specific primers for cDNA synthesis on the *antisense* and *sense* chains, respectively; *b*, *c* – analysis of the products of RT-PCR by electrophoresis in agarose gel. [RT+] and [RT–] – cDNA synthesis was performed in the presence and absence of reverse transcriptase, respectively; [K+] – PCR with DNA of SiHa (positive control for PCR); [K–] – H₂O instead of cDNA (control for contamination of PCR reagents); [Pr–] – cDNA synthesis was performed without primers (control for RNA self-priming), adaptor – see «Material and methods»; numbers are the positions of all elements (bp) according to the HPV16 AF125673 (GenBank) sequence; M – marker, 100 bp ladder. The oval indicates the position of the PCR product in the gel.

связи транскриптов как с мРНК позднего гена L1, так и с мРНК ранних генов. Таким образом, показана двунаправленная транскрипция в районе URR ВПЧ16.

Регуляция экспрессии ранних генов ВПЧ16 длинными некодирующими РНК

Для выяснения функций нкРНК использовали метод «нокдауна» – подавление транскриптов на посттранскрипционном уровне с помощью трансфекции в клетки SiHa ОН, комплементарных к смысловой и антисмысловой цепям нкРНК [17]. Положения ОН, используемых для нокдауна нкРНК, отмечены звездочками на рис. 1 а. Результаты экспериментов представлены на рис. 3. Во-первых, достоверное снижение общего уровня некодирующих РНК на 40–50% было определено в клетках SiHa после транзientной трансфекции коктейлями ОН, комплементарными каждой из цепей (рис. 3 в; $p = 0,0001–0,0009$).

После этого определены уровни мРНК ранних генов (рис. 3 а, б). Трансфекция ОН, комплементарных антисмысловым транскриптам, привела к статистически значимому увеличению числа транскриптов E6/E7 в клетках ($p = 0,03$). Это позволяет предполагать, что антисмысловой транскрипт URR является негативным регулятором уровня мРНК ранних генов. При трансфекции в клетки комплементарных смысловому транскрипту ОН выявлено снижение уровня транскриптов E6/E7, т.е., вероятно, смысловой транскрипт, в свою очередь, выступает в качестве позитивного регулятора экспрессии ранних генов.

Таким образом, показано, что нкРНК, транскрибируемые в области URR, принимают участие в регуляции уровня мРНК ранних генов ВПЧ16 (в т.ч. онкогенов E6 и E7).

Затем, чтобы подтвердить, что нокдаун нкРНК с помощью ОН приводит не только к изменению экспрессии, но также влияет на активность вирусных онко-

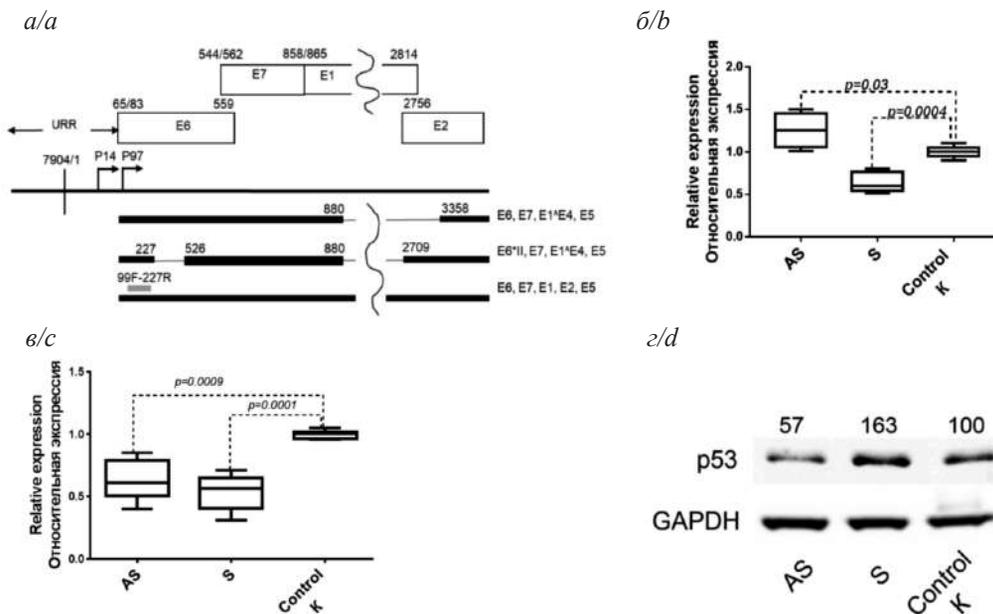


Рис. 3. Влияние нокдауна нкРНК на уровень мРНК и активность ранних генов ВПЧ16 в клетках SiHa. а: сплошная линия – схема участка генома ВПЧ16 с ранними генами (обозначения как в подписи к рис. 1); варианты сплайсинга мРНК обозначены жирной чертой для экзонов, тонкой чертой для интронов, справа обозначен кодирующий потенциал каждого варианта; малый серый прямоугольник – позиция исследуемого района мРНК; цифры – позиции всех элементов в п.н. согласно сиквенсу ВПЧ16 AF125673 (GenBank); S – трансфекция коктейлями олигонуклеотидов, комплементарными к смысловой цепи нкРНК; AS – трансфекция коктейлями олигонуклеотидов, комплементарными к антисмысловой цепи нкРНК; K – трансфекция без добавления олигонуклеотидов, кДНК синтезирована с гексапраймерами; б, в – на оси ординат указаны уровни РНК ВПЧ16, нормализованные по отношению к мРНК гена *HPRT*; б – уровень мРНК суммарного транскрипта ранних генов; в – уровень нкРНК. Статистическая обработка данных проведена в программе GraphPad Prism v.7.00 с помощью парного t-теста; г – анализ экспрессии p53 методом вестерн-блоттинга. Представлен типичный результат трансфекции. GAPDH – контроль белковой нагрузки; цифры над блотом – нормализованные уровни белка p53 по отношению к контролю в процентах (рассчитано по программе Image Studio Lite v.5.2.).

Fig. 3. Effect of ncRNA knockdown on the expression and activity of early HPV 16 genes in SiHa cells. а: the solid line is a scheme of the HPV16 early genes region (designations like in legend of Fig. 1); mRNA splicing variants are indicated by a bold line for exons and a thin line for introns, the coding potential of each variant is indicated on the right; the small gray rectangle – the position of examined mRNA region; numbers are the positions of all elements (bp) according to the HPV16 AF125673 (GenBank) sequence; S – transfection with the cocktail of oligonucleotides complementary to the sense chain of ncRNA; AS – transfection with the cocktail of oligonucleotides complementary to the antisense chain of ncRNA; Control – transfection without the addition of oligonucleotides, cDNA synthesized with hexamers; б, с – HPV16 RNA levels normalized regarding to the mRNA of the *HPRT* gene are indicated on the ordinate axis; б – the mRNA levels of the early genes; с – the levels of ncRNA. Statistical data – a paired t-test (the GraphPad Prism program, v.7.00); г – western blot analysis of p53 expression in cells. A typical transfection result is presented. GAPDH is a control of protein loading; the numbers over the blots indicate normalized p53 protein levels in relation to the control as percentage (calculated by Image Studio Lite Software, v.5.2.).

белков, статус белка p53 оценивали в клетках SiHa, трансфицированных ОН. Белок p53 является одним из ключевых супрессоров опухолей и ингибиторов клеточного цикла в клетках млекопитающих и основной мишенью онкобелка E6. Связывание E6 с p53 приводит к протеосомной деградации p53 [22], напротив, подавление E6 индуцирует накопление клеточного p53 и реактивацию дремлющего пути опухолевого супрессора [5]. Нокдаун смысловых транскриптов URR, который приводит к подавлению транскрипции E6/E7, сопровождается повышением уровня p53 (рис. 3 з). Нокдаун антисмысловых транскриптов URR и активация транскрипции E6/E7 снижают уровень белка p53. Эти результаты демонстрируют, что обработка клеток ОН комплементарными смысловым или антисмысловым транскриптами URR вызывает ожидаемые изменения уровня белка p53, мишени онкогена E6.

Эти результаты показывают, что некодирующие РНК, транскрибируемые в URR ВПЧ16, участвуют в регуляции экспрессии E6 и E7.

Определение нкРНК ВПЧ 16 в клинических образцах опухолей шейки матки методом ОТ-ПЦР

В клеточных линиях SiHa и CasKi геном ВПЧ16 интегрирован в геном клетки, что отражает только один из вариантов физического состояния вирусного генома в опухолях. В клетках опухоли ДНК вкВПЧ может присутствовать в трех формах: 1) интегративной, 2) эписомальной и 3) смешанной [23]. Вирусный геном находится под влиянием сайта интеграции: активный или неактивный хроматин, образование химерных транскриптов с использованием промоторов и сигналов полиаденилирования клеточных генов и т.д. В связи с этим, исследовали транскрипцию URR в клинических образцах ПЧК шейки матки с известным физическим статусом ДНК ВПЧ16 (рис. 1 з), представлены типичные результаты ОТ-ПЦР для двух разных сайтов URR). Транскрипты URR были обнаружены в 32 из 32 (100%) образцов карцином независимо от формы персистенции ДНК ВПЧ16 (таблица).

Принимая во внимание влияние сайтов интеграции на характер экспрессии вирусных генов, для подтверждения одновременного присутствия нкРНК и мРНК E6/E7 определили количество копий каждого

вида РНК в небольшой выборке клинических образцов методом ПЦР-РВ (рис. 4).

Уровни мРНК ранних генов были определены в области, где могут быть измерены все известные транскрипты с кодирующими потенциалами E6 и E7 (рис. 3 а). Одновременное присутствие обоих типов РНК было выявлено во всех исследованных группах опухолей с эписомной (4 образца), интегративной (4 образца) и смешанной (эп+инт, 3 образца) формами ДНК ВПЧ16. Количество обоих транскриптов сильно варьирует от образца к образцу, что, в частности, может быть результатом разного количества активных копий ДНК в клетках и разного процента опухолевых клеток в образцах. Как и ожидалось, количество копий транскрипта в URR в десятки и тысячи раз меньше, чем мРНК ранних генов. Значение отношения мРНК/нкРНК уникально для каждого образца, что указывает на независимую регуляцию экспрессии двух областей ВПЧ16.

Таким образом, впервые показано присутствие нкРНК ВПЧ16 в первичных опухолях шейки матки.

Обсуждение

В работе показано существование некодирующих РНК, которые двунаправленно транскрибируются в регуляторной области ВПЧ16 в клеточных линиях и первичных карциномах шейки матки. Обнаруженные нкРНК могут модулировать уровни экспрессии и активность онкобелков ВПЧ. Повышенная экспрессия E6 и E7 по сравнению с их экспрессией в инфицированном эпителии при нормальном жизненном цикле ВПЧ необходима для возникновения и существования опухоли [3]. Наличие нкРНК не только в клеточных линиях, но и во всех ВПЧ16-позитивных клинических образцах ПЧК шейки матки указывает на их необходимость для поддержания экспрессии онкогенов E6 и E7 и существования опухолей. Это естественная особенность ВПЧ16-позитивных опухолей. Таким образом, впервые показано наличие нкРНК в ВПЧ с регуляторной функцией в первичных опухолях шейки матки.

В отличие от микроРНК, пока не удалось выявить общий механизм действия для длинных нкРНК. Известно, что нкРНК могут действовать по цис- или транс-механизму. Цис-действующие нкРНК регули-

Таблица. Анализ экспрессии нкРНК ВПЧ16 в образцах опухолей шейки матки методом ОТ-ПЦР

Table. Analysis of HPV16 ncRNAs expression in the cervical tumors by RT-PCR

Форма генома ВПЧ16 в образце Form of HPV16 genome in a samples	Число образцов Number of samples	Число позитивных образцов Number of positive samples
Эписомальная Episomal	17	17
Интегративная Integrative	12	12
Смешанная (эписомальная + интегративная) Mixed (episomal + integrative)	3	3
Всего Total	32	32 (100%)

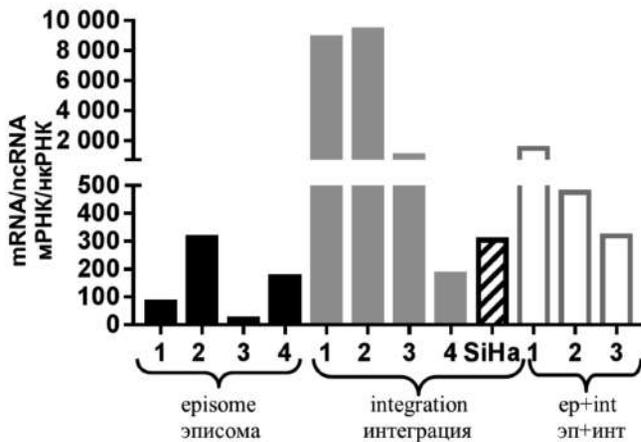


Рис. 4. Анализ уровней нкРНК и мРНК ранних генов ВПЧ16 в опухолях шейки матки. На оси ординат указано отношение числа копий мРНК к числу копий нкРНК. Количество копий каждого типа РНК рассчитано в 1 нг исходной тотальной РНК. Черные, серые и белые прямоугольники – образцы с эписомальной, интегративной и смешанной формой присутствия вирусной ДНК соответственно; заштрихованный прямоугольник – клеточная линия SiHa.

Fig. 4. Analysis of the levels of ncRNAs and mRNAs of early HPV16 genes in cervical tumors. The ratio of mRNA copy number to the ncRNA copy number of is indicated on the ordinate axis. The number of copies of each RNA type per 1 ng of initial total RNA was calculated. Black, gray, and white rectangles represent samples with episomal, integrated, and mixed forms of viral DNA, respectively; the shaded rectangle is the SiHa cell line.

руют экспрессию генов, расположенных вблизи их собственных сайтов транскрипции. Обнаружение нкРНК в образцах ПКТ шейки матки с эписомальной формой персистенции ДНК ВПЧ свидетельствует об их цис-действующем потенциале в регуляции экспрессии. Можно предполагать, что нкРНК функционируют в течение жизненного цикла вируса, когда в клетках присутствует только вирусная эписома, для тонкой регулировки экспрессии ранних генов на разных стадиях дифференцировки эпителия [4]. Точный механизм действия нкРНК ВПЧ16 еще предстоит определить.

Недавно для врВПЧ18 были обнаружены смысловые и антисмысловые транскрипты в районе URR в клеточных культурах РШМ [24]. Авторы показали, что смысловой транскрипт продолжается в районе гена *E6* и, следовательно, содержит открытые рамки считывания для белков и представляет собой мРНК с длинным нетранслируемым участком на 5'-конце. Авторы показали, что эти РНК участвуют в регуляции уровней экспрессии ранних генов ВПЧ18. Существование малокопийных мРНК с длинной 5'-нетранслируемой последовательностью, перекрывающей промотор, ранее было показано для клеточных генов (*NF-KB*, *CyclinD1* и др.) [25]. 5'-нетранслируемые промоторные участки этих клеточных мРНК необходимы для эпигенетического подавления транскрипции этих генов, т.е. такой механизм регуляции транскрипции существует в эукариотической клетке. Таким образом, для двух типов врВПЧ характерно на-

личие некодирующих транскриптов в URR, обладающих регуляторными функциями, но различающихся по механизмам образования и, по-видимому, использующих разные клеточные механизмы регуляции транскрипции. Исследования образования и активности нкРНК могут дать новое понимание о том, как эти и другие врВПЧ регулируют инфекцию и онкогенез.

Учитывая важность онкобелков врВПЧ в онкогенезе, обнаружение нкРНК может иметь клинические последствия. Присутствие вирусных нкРНК в опухолях шейки матки позволяет предположить, что они могут быть мишенью для разработки противовирусной терапии.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Forman D., de Martel C., Lacey C.J., Soerjomataram I., Lortet-Tieulent J., Bruni L., et al. Global burden of human papillomavirus and related. *Vaccine*. 2012; 30(Suppl. 5): F12–23. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.07.055>
- Doorbar J., Egawa N., Griffin H., Kranjec C., Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev. Med. Virol.* 2015; 25(Suppl. 1): 2–23. <https://doi.org/10.1002/rmv.1822>
- zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers – a brief historical account. *Virology*. 2009; 384(2): 260–5. <https://doi.org/10.1016/j.viro.2008.11.046>
- Fehrmann F., Laimins L.A. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*. 2003; 22(33): 5201–7. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206554>
- Goodwin E.C., DiMaio D. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97(23): 12513–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.23.12513>
- Goodwin E.C., Yang E., Lee C.J., Lee H.W., DiMaio D., Hwang E.S. Rapid induction of senescence in human cervical carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000; 97(20): 10978–83. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.20.10978>
- Magalidia T.G., Almsteda L.L., Belloneb S., Prevatt E.G., Santin A.D., DiMaio D. Primary human cervical carcinoma cells require human papillomavirus E6 and E7 expression for ongoing proliferation. *Virology*. 2012; 422(1): 114–24. <https://doi.org/10.1016/j.viro.2011.10.012>
- Wells S.I., Francis D.A., Karpova A.Y., Dowhanick J.J., Benson J.D., Howley P.M. E2 induces senescence in HPV-positive cells via pRB- and p21CIP-dependent pathways. *EMBO J*. 2000; 19(21): 762–71. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.21.5762>
- Prasanth K.V., Spector D.L. Eukaryotic regulatory RNAs: an answer to the ‘genome complexity’ conundrum. *Genes Dev*. 2007; 21(1): 11–42. <https://doi.org/10.1101/gad.1484207>
- Iwakiri D. Multifunctional non-coding Epstein-Barr virus encoded RNAs (EBERs) contribute to viral pathogenesis. *Virus Res*. 2016; 212: 30–8. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.08.007>
- Conrad N.K. New insights into the expression and functions of the Kaposi’s sarcoma-associated herpesvirus long noncoding PAN RNA. *Virus Res*. 2016; 212: 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.06.012>
- Klaes R., Woerner S.M., Ridder R., Wentzensen N., Duerst M., Schneider A., et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res*. 1999; 59(24): 6132–6.
- Fedorova M., Vinokurova S., Pavlova L., Komel’kov A., Korolenkova L., Kissel’ov F., et al. Human papillomavirus types 16 E1 mRNA is transcribed from P14 early promoter in cervical neoplasms. *Virology*. 2016; 488: 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.viro.2015.11.015>
- Szuhai K.V., Bezrookove V., Wiegant J., Vrolijk J., Dirks R.W., Rosenberg C., et al. Simultaneous molecular karyotyping and mapping of viral DNA integration sites by 25-color COBRA-FISH.

- Genes Chromosomes Cancer*. 2000; 28(1): 92–7. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2264\(200005\)28:1<92::aid-gcc11>3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2264(200005)28:1<92::aid-gcc11>3.0.co;2-2)
15. Meissner J.D. Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. *J. Gen. Virol.* 1999; 80(Pt. 7): 1725–33. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-7-1725>
 16. Beiter T., Reich E., Weigert C., Niess A.M., Simon P. Sense or antisense? False priming reverse transcription controls are required for determining sequence orientation by reverse transcription–PCR. *Anal. Biochem.* 2007; 369(2): 258–61. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.06.044>
 17. Matsui M., Prakash T.P., Corey D.R. Argonaute 2-dependent regulation of gene expression by single-stranded miRNA mimics. *Mol. Ther.* 2016; 24(5): 946–55. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.39>
 18. Seedorf K., Krämmer G., Dürst M., Suhai S., Röwekamp W.G. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*. 1985; 145(1): 181–5. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(85\)90214-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(85)90214-4)
 19. Patrushev L.I., Kovalenko T.F. Functions of noncoding sequences in mammalian genomes. *Biochemistry (Mosc.)*. 2014; 79(13): 1442–69. <https://doi.org/10.1134/S0006297914130021>
 20. Cripe T.P., Haugen T.H., Turket J.P., Tabatabai F., Schmid P.G. 3rd, Dürst M., et al. Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J.* 1987; 6(12): 3745–53. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02709.x>
 21. Melgar M.F., Collins F.S., Sethupathy P. Discovery of active enhancers through bidirectional expression of short transcripts. *Genome Biol.* 2011; 12(11): R113. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-11-r113>
 22. Scheffner M., Huibregtse J.M., Vierstra R.D., Howley P.M. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 1993; 75(3): 495–505. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90384-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90384-3)
 23. Melsheimer P., Vinokurova S., Wentzensen N., Bastert G., von Knebel Doeberitz M. DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 E6/E7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10(9): 3059–63. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-03-0565>
 24. Kassab M.A., Mudassir M., Singh A., Muthuraman N., Bhagat M., Palanichamy J.K., et al. Gene silencing and activation of human papillomavirus 18 is modulated by sense promoter associated RNA in bidirectionally transcribed long control region. *PLoS One*. 2015; 10(6): e0128416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128416>
 25. Han J., Kim D., Morris K.V. Promoter-associated RNA is required for RNA-directed transcriptional gene silencing in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104(30): 12422–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701635104>

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-114>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Штаммы диплоидных клеток лёгкого летучей мыши *Pipistrellus pipistrellus* и их перmissивность к орбивирусам (*Reoviridae: Orbivirus*) – возбудителям трансмиссивных болезней животных

Поволяева О.С., Чадаева А.А., Луницин А.В., Юрков С.Г.

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр вирусологии и микробиологии», 601125, Владимирская обл., п. Вольгинский, Россия

Введение. Культуры клеток летучих мышей являются востребованной моделью как для изоляции вирусов трансмиссивных болезней, так и для оценки возможной роли данных видов млекопитающих в формировании природных резервуаров переносчиков возбудителей арбовирусных инфекций.

Цель исследования. Получение и характеристика штаммов диплоидных клеток лёгкого летучей мыши *Pipistrellus pipistrellus*, оценка их перmissивности к вирусам блютанга, африканской чумы лошадей (АЧЛ), эпизоотической геморрагической болезни оленей (ЭГБО).

Материалы и методы. Культуры клеток лёгкого нетопыря-карлика получали методом стандартной ферментативной дезагрегации ткани доноров и селекцией клеток по адгезивным свойствам. Биологические свойства штаммов клеток изучены цитологическими, кариологическими методами. Перmissивность культур клеток определяли к орбивирусам блютанга, АЧЛ, ЭГБО.

Результаты. Диплоидные штаммы клеток (эпителиоподобного и фибробластоподобного типа), сохраняющие цитоморфологические характеристики и стабильность кариотипа, получены из ткани лёгкого нетопыря-карлика *Pipistrellus pipistrellus*. Установлена их перmissивность к вирусам рода *Orbivirus* семейства *Reoviridae* возбудителям трансмиссивных заболеваний животных. Паспортизированные штаммы диплоидных клеток чувствительны к орбивирусам блютанга, АЧЛ, ЭГБО. Инфекционная активность вирусов в эпителиоподобной культуре клеток соответствовала активности в референтных культурах Vero и CV-1. Фибробластоподобная культура клеток была менее перmissивна к вирусам блютанга и ЭГБО, однако накопление вируса АЧЛ было выше на $1,52,0 \text{ Ig TЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Обсуждение. Перmissивность полученных штаммов клеток лёгкого летучей мыши *Pipistrellus pipistrellus* к вирусам блютанга, АЧЛ, ЭГБО согласуется с данными изоляции орбивирусов у летучих мышей видов *Pteropus poliocephalus*, *Pteropus hypomelanus*, *Rousettus aegyptiacus leachii*, *Syconycteris crassa*, *Myotis macrodactylus*, *Eidolon helvum*.

Заключение. Штаммы диплоидных клеток лёгкого нетопыря-карлика перmissивны к орбивирусам блютанга, АЧЛ, ЭГБО, что позволяет рекомендовать их для изоляции этих вирусов, а вид *Pipistrellus pipistrellus* рассматривать как потенциальный природный резервуар и переносчик возбудителей данных трансмиссивных болезней.

Ключевые слова: орбивирус; летучие мыши; штамм диплоидных клеток; трансмиссивные болезни

Для цитирования: Поволяева О.С., Чадаева А.А., Луницин А.В., Юрков С.Г. Штаммы диплоидных клеток лёгкого летучей мыши *Pipistrellus pipistrellus* и их перmissивность к орбивирусам (*Reoviridae: Orbivirus*) – возбудителям трансмиссивных болезней животных. *Вопросы вирусологии.* 2022; 67(3): 227–236. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-114>

Для корреспонденции: Юрков Сергей Григорьевич, д-р биол. наук, профессор, главный научный сотрудник Федерального исследовательского центра вирусологии и микробиологии, 601125, Владимирская обл., п. Вольгинский, Россия. E-mail: patronn13@rambler.ru

Участие авторов: Поволяева О.С. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Чадаева А.А. – проведение экспериментов; Луницин А.В. – сбор, анализ и интерпретация данных; Юрков С.Г. – концепция и дизайн исследования, проведение экспериментов, сбор, анализ и интерпретация данных, подготовка текста, окончательное одобрение статьи к публикации.

Финансирование. Работа выполнена в рамках бюджетного финансирования.

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

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен этическим комитетом организации (протокол № 7 от 05.08.2020).

Поступила 05.05.2022
Принята в печать 02.06.2022
Опубликована 30.06.2022

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-114>

Dwarf bat's (*Pipistrellus pipistrellus*) lung diploid cell strains and their permissivity to orbiviruses (*Reoviridae: Orbivirus*) – pathogens of vector-borne animal diseases

Olga S. Povolyaeva, Anna A. Chadaeva, Andrey V. Lunitsin, Sergey G. Yurkov

Federal Research Center for Virology and Microbiology, 601125, Vladimir region, Volginsky, Russia

Introduction. Bat cell cultures are a popular model both for the isolation of vector-borne disease viruses and for assessing the possible role of these mammalian species in forming the natural reservoirs of arbovirus infection vectors. The goal of the research was to obtain and characterize strains of diploid lung cells of the bat (*Pipistrellus pipistrellus*) and evaluate their permissivity to bluetongue, African horse sickness (AHS), and epizootic hemorrhagic disease of deer (EHD) viruses.

Materials and methods. Cell cultures of the dwarf bat's lung were obtained by standard enzymatic disaggregation of donor tissue and selection of cells for adhesive properties. The permissivity of cell cultures was determined to bluetongue, AHL, and EHD orbiviruses.

Results. Diploid cell strains (epithelium-like and fibroblast-like types) retaining cytomorphological characteristics and karyotype stability were obtained from tissue of the bat's lung. Their permissivity to viruses of the genus *Orbivirus* of the *Reoviridae* family, pathogens of transmissible animal diseases, has been established.

Discussion. The permissivity of the obtained strains of bat's lung cells to bluetongue, AHL, and EHD viruses is consistent with the isolation of orbiviruses in bats of the species *Pteropus poliocephalus*, *Pteropus hypomelanus*, *Rousettus aegyptiacus leachii*, *Syconycteris crassa*, *Myotis macrodactylus*, and *Eidolon helvum*.

Conclusion. Strains of diploid lung cells of the dwarf bat are permissive to orbiviruses of bluetongue, AHS, and EHD, which allows us to recommend them for the isolation of these viruses, and the species *Pipistrellus pipistrellus* to be considered as a potential natural reservoir and carrier of pathogens of these vector-borne diseases.

Keywords: orbivirus; bats; diploid cell strain; vector-borne diseases

For citation: Povolyaeva O.S., Chadaeva A.A., Lunitsin A.V., Yurkov S.G. Dwarf bat's (*Pipistrellus pipistrellus*) lung diploid cell strains and their permissivity to orbiviruses (*Reoviridae: Orbivirus*) – pathogens of vector-borne animal diseases. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(3): 227–236. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-114>

For correspondence: Sergey G. Yurkov, Dr. Sci. Biol., Professor, Chief Researcher, Federal Research Center for Virology and Microbiology, 601125, Vladimir region, Russia. E-mail: patronn13@rambler.ru

Information about the authors:Povolyaeva O.S., <https://orcid.org/0000-0002-5635-6677>Chadaeva A.A., <https://orcid.org/0000-0002-9615-9758>Lunitsin A.V., <https://orcid.org/0000-0002-5043-446X>Yurkov S.G., <https://orcid.org/0000-0002-6801-9424>

Contribution: Povolyaeva O.S. the study concept and design, conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, preparing of the text; Chadaeva A.A. – conducting of the experiments; Lunitsin A.V. – collection, analysis and interpretation of the data; Yurkov S.G. – the study concept and design, conducting of the experiments, collection, analysis and interpretation of the data, preparing of the text, final approval of the article for publication.

Funding. The research was funded by the State budget.

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

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 23 July 2010). The research protocol was approved by the ethics committee of the institution (Protocol No 7 dated 05.08.2020).

Received 05 May 2022

Accepted 02 June 2022

Published 30 June 2022

Введение

Арбовирусные инфекции занимают существенное положение в структуре вирусной патологии млекопитающих. Возбудители векторных заболеваний наносят значительный экономический урон сельскохозяйственным животным [1], а трансмиссивные болезни людей составляют более 17% всех инфекционных болезней,

от которых ежегодно умирает более 700 тыс человек [2]. Патогены рода *Orbivirus* семейства *Reoviridae*, относящиеся к группе арбовирусов, включают как ряд вирусов, вызывающих респираторные, лихорадочные и неврологические болезни человека с явлениями поражения центральной нервной системы [3], так и важных в эпидемическом отношении возбудителей болезней сельскохозяйственных животных: блютанга (BTV),

африканской чумы лошадей (AHSV, АЧЛ), эпизоотической геморрагической болезни оленей (EHNV, ЭГБО), перуанской чумы лошадей (PHSV), которые передаются насекомыми-гематофагами [4–6].

Риск возникновения вспышек трансмиссивных болезней определяется наличием природных резервуаров патогена и векторных переносчиков возбудителей.

Установлено, что летучие мыши являются одним из важных природных резервуаров вирусов многих семейств [7], таких как *Filoviridae* [8], *Coronaviridae* [9, 10], *Rhabdoviridae* [11], *Herpesviridae*, *Adenoviridae* [12], *Paramyxoviridae* [13], *Astroviridae* и [14] а также *Reoviridae*, включая род *Orbivirus* [15, 16].

В европейских странах обитает более 40 видов летучих мышей, которые являются насекомоядными. Они питаются мухами, комарами, мокрецами, многие из которых рассматриваются потенциальными векторами возбудителей особо опасных вирусных болезней животных [17]. Установлено, что одна летучая мышь массой 40 г в течение часа охоты съедает от 200 до 600 насекомых, что составляет до 30 г корма [18].

L.C. La Motte Jr [19] продемонстрировал, что летучие мыши могут заражаться вирусом японского энцефалита, входящим в экологическую группу арбовирусов, при скармливании им инфицированных комаров, и в эксперименте воспроизвел передачу вируса в цикле «комары – летучие мыши комары». Также эти исследования показали чувствительность к вирусу летучих мышей видов *Eptesicus fuscus*, *Myotis lucifugus*, *Pipistrellus subflavus* и способность инфицированных животных поддерживать латентный вирус в условиях имитации гибернации в течение 107 дней.

Приведённые данные позволяют рассматривать насекомоядных летучих мышей как вероятную экологическую нишу и резервуар прежде всего возбудителей арбовирусных инфекций.

Передача патогенов от летучих мышей к млекопитающим может происходить при прямом контакте с животными, через контаминированные секретами и экскретами летучих мышей кормовые продукты (плоды, растения) и иные объекты (места пребывания) или через переносчиков [20, 21]. Распространение вируса летучими мышами возможно с заражением промежуточных хозяев [22].

В то же время отмечены значительные трудности в выделении вирусов от летучих мышей в культурах клеток [23–25]. Для изоляции вирусных патогенов от представителей различных семейств млекопитающих более эффективны культуры клеток, полученные из тканей, содержащих клетки-мишени, в видовом отношении соответствующие носителю вируса.

Первичные и перевиваемые культуры клеток из тканей летучих мышей получены в основном от видов, обитающих в тропических и субтропических зонах всех континентов, а их чувствительность изучена к вирусам зоонозных инфекций человека [26, 27]. Ранее нами показана перmissивность штамма диплоидных клеток почки лесного нетопыря к вирусам различных таксономических групп – возбудителям болезней животных [28].

Вспышки трансмиссивных заболеваний животных – блютанга, ЭГБО, АЧЛ, относящихся к роду *Orbivirus*, основным переносчиком возбудителей которых являются мокрецы из рода *Culicoides*, а также комары, москиты и некоторые виды клещей, – за последние три года регистрировались в странах Европы (Швейцария, Испания, Португалия, Италия, Германия, Франция, Бельгия, Сербия, Румыния, Северная Македония, Люксембург, Греция, Хорватия, Болгария, Босния и Герцеговина, Албания, Черногория), Азии (Израиль) и Африки (Тунис, Эфиопия, Алжир) [29].

Совпадение ареалов распространения и миграции нетопыря-карлика и территорий, неблагоприятных по приведённым выше векторным болезням животных, определяют актуальность цели наших исследований – получение диплоидных штаммов клеток лёгкого летучих мышей вида *Pipistrellus pipistrellus* и изучение их перmissивности к ряду вирусов рода *Orbivirus* возбудителей трансмиссивных вирусных заболеваний животных.

Материалы и методы

Животные. В качестве доноров лёгкого отобранны клинически здоровые летучие мыши вида нетопырь-карлик (*Pipistrellus pipistrellus*), отловленные при помощи туман-сети в августе в Ростовской области.

Культуры клеток. В работе использовали полученные штаммы диплоидных культур клеток лёгкого нетопыря-карлика diploid cell line *Pipistrellus pipistrellus lung ep.* и diploid cell line *Pipistrellus pipistrellus lung f.*, а также референтные перевиваемые линии клеток почки африканской зелёной мартышки Vero и CV-1 из коллекции клеточных культур Федерального исследовательского центра вирусологии и микробиологии (ФГБНУ ФИЦВиМ, п. Вольгинский) [30].

Вирусы. Перmissивность клеточных культур определяли к следующим вирусам семейства *Reoviridae* рода *Orbivirus*:

- вирус блютанга 1-го серотипа с инфекционной активностью (ИА) в перевиваемой линии клеток почки африканской зелёной мартышки Vero 6,25 lg ТЦД₅₀/см³;
- вирус ЭГБО, штамм Альберто с ИА 6,25 ± 0,25 lg ТЦД₅₀/см³ в перевиваемой линии клеток почки африканской зелёной мартышки CV-1;
- вирус АЧЛ 1-го серотипа на уровне 5-го пассажа в перевиваемой линии клеток CV-1 с ИА 5,75 lg ТЦД₅₀/см³.

Используемые штаммы вирусов получали из Государственной коллекции микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в том числе зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных (реестровый номер центра коллективного пользования – 441429)¹.

¹Государственная коллекция микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в том числе зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных. URL: <http://ckp-rg.ru/ckp/441429/>

Питательные среды и растворы. Среда Игла MEM (Minimum Essential Medium), Dulbecco's MEM (DMEM), DMEM/F12 (1 : 1), McCoy's 5A, приготовленные из сухих концентратов производства HyClone и Sigma (США). Фетальная сыворотка крови крупного рогатого скота (КРС) производства HyClone (США) и Biological Industry (Израиль). Забуференный фосфатом физиологический раствор (рН 7,4), солевой раствор Эрла, дистиллированная вода, 0,25% раствор трипсина, 0,02% раствор Версена, диметилсульфоксид (Sigma, США).

Первичную культуру клеток готовили методом стандартной трипсинизации ткани в растворе 0,25% трипсина и 0,02% Версена в соотношении 1 : 1 при температуре 35–37°C. Субкультивирование культур клеток и установление штаммов диплоидных клеток проводили методом последовательных пересевов.

Кариологическое изучение полученных культур клеток проводили по методике, предложенной С.Е. Ford, J.L. Hamerton [31] и К.Н. Rothfels, L. Siminovitch [32]. Препараты исследовали при помощи световой микроскопии, проводя подсчёт числа хромосом в метафазных пластинках в 50 клетках каждой культуры.

Чувствительность культур клеток лёгкого летучих мышей к вирусам трансмиссивных инфекционных болезней животных, относящиеся к семейству *Reoviridae*, оценивали по скорости и интенсивности развития цитопатического действия (ЦПД) в первом пассаже с определением ИА полученного вирусного материала в перевиваемых линиях клеток, к которым данные патогены были адаптированы ранее. Определение перmissивности полученных клеток к исследуемым вирусам проводили с использованием множественности заражения 0,01–0,001 ТЦД₅₀/кл, адсорбции вируса в течение 60 мин и инкубировании инфицированных культур при 37,0 ± 0,5°C до развития выраженного ЦПД.

ИА вируса определяли путём титрования в перmissивных для каждого вируса референтных культурах



Рис. 1. Летучая мышь вида нетопырь-карлик (*Pipistrellus pipistrellus*).

Fig. 1. The dwarf bat (*Pipistrellus pipistrellus*).

клеток, учитывали развитие ЦПД. Титр вируса рассчитывали по методике Рида и Менча в модификации Ашмарина.

Результаты

Эвтаназию летучих мышей вида *Pipistrellus pipistrellus* (**рис. 1**) проводили внутрибрюшинным введением 500 мкл 70% этилового спирта и цервикальной дислокацией шейных позвонков [33]. Данная процедура соответствует российскому законодательству и одобрена Комиссией по биоэтике ФГБНУ ФИЦВиМ как отвечающая требованиям Директивы Европейского Парламента 2010/63/EU [34].

Летучих мышей вскрывали и извлекали лёгкие, которые помещали в ёмкости с солевым раствором Эрла с добавлением антибиотиков (20 мкг/мл ципрофлоксацина и 5 мкг/мл амфотерицина В). Ткань лёгких механически измельчали на фрагменты размером около 2–3 мм³, отмывали от крови солевым раствором Эрла и проводили стандартную трипсинизацию. Объединенную клеточную суспензию центрифугировали при 700 g в течение 10 мин, затем диспергирующую смесь декантировали, осадок клеток ресуспендировали в 25 см³ ростовой среды. При посевной концентрации 375 ± 25 тыс. клеток/см³ и жизнеспособности клеток по тесту витального окрашивания трипановым синим на уровне 82–84% формирование конфлюэнтного монослоя клеток отмечено на 6-е сутки культивирования (**рис. 2**).

Последовательные пассажи клеточной культуры с коэффициентом посева 1 : 2 осуществляли с использованием питательной среды DMEM с добавлением 10% фетальной сыворотки крови КРС. При посевной концентрации 135 ± 15 тыс. клеток/см³ конфлюэнтный монослой формировался на 3–5-е сутки культивирования. Субкультура клеток лёгкого была представлена фибробластоподобными клеточными

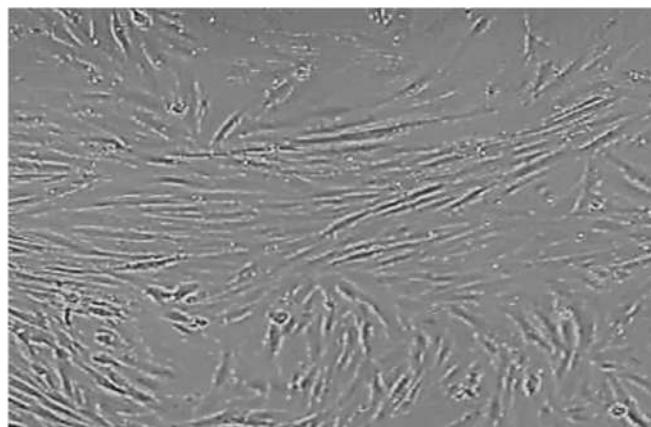


Рис. 2. Первично-трипсинизированная культура клеток лёгкого летучей мыши *Pipistrellus pipistrellus* через 144 ч культивирования (микрофотография, увеличение ×100).

Fig. 2. Primary trypsinized cell culture of *Pipistrellus pipistrellus* lung after 144 hs of cultivation (microphotograph, magnification ×100).

элементами, содержащими ядра овальной формы с 13 округлыми ядрышками, варьирующими по размеру. Ядерный матрикс гомогенный. В монослойной культуре присутствовали в незначительном количестве эпителиоподобные клетки, формирующие отдельные островки роста. Проллиферативная активность клеток с увеличением пассажного уровня возрастала, культура уплотнялась, формировала разнонаправленные потоки.

При пересеве культуры отмечено, что при обработке клеточного монослоя смесью трипсина и Версена 1 : 3 в первую очередь отслаивались фибробластоподобные клетки. Для снятия эпителиоподобных клеток требовалась более продолжительная экспозиция в диспергирующем растворе. Также пролиферативный потенциал фибробластоподобных клеток был более высокий, что приводило к значительному увеличению их доли в пассажных уровнях. В связи с этим селекцией по адгезивным и ростовым свойствам с использованием низких посевных концентраций культура клеток лёгочной ткани нетопыря-карлика на уровне 27-го пассажа была разделена на две клеточные субпопуляции, отличающиеся по фенотипу:

фибробластоподобные и эпителиоподобные. В дальнейшем две эти популяции сохраняли данные цитоморфологические характеристики до начала периода старения (рис. 3).

Кариологический анализ клеток лёгкого нетопыря-карлика на уровне 33-го пассажа подтвердил видовую принадлежность полученных культур. В условиях непрерывного культивирования обе культуры показали стабильность кариотипа, который сохранял как диплоидный набор хромосом ($2n = 42$, $NFa = 50$), так и отсутствие хромосомных перестроек и образования маркерных хромосом (рис. 4).

Оптимизация среды культивирования клеток лёгкого нетопыря-карлика показала, что среды DMEM/F12 и McCoys обеспечивали более высокие пролиферативные показатели культуры при равной цитоморфологической картине монослоя. При этом срок формирования конфлюэнтного монослоя и индекс пролиферации у них были выше, чем в среде DMEM. Для дальнейшего использования была выбрана среда DMEM/F12.

По совокупности цитоморфологических, ростовых и кариологических показателей клеточные культуры

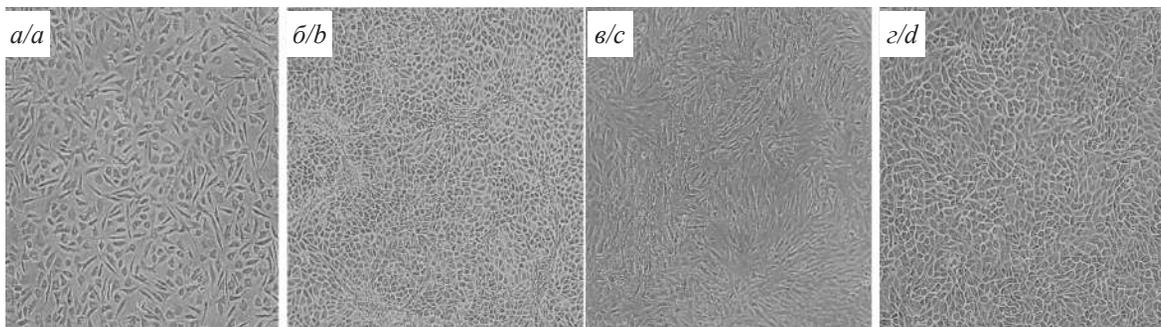


Рис. 3. Монослой культуры клеток лёгкого *Pipistrellus pipistrellus*: а – диплоидный штамм культуры, 15-й пассаж; б – смешанная культура, 27-й пассаж; в – диплоидный штамм культуры клеток фибробластоподобного типа, 32-й пассаж; г – диплоидный штамм культуры клеток эпителиоподобного типа, 32-й пассаж (микрофотография, увеличение $\times 150$).

Fig. 3. Monolayer of cell culture of *Pipistrellus pipistrellus* lung: а – diploid culture strain, 15th passage level; б – mixed culture, 27th passage level; в – diploid cell culture strain of fibroblast-like type, 32th passage level; г – diploid cell culture strain of epithelial-like type, 32th passage level (microphotograph, magnification $\times 150$).

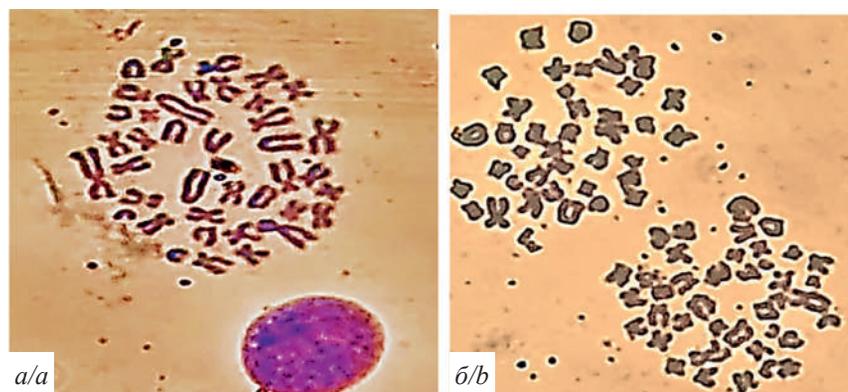


Рис. 4. Метафазные пластинки культуры клеток лёгкого *Pipistrellus pipistrellus*: а – эпителиоподобных клеток; б – фибробластоподобных клеток (микрофотография, увеличение $\times 900$).

Fig. 4. Metaphase plate of the cell culture of *Pipistrellus pipistrellus* lung: а – epithelial-like cells; б – fibroblast-like cells (microphotograph, magnification $\times 900$).

P. pipistrellus lung f. и *P. pipistrellus lung ep.* соответствовали определению диплоидного штамма и получили наименования «Штамм диплоидных эпителиоподобных клеток лёгкого нетопыря-карлика (Diploid cell line *Pipistrellus pipistrellus lung ep.*)» и «Штамм диплоидных фибробластоподобных клеток лёгкого нетопыря-карлика (Diploid cell line *Pipistrellus pipistrellus lung f.*)» соответственно. Полученные культуры клеток криоконсервированы в жидком азоте на различных пассажных уровнях. Жизнеспособность данных культур клеток после размораживания по тесту витального окрашивания трипановым синим составила 74–92%.

Во второй фазе (активной пролиферации) диплоидные штаммы клеток находились до уровня 43-го пассажа культуры фибробластоподобного типа и до 47-го пассажного уровня культуры эпителиоподобного типа. При коэффициентах пересева 1 : 2–1 : 3 в оптимизированной среде (DMEM/F12 90% и FBS 10%) клетки формировали конфлюэнтный монослой через 48 ч культивирования. Отмечено, что культура фибробластоподобного типа сохраняла без смены среды типичную морфологию и отсутствие проявлений цитопатического эффекта, вызванного возможными эндогенными вирусами, и признаков дегенерации клеток в течение 28 дней, а культура эпителиоподобного типа сохраняла те же характеристики в течение 35 дней.

Бактериологический контроль клеточных расплодок обеих культур показал отсутствие контаминации бактериями, грибами и микоплазмами. Возможные экзогенные вирусные контаминанты (пестивирусы диареи КРС и классической чумы свиней), источником которых могут быть сыворотки крови и трипсин, методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени не выявлены.

При изучении перmissивности штаммов диплоидных клеток лёгкого летучих мышей к вирусу блютанга 1-го серотипа на 2-е сутки отмечены начальные признаки ЦПД в культуре клеток diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.* в виде округления клеток. На 3-и сутки в культуре наблюдали отслоение и лизис инфицированных клеток, сопровождающийся деструкцией клеточного монослоя.

В культуре diploid cell line *P. pipistrellus lung f.* ЦПД вируса проявлялось на 6-е сутки с округлением кле-

ток, разрежением монослоя и отслоением клеток. В контрольных интактных (неинфицированных) культурах изменений клеточного монослоя не наблюдали.

Результаты определения ИА вируса блютанга, полученного в культуре клеток diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.*, сопоставимы с активностью вируса в контрольной культуре инфицированных перmissивных клеток почки африканской зелёной марышки (Vero), в которой отмечено развитие характерного ЦПД с активностью вируса $6,31 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$.

Вирусрепродуцирующая активность diploid cell line *P. pipistrellus lung f.* в отношении вируса блютанга была на два логарифма ниже, и срок развития ЦПД также отставал.

Характер развития ЦПД вируса блютанга в штаммах диплоидных клеток лёгкого *Pipistrellus pipistrellus* представлен на **рис. 5**.

При изучении чувствительности культур исследуемых штаммов диплоидных клеток к вирусу ЭГБО на 2-е сутки в культурах клетках diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.* и diploid cell line *P. pipistrellus lung f.* отмечен лизис отдельных клеток монослоя. ЦПД вируса в diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.* выражалось в очаговой деструкции и отслоении клеток на 3-й день, а в культуре клеток diploid cell line *P. pipistrellus lung f.* на 4-й день после заражения. Характер развития ЦПД вируса ЭГБО в штаммах диплоидных клеток лёгкого летучих мышей представлен на **рис. 6**.

В контрольной культуре инфицированных референтных перmissивных клеток CV-1 отмечено развитие характерного ЦПД с накоплением вируса до титров ИА $6,38 \pm 0,08 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, тогда как в diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.* она составила $5,69 \pm 0,22 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$, а в diploid cell line *P. pipistrellus lung f.* она была ниже $4,56 \pm 0,07 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ и ЦПД развивалось на сутки позже.

Это указывает на то, что культуры клеток одного тканевого происхождения (лёгочная ткань), но представленные разным фенотипом клеток (эпителиоподобные и фибробластоподобные), обладали различной перmissивностью к исследуемому вирусу.

Изучение чувствительности штаммов диплоидных клеток к вирусу АЧЛ показало, что развитие ЦПД вируса в культуре клеток diploid cell line *P. pipistrellus lung f.*

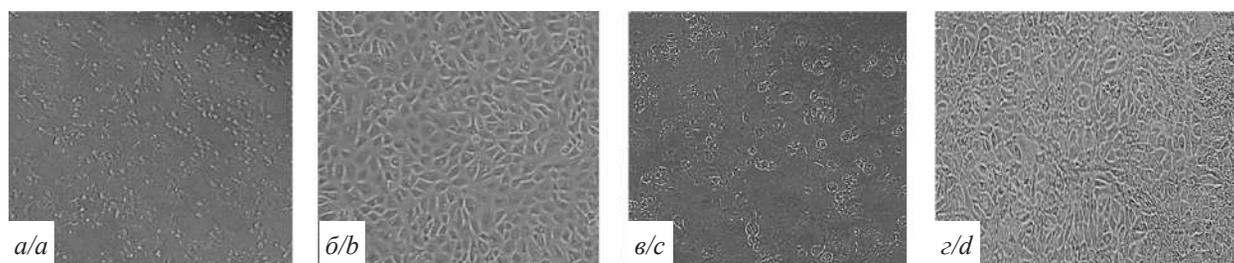


Рис. 5. Цитопатическое действие вируса блютанга: *a* – в культуре diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.*, 33-й пассаж, на 3-и сутки; *b* – контроль diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.*, 33-й пассаж; *c* – в культуре diploid cell line *P. pipistrellus lung f.*, 32-й пассаж, на 6-е сутки; *d* – контроль diploid cell line *P. pipistrellus lung f.*, 32-й пассаж (микрофотография, увеличение $\times 150$).

Fig. 5. Cytopathic effect of BTV: *a* – in the culture of diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.*, 33th passage level, on the third day; *b* – control diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.*, 33th passage level; *c* – in the culture of diploid cell line *P. pipistrellus lung f.*, 32th passage level, sixth day; *d* – diploid cell line control *P. pipistrellus lung f.*, 32th passage level (microphotograph, magnification $\times 150$).

проявлялось на 1-е сутки в виде лизиса клеток и разрывание монослоя. В культуре клеток diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.* цитопатический эффект вируса АЧЛ, сопровождающийся округлением и отслоением инфицированных клеток от подложки с деструкцией клеточного монослоя, отмечали через 72 ч (рис. 7).

ИА вирусного материала, полученного в diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.*, при титровании в перmissive культуре клеток CV-1 составила $5,75 \pm 0,18 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$. Фибробластоподобная культура клеток лёгкого была более перmissive к вирусу, в которой он накапливался на 1,52 логарифма выше ($7,25 \pm 0,17 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$), а ЦПД развивалось в течение 24 ч после инокуляции вируса. В контрольной культуре инфицированных перmissive клеток CV-1 активность вируса составляла $5,69 \pm 0,14 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{см}^3$ (таблица).

Обсуждение

Арбовирусные инфекции, включая болезни сельскохозяйственных животных, вызываемые представителями рода *Orbivirus*, представляют постоянный риск заноса и распространения. Идентификация реовирусов и новых патогенов этого семейства у летучих

мышей свидетельствует о высоком уровне перmissiveности клеток тканей и органов представителей *Microchiroptera* [35].

Роль летучих мышей, обитающих и мигрирующих в Российской Федерации с включением в ареал распространения территории сопредельных стран, неблагополучных по трансмиссивным болезням млекопитающих, недостаточно изучена. Культуры клеток из тканей летучих мышей являются наиболее востребованной лабораторной моделью для первичной изоляции и изучения вирусов, ассоциированных с отрядом рукокрылых. Полученные нами штаммы диплоидных клеток лёгкого нетопыря-карлика *Pipistrellus pipistrellus* обладали стабильными цитоморфологическими, пролиферативными и кариологическими характеристиками, что позволило создать крупные криобанки клеток для проведения долговременных вирусологических исследований.

Результаты исследований показали репродукцию орбовирусов возбудителей трансмиссивных инфекций сельскохозяйственных животных с развитием цитопатического эффекта в клетках полученных штаммов диплоидных клеток лёгкого летучих мы-

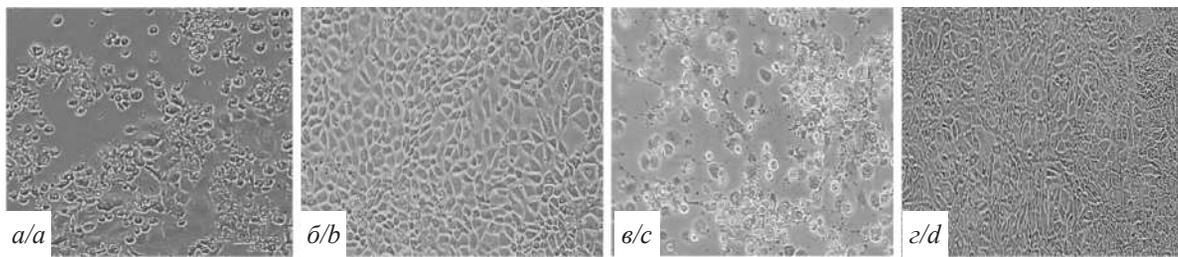


Рис. 6. Цитопатическое действие вируса эпизоотической геморрагической болезни оленей: *a* – в культуре diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.*, 33-й пассаж, на 2-е сутки; *б* – контроль diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.*, 33-й пассаж; *в* – в культуре diploid cell line *P. pipistrellus lung f.*, 32-й пассаж, на 3-и сутки; *г* – контроль diploid cell line *P. pipistrellus lung f.*, 32-й пассаж (микрофотография, увеличение $\times 150$).

Fig. 6. Cytopathic effect of EHDV: *a* – in the culture of diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.*, 33th passage level, on the second day; *b* – control diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.*, 33th passage level; *c* – in the culture of diploid cell line *P. pipistrellus lung f.*, 32th passage level, on the third day; *d* – diploid cell line control *P. pipistrellus lung f.*, 32th passage level (microphotograph, magnification $\times 150$).

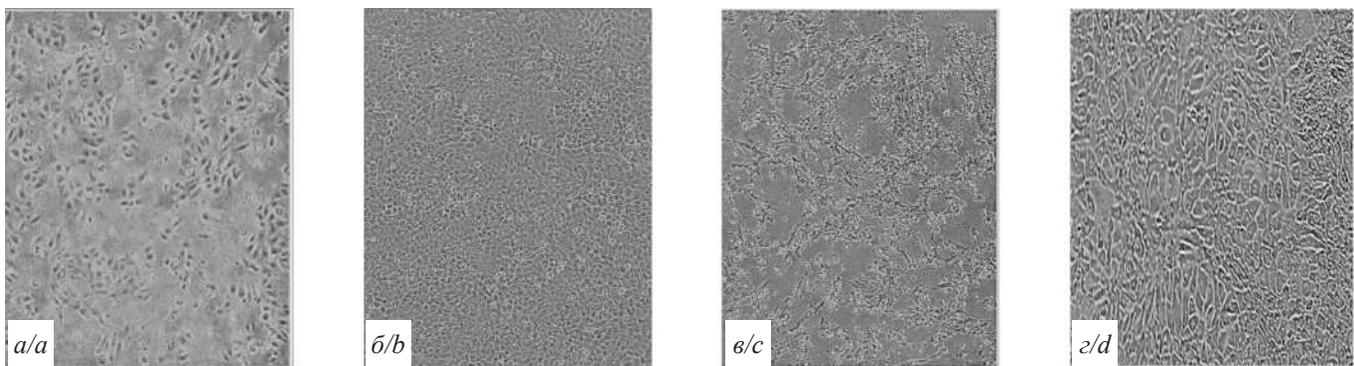


Рис. 7. Цитопатическое действие вируса африканской чумы лошадей: *a* – в культуре diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.*, 32-й пассаж, на 3-и сутки; *б* – контроль diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.*, 32-й пассаж; *в* – в культуре diploid cell line *P. pipistrellus lung f.*, 32-й пассаж, на 3-и сутки; *г* – контроль diploid cell line *P. pipistrellus lung f.*, 32-й пассаж (микрофотография, увеличение $\times 150$).

Fig. 7. Cytopathic effect of African horse sickness virus: *a* – in the culture of diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.*, 32th passage level, on the third day; *b* – control diploid cell line *P. pipistrellus lung ep.*, 32th passage level; *c* – in the culture of diploid cell line *P. pipistrellus lung f.*, 32th passage level, for the first day; *d* – diploid cell line control *P. pipistrellus lung f.*, 32th passage level (microphotograph, magnification $\times 150$).

Таблица. Оценка перmissивности штаммов диплоидных культур клеток лёгкого нетопыря-карлика к реовирусам (n = 4)

Table. Sensitivity of the diploid cell line *P. pipistrellus lung* to viruses of the *Reoviridae* family (n = 4)

№	Вирус, семейство Virus, family	Сроки ЦПД (сутки) / Инфекционная активность в культурах клеток (lg ПЦД ₅₀ /см ³) Time frame of cytopathic action (day) / Infection activity in cell culture (lg TCID ₅₀ /ml ³)		
		diploid cell line <i>P. pipistrellus lung ep.</i>	diploid cell line <i>P. pipistrellus lung f.</i>	контрольная (референтная) культура клеток control (reference) cell culture
1	Блютанг, <i>Reoviridae</i> Bluetongue, <i>Reoviridae</i>	3 / 6,06 ± 0,18	6 / 4,06 ± 0,14	6,0–6,5 (Vero)
2	ЭГБО, <i>Reoviridae</i> EHD, <i>Reoviridae</i>	2 / 5,69 ± 0,22	3 / 4,56 ± 0,07	3 / 6,0–6,5 (CV-1)
3	АЧЛ, <i>Reoviridae</i> AHS, <i>Reoviridae</i>	3 / 5,75 ± 0,18	1 / 7,25 ± 0,17	3 / 5,5–6,0 (CV-1)

Примечание. АЧЛ – африканская чума лошадей, ЭГБО – эпизоотическая геморрагическая болезнь оленей, ЦПД – цитопатическое действие.

Note. AHS – African horse sickness, EHD – epizootic hemorrhagic disease of deer, TCID – tissue culture infectious dose.

шей вида нетопырь-карлик без предварительной адаптации вирусов к клеткам. ИА вируса АЧЛ в фибробластоподных клетках значительно превышала активность как в культуре клеток лёгкого эпителио-подобного типа, так и в перевиваемой линии клеток CV-1, к которой данный штамм вируса был адаптирован ранее. Данные по перmissивности клеток из тканей представителей отряда рукокрылых к орбивирусам позволяют рассматривать вид *Pipistrellus pipistrellus* как возможный природный резервуар этих патогенов и его непосредственное участие в эпидемическом процессе.

Выводы

1. Впервые получены и паспортизированы штаммы диплоидных клеток из тканей лёгкого нетопыря-карлика *P. pipistrellus lung f.* и *P. pipistrellus lung ep.* Созданы криобанки клеточных штаммов на разных пассажных уровнях для вирусологических исследований.

2. Установлена перmissивность полученных штаммов диплоидных клеток лёгкого нетопыря-карлика к вирусам блютанга, ЭГБО и АЧЛ, что позволяет рекомендовать данные клеточные системы для первичной изоляции вирусных патогенов.

3. Репродукция вирусов рода *Orbivirus* возбудителей трансмиссивных болезней сельскохозяйственных животных в культурах клеток лёгкого нетопыря-карлика *Pipistrellus pipistrellus* указывает на возможность участия представителей данного вида в эпидемическом процессе в качестве переносчика возбудителя или промежуточного хозяина при формировании природных резервуаров инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

- Narladkar B.W. Projected economic losses due to vector and vector-borne parasitic diseases in livestock of India and its significance in implementing the concept of integrated practices for vector management. *Vet. World*. 2018; 11(2): 151–60. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.151-160>
- ВОЗ. Трансмиссивные болезни: Информационный бюллетень; 2020. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
- Еремян А.А., Львов Д.К., Щетинин А.М., Дерябин П.Г., Аристова В.А., Гительман А.К. и др. Генетическое разнообразие

вирусов вида *Chenuda virus* (*Orbivirus*, *Reoviridae*), циркулирующих в Средней Азии. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(2): 81–6. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-81-86>

- Maclachlan N.J., Guthrie A.J. Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other orbivirus diseases. *Vet. Res.* 2010; 41(6): 35. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010007>
- Львов Д.К., Алексеев К.П., Алимбарова Л.М., Алипер Т.И., Альховский С.В., Андропова В.Л. и др. *Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. Руководство по вирусологии*. М.; МИА; 2013.
- Attoui H., Mohd Jaafar F. Zoonotic and emerging orbivirus infections. *Rev. Sci. Tech.* 2015; 34(2): 353–61. <https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2362>
- Calisher C.H., Childs J.E., Field H.E., Holmes K.V., Schountz T. Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19(3): 531–45. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06>
- Leroy E.M., Kumulungui B., Pourrut X., Rouquet P., Hassanin A., Yaba P., et al. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*. 2005; 438(7068): 575–6. <https://doi.org/10.1038/438575a>
- Lau S.K., Woo P.C., Li K.S., Huang Y., Tsoi H.W., Wong B.H., et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005; 102(39): 14040–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506735102>
- Ge X.Y., Li J.L., Yang X.L., Chmura A.A., Zhu G., Epstein J.H., et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*. 2013; 7477(503): 535–8. <https://doi.org/10.1038/nature12711>
- Aréchiga Ceballos N., Vázquez Morón S., Berciano J.M., Nicolás O., Aznar López C., Juste J., et al. Novel lyssavirus in bat, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(5): 793–5. <https://doi.org/10.3201/eid1905>
- Jánoska M., Vidovszky M., Molnár V., Liptovszky M., Harrach B., Benko M. Novel adenoviruses and herpesviruses detected in bats. *Vet. J.* 2011; 189(1): 118–21. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.06.020>
- Aurine N., Baquerre C., Gaudino M., Jean C., Dumont C., Rival-Gervier S., et al. Reprogrammed Pteropus bat stem cells as a model to study host-pathogen interaction during Henipavirus infection. *Microorganisms*. 2021; 9(12): 2567. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122567>
- Waruhiu C., Ommeh S., Obanda V., Agwanda B., Gakuya F., Ge X.Y., et al. Molecular detection of viruses in Kenyan bats and discovery of novel astroviruses, caliciviruses and rotaviruses. *Virol. Sin.* 2017; 32(2): 101–14. <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3930-2>
- Kohl C., Lesnik R., Brinkmann A., Ebinger A., Radonić A., Nitsche A., et al. Isolation and characterization of three mammalian orthoreoviruses from European bats. *PLoS One*. 2012; 7(8): e43106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043106>
- Chua K.B., Crameri G., Hyatt A., Yu M., Tompang M.R., Rosli J., et al. A previously unknown reovirus of bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007; 104(27): 11424–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701372104>

17. Макаров В.В., Лозовой Д.А. *Новые особо опасные инфекции, ассоциированные с рукокрыльями*. Владимир: 2016.

18. Gonsalves L., Bicknell B., Law B., Webb C., Monamy V. Mosquito consumption by insectivorous bats: does size matter? *PLoS One*. 2013; 8(10): e77183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077183>

19. La Motte L.C. Jr. Japanese B encephalitis in bats during simulated hibernation. *Am. J. Hyg.* 1958; 67(1): 101–8. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a119912>

20. Melaun C., Werblow A., Busch M.W., Liston A., Klimpel S. Bats as potential reservoir hosts for vector-borne diseases. In: Klimpel S., Mehlhorn H. *Bats (Chiroptera) as Vectors of Diseases and Parasites. Parasitology Research Monographs, Volume 5*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. https://doi.org/10.1007/978-3-642-39333-4_3

21. Schuh A.J., Amman B.R., Jones M.E., Sealy T.K., Uebelhoer L.S., Spengler J.R., et al. Modelling filovirus maintenance in nature by experimental transmission of Marburg virus between Egyptian rousette bats. *Nat. Commun.* 2017; 8: 14446. <https://doi.org/10.1038/ncomms14446>

22. Smith I., Wang L.F. Bats and their virome: an important source of emerging viruses capable of infecting humans. *Curr. Opin. Virol.* 2013; 3(1): 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.11.006>

23. Gloza-Rausch F., Ipsen A., Seebens A., Göttische M., Panning M., Drexler J.F., et al. Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(4): 626–31. <https://doi.org/10.3201/eid1404.071439>

24. Geldenhuys M., Coertse J., Mortlock M., Markotter W. *In Vitro Isolation of Bat Viruses Using Commercial and Bat-Derived Cell Lines*. Caister Academic Press; 2020: 149–80. <https://doi.org/10.21775/9781912530144.10>

25. Banerjee A., Misra V., Schountz T., Baker M.L. Tools to study pathogen-host interactions in bats. *Virus Res.* 2018; 248: 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.02.013>

26. Cramer G., Todd S., Grimley S., McEachern J.A., Marsh G.A., Smith C., et al. Establishment, immortalisation and characterisation of pteropid bat cell lines. *PLoS One*. 2009; 4(12): e8266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008266>

27. Hoffmann M., Müller M.A., Drexler J.F., Glende J., Erdt M., Gützkow T., et al. Differential sensitivity of bat cells to infection by enveloped RNA viruses: coronaviruses, paramyxoviruses, filoviruses, and influenza viruses. *PLoS One*. 2013; 8(8): e72942. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072942>

28. Поголяева О.С., Юрков С.Г., Лаптева О.Г., Колбасова О.Л., Чадаева А.А., Кольцов А.Ю. и др. Биологическая характеристика и перmissивность к вирусам штамма диплоидных клеток почки летучей мыши нетопыря Натузиуса (*Pipistrellus nathusii* Keyserling & Blasius, 1839; (Chiroptera: Microchiroptera: Vespertilionidae). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(1): 29–39. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-12>

29. OIE; World Animal Health Information System. Disease situation. Available at: <https://wahis.oie.int/#/dashboards/country-or-disease-dashboard>

30. Юрков С.Г., Зуев В.В., Сидоров С.И., Кушнир С.Д., Смыслова Н.Ю., Неверовская Н.С. и др. *Каталог коллекции клеточных культур ВНИИВВиМ*. Покров; 2010.

31. Ford C.E., Hamerton J.L. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technol.* 1956; 31(6): 247–51. <https://doi.org/10.3109/10520295609113814>

32. Rothfels K.H., Siminovitch L. Air drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown in vitro. *Stain Technol.* 1958; 33(2): 73–7. <https://doi.org/10.3109/10520295809111827>

33. Baker K.S., Todd S., Marsh G., Fernandez-Loras A., Suu-Ire R., Wood J.L.N., et al. Co-circulation of diverse paramyxoviruses in an urban African fruit bat population. *J. Gen. Virol.* 2012; 93(Pt. 4): 850–6. <https://doi.org/10.1099/vir.0.039339-0>

34. Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32010L0063>

35. Fagre A.C., Lee J.S., Kityo R.M., Bergren N.A., Mossel E.C., Nakayiki T., et al. Discovery and characterization of Bukakata orbivirus (Reoviridae: Orbivirus), a novel virus from a Ugandan bat. *Viruses*. 2019; 11(3): 209. <https://doi.org/10.3390/v11030209>

REFERENCES

- Narladkar B.W. Projected economic losses due to vector and vector-borne parasitic diseases in livestock of India and its significance in implementing the concept of integrated practices for vector management. *Vet. World*. 2018; 11(2): 151–60. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.151-160>
- WHO. Vector-borne diseases: Fact Sheet; 2020. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
- Eremyan A.A., L'vov D.K., Shchetinin A.M., Deryabin P.G., Aristova V.A., Gitel'man A.K., et al. Genetic diversity of viruses of Chenuda virus species (orbivirus, reoviridae) circulating in Central Asia. *Voprosy virusologii*. 2017; 62(2): 81–6. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-2-81-86> (in Russian)
- Maclachlan N.J., Guthrie A.J. Re-emergence of bluetongue, African horse sickness, and other orbivirus diseases. *Vet. Res.* 2010; 41(6): 35. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010007>
- L'vov D.K., Alekseev K.P., Alimbarova L.M., Aliper T.I., Al'khovskiy S.V., Andronova V.L., et al. *Viruses and Viral Infections of Humans and Animals: A Guide to Virology [Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh. Rukovodstvo po virusologii]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
- Attoui H., Mohd Jaafar F. Zoonotic and emerging orbivirus infections. *Rev. Sci. Tech.* 2015; 34(2): 353–61. <https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2362>
- Calisher C.H., Childs J.E., Field H.E., Holmes K.V., Schountz T. Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19(3): 531–45. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06>
- Leroy E.M., Kumulungui B., Pourrut X., Rouquet P., Hassanin A., Yaba P., et al. Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*. 2005; 438(7068): 575–6. <https://doi.org/10.1038/438575a>
- Lau S.K., Woo P.C., Li K.S., Huang Y., Tsoi H.W., Wong B.H., et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005; 102(39): 14040–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506735102>
- Ge X.Y., Li J.L., Yang X.L., Chmura A.A., Zhu G., Epstein J.H., et al. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature*. 2013; 7477(503): 535–8. <https://doi.org/10.1038/nature12711>
- Aréchiga Ceballos N., Vázquez Morón S., Berciano J.M., Nicolás O., Aznar López C., Juste J., et al. Novel lyssavirus in bat, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2013; 19(5): 793–5. <https://doi.org/10.3201/eid1905>
- Jánoska M., Vidovszky M., Molnár V., Liptovszky M., Harrach B., Benko M. Novel adenoviruses and herpesviruses detected in bats. *Vet. J.* 2011; 189(1): 118–21. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.06.020>
- Aurine N., Baquerre C., Gaudino M., Jean C., Dumont C., Rival-Gervier S., et al. Reprogrammed Pteropus bat stem cells as a model to study host-pathogen interaction during Henipavirus infection. *Microorganisms*. 2021; 9(12): 2567. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122567>
- Waruhiu C., Ommeh S., Obanda V., Agwanda B., Gakuya F., Ge X.Y., et al. Molecular detection of viruses in Kenyan bats and discovery of novel astroviruses, calciviruses and rotaviruses. *Viral Sin.* 2017; 32(2): 101–14. <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3930-2>
- Kohl C., Lesnik R., Brinkmann A., Ebinger A., Radonić A., Nitsche A., et al. Isolation and characterization of three mammalian orthoreoviruses from European bats. *PLoS One*. 2012; 7(8): e43106. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043106>
- Chua K.B., Cramer G., Hyatt A., Yu M., Tompang M.R., Rosli J., et al. A previously unknown reovirus of bat origin is associated with an acute respiratory disease in humans. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007; 104(27): 11424–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701372104>
- Makarov V.V., Lozovoy D.A. *New Particularly Dangerous Infections Associated with Bats [Novye osobo opasnye infektsii, assotsirovannye s rukokrylymi]*. Vladimir; 2016. (in Russian)
- Gonsalves L., Bicknell B., Law B., Webb C., Monamy V. Mosquito consumption by insectivorous bats: does size matter? *PLoS One*. 2013; 8(10): e77183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077183>
- La Motte L.C. Jr. Japanese B encephalitis in bats during simulated hibernation. *Am. J. Hyg.* 1958; 67(1): 101–8. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a119912>

20. Melaun C., Werblow A., Busch M.W., Liston A., Klimpel S. Bats as potential reservoir hosts for vector-borne diseases. In: Klimpel S., Mehlhorn H. *Bats (Chiroptera) as Vectors of Diseases and Parasites. Parasitology Research Monographs, Volume 5*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2014. https://doi.org/10.1007/978-3-642-39333-4_3
21. Schuh A.J., Amman B.R., Jones M.E., Sealy T.K., Uebelhoer L.S., Spengler J.R., et al. Modelling filovirus maintenance in nature by experimental transmission of Marburg virus between Egyptian rousette bats. *Nat. Commun.* 2017; 8: 14446. <https://doi.org/10.1038/ncomms14446>
22. Smith I., Wang L.F. Bats and their virome: an important source of emerging viruses capable of infecting humans. *Curr. Opin. Virol.* 2013; 3(1): 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.11.006>
23. Gloza-Rausch F., Ipsen A., Seebens A., Göttsche M., Panning M., Drexler J.F., et al. Detection and prevalence patterns of group I coronaviruses in bats, northern Germany. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(4): 626–31. <https://doi.org/10.3201/eid1404.071439>
24. Geldenhuys M., Coertse J., Mortlock M., Markotter W. *In Vitro Isolation of Bat Viruses Using Commercial and Bat-Derived Cell Lines*. Caister Academic Press; 2020: 149–80. <https://doi.org/10.21775/9781912530144.10>
25. Banerjee A., Misra V., Schountz T., Baker M.L. Tools to study pathogen-host interactions in bats. *Virus Res.* 2018; 248: 5–12. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.02.013>
26. Crameri G., Todd S., Grimley S., McEachern J.A., Marsh G.A., Smith C., et al. Establishment, immortalisation and characterisation of pteropid bat cell lines. *PLoS One.* 2009; 4(12): e8266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008266>
27. Hoffmann M., Müller M.A., Drexler J.F., Glende J., Erdt M., Gützkow T., et al. Differential sensitivity of bat cells to infection by enveloped RNA viruses: coronaviruses, paramyxoviruses, filoviruses, and influenza viruses. *PLoS One.* 2013; 8(8): e72942. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072942>
28. Povolyaeva O.S., Yurkov S.G., Lapteva O.G., Kolbasova O.L., Chadaeva A.A., Kol'tsov A.Yu., et al. Biological characteristics and permissiveness to viruses of diploid kidney cells strain from the bat *Nathusius' pipistrelle* (*Pipistrellus Nathusii* Keyserling & Blasius, 1839; (Chiroptera: Microchiroptera: Vespertilionidae). *Voprosy virusologii.* 2021; 66(1): 29–39. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-12> (in Russian)
29. OIE; World Animal Health Information System. Disease situation. Available at: <https://wahis.oie.int/#/dashboards/country-or-disease-dashboard>
30. Yurkov S.G., Zuev V.V., Sidorov S.I., Kushnir S.D., Smyslova N.Yu., Neverovskaya N.S., et al. *Catalog of the All-Russian Research Institute of Veterinary Virology and Microbiology Cell Culture Collection [Katalog kollektzii kletochnykh kul'tur VNIIVViM]*. Pokrov; 2010. (in Russian)
31. Ford C.E., Hamerton J.L. A colchicine, hypotonic citrate, squash sequence for mammalian chromosomes. *Stain Technol.* 1956; 31(6): 247–51. <https://doi.org/10.3109/10520295609113814>
32. Rothfels K.H., Siminovitch L. Air drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown in vitro. *Stain Technol.* 1958; 33(2): 73–7. <https://doi.org/10.3109/10520295809111827>
33. Baker K.S., Todd S., Marsh G., Fernandez-Loras A., Suu-Ire R., Wood J.L.N., et al. Co-circulation of diverse paramyxoviruses in an urban African fruit bat population. *J. Gen. Virol.* 2012; 93(Pt. 4): 850–6. <https://doi.org/10.1099/vir.0.039339-0>
34. Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32010L0063>
35. Fagre A.C., Lee J.S., Kityo R.M., Bergren N.A., Mossel E.C., Nakayiki T., et al. Discovery and characterization of Bukakata orbivirus (Reoviridae: Orbivirus), a novel virus from a Ugandan bat. *Viruses.* 2019; 11(3): 209. <https://doi.org/10.3390/v11030209>

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-115>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



Анализ иммунореактивности отдельных В-клеточных эпитопов антигена NS4a вируса гепатита С (*Flaviviridae: Hepacivirus: Hepatitis C virus*)

Николаева Л.И.¹, Белявцев А.Н.^{1,2}, Шевченко Н.Г.^{1,3}, Стучинская М.Д.¹, Самохвалов Е.И.¹, Дедова А.В.¹, Сапронов Г.В.^{1,3}, Шастина Н.С.², Куприянов В.В.^{1,4}

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

²ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет», 119121, Москва, Россия;

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993, Москва, Россия;

⁴Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, 119071, Москва, Россия

Введение. Хронический гепатит С (ХГС) является распространённым инфекционным заболеванием, существенное ограничение которого ВОЗ связывает с применением новой высокоэффективной противовирусной терапии. Ранее в антигене NS4a вируса гепатита С (ВГС) были выявлены два В-клеточных эпитопа. Было показано, что антитела (АТ) в определенных титрах на протяженный С-концевой эпитоп (1687–1718 а.о.) предсказывают высокую вероятность достижения устойчивого вирусологического ответа (УВО) при стандартной терапии пегилированным интерфероном- α и рибавирином.

Цели работы – анализ иммунореактивности двух В-клеточных эпитопов (серединного и С-концевого) антигена NS4a и выявление возможной ассоциации АТ к ним с достижением УВО после стандартной интерферонотерапии и лечения препаратами прямого противовирусного действия (ПППД) – даклатасвиром и софосбувиром (велпанатом).

Материалы и методы. Исследованы образцы сывороток крови пациентов с ХГС ($n = 113$), из которых 55 участников получили стандартную интерферонотерапию, 50 – лечение велпанатом, остальным 8 терапия не проводилась. Серединный В-клеточный эпитоп (позиции 24–34 а.о.) NS4a синтезирован твёрдофазным методом, а С-концевой эпитоп (34–54 а.о.) получен генно-инженерным методом. Иммуоферментный анализ (ИФА) сывороток, собранных перед началом лечения, по двум выбранным эпитопам осуществляли согласно общепринятой методике.

Результаты. При анализе сывороток крови пациентов ($n = 113$) было установлено, что частота выявления антител к С-концевому эпитопу достоверно выше, чем к серединному ($p = 0,01$). В образцах сыворотки участников, завершивших стандартную интерферонотерапию, установлена ассоциация наличия АТ к С-концевому эпитопу с достижением УВО ($p = 0,0245$). В сыворотках крови участников, завершивших терапию велпанатом, тоже установлена ассоциация наличия АТ к С-концевому эпитопу с достижением УВО ($p < 0,0001$). Присутствие АТ к серединному В-эпитопу не было ассоциировано с достижением УВО независимо от применённой терапии.

Обсуждение. Обнаруженное различие в иммунореактивности двух В-клеточных детерминант может быть связано с локализацией ближайших Th-эпитопов, с чувствительностью антигена NS4a к протеолитическим ферментам и с особенностями презентации эпитопов антигенпрезентирующими клетками. Однако надо отметить малую изученность иммунореактивности серединного В-эпитопа. Хотя ассоциация АТ к С-концевому эпитопу с достижением УВО показана несколькими научными коллективами, детальный молекулярный механизм их влияния на эффективность терапии неясен.

Заключение. При ХГС АТ на С-концевой эпитоп NS4a образуются достоверно чаще, чем к серединной детерминанте. Наличие антител к С-концевому эпитопу является прогностическим признаком большой вероятности достижения УВО независимо от вида терапии и титра антител.

Ключевые слова: В-клеточные эпитопы; антиген NS4a вируса гепатита С (ВГС); иммунореактивность, эффективность терапии

Для цитирования: Николаева Л.И., Белявцев А.Н., Шевченко Н.Г., Стучинская М.Д., Самохвалов Е.И., Дедова А.В., Сапронов Г.В., Шастина Н.С., Куприянов В.В. Анализ иммунореактивности отдельных В-клеточных эпитопов антигена NS4a вируса гепатита С (*Flaviviridae: Hepacivirus: Hepatitis C virus*). *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(3): 237–245. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-115>

Для корреспонденции: Николаева Людмила Ивановна, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генно-инженерных препаратов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия. E-mail: l.i.nikolaeva@mail.ru

Участие авторов: Николаева Л.И. – концепция и дизайн исследования, тестирование антигенов и сывороток, анализ данных; Белявцев А.Н. – синтез пептида, анализ данных; Шевченко Н.Г. – формирование групп пациентов, тестирование сывороток, анализ данных; Стучинская М.Д. – синтез пептида, тестирование сывороток, анализ данных; Самохвалов Е.И. – выявление и генотипирование РНК ВГС, анализ данных; Дедова А.В. – выделение РНК ВГС, анализ данных; Сапронов Г.В. – формирование групп пациентов, анализ данных; Шастина Н.С. – синтез пептида, анализ данных; Куприянов В.В. – получение рекомбинантного белка, анализ данных. Все авторы участвовали в интерпретации данных, подготовке текста и одобрении окончательного варианта статьи перед публикацией.

Финансирование. Исследование было частично выполнено за счёт гранта РФФИ (проект №20-04-00705).

Благодарности. Авторы выражают признательность сотрудникам ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» (НИЦЭМ) Минздрава России: кандидату химических наук, старшему научному сотруднику Т.М. Гараеву за помощь при выполнении пептидного синтеза и младшему научному сотруднику А.А. Вахрамееву за техническую помощь в оформлении статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» (РМАНПО) Минздрава России (Протокол № 7 от 17.05.2016).

Поступила 11.05.2022

Принята в печать 24.05.2022

Опубликована 30.06.2022

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-115>

The analysis of immunoreactivity of individual B-cell epitopes of hepatitis C virus (*Flaviviridae: Hepacivirus: Hepatitis C virus*) NS4a antigen

Lyudmila I. Nikolaeva¹, Alexandr N. Belyavtsev^{1,2}, Nadezhda G. Shevchenko¹,
Maya D. Stuchinskaya¹, Evgeniy I. Samokhvalov¹, Anna V. Dedova¹,
Georgy V. Sapronov^{1,3}, Natalya S. Shastina², Victor V. Kuprianov^{1,4}

¹FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia;

²FSBEI HE «MIREA – Russian Technology University», 119571, Moscow, Russia;

³FSBEI FPE «Russian Medical Academy of Continuous Professional Education» of the Ministry of Health of Russia, 125993, Moscow, Russia;

⁴Federal Research Center «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences, 119071, Moscow, Russia

Introduction. Chronic viral hepatitis C (CHC) is a ubiquitous infectious disease, a significant limitation of which WHO attributes to the use of a new highly effective antiviral therapy. Previously, two B-cell epitopes were identified in NS4a antigen of the hepatitis C virus (HCV). It was shown that certain titers of antibodies (ABs) to the extended C-terminal epitope (1687–1718 a.a.) can predict a high probability of achieving a sustained virological response (SVR) to standard therapy with pegylated interferon- α and ribavirin.

The **aim** of the work was to determine immunoreactivity of two B-cell epitopes (middle and C-terminal) of NS4a antigen, and to estimate a possible association of ABs to them with the achievement of SVR after standard interferon therapy and treatment with direct antiviral drugs (DAAs) daclatasvir and sofosbuvir (velpanat).

Materials and methods. Blood serum samples of patients with CHC ($n = 113$), of which 55 participants received standard interferon therapy, 50 received velpanate treatment, the remaining 8 received no therapy were examined. The middle B-cell epitope (positions 24–34 a.a.) of NS4a was synthesized by the solid-phase method, while the C-terminal epitope (34–54 a.a.) was obtained using genetically engineered techniques. Enzyme immunoassay (ELISA) testing of the sera collected before treatment was performed for the two selected epitopes according to the conventional methods.

Results. The antibodies to the C-terminal epitope were detected significantly more frequently than those to the middle one ($p = 0.01$) when analyzing the blood sera of patients ($n = 113$). The presence of ABs to the C-terminal epitope in the serum samples of participants who completed standard interferon therapy was associated with the achievement of SVR ($p = 0.0245$). In the blood sera of participants who completed therapy with velpanate, an association of the presence of ABs to the C-terminal epitope with the achievement of SVR was also established ($p < 0.0001$). The presence of ABs to the middle B epitope was not associated with the achievement of SVR, regardless of the therapy used.

Discussion. The observed difference in the immunoreactivity of the two B-cell determinants may be associated with the localization of the nearest Th-epitopes, the sensitivity of NS4a antigen to proteolytic enzymes, and

the peculiarities of epitope presentation by antigen-presenting cells. However, it should be noted that the immunoreactivity of the middle B-epitope is poorly studied. Although the association of ABs to the C-terminal epitope with the achievement of SVR has been shown by several scientific teams, the detailed molecular mechanism of their influence on the effectiveness of therapy is unclear.

Conclusion. In CHC, ABs to the C-terminal epitope of NS4a are produced more frequently than those to the median epitope. The presence of ABs to the C-terminal epitope is a predictive marker of a high probability of achieving SVR, regardless of the type of therapy and antibody titer.

Keywords: *B-cell epitopes; antigen NS4a of hepatitis C virus (HCV); immunoreactivity, therapy effectiveness*

For citation: Nikolaeva L.I., Belyavtsev A.N., Shevchenko N.G., Stuchinskaya M.D., Samokhvalov E.I., Dedova A.V., Sapronov G.V., Shastina N.S., Kuprianov V.V. The analysis of immunoreactivity of individual B-cell epitopes of hepatitis C virus (*Flaviviridae: Hepacivirus: Hepatitis C virus*) NS4a antigen. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(3): 237–245. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-115>

For correspondence: Lyudmila I. Nikolaeva, D.Sci. (Biol), Leading Researcher of the Laboratory Gene Engineering Products, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia. E-mail: l.i.nikolaeva@mail.ru

Information about the authors:

Nikolaeva L.I., <https://orcid.org/0000-0002-1323-5568>

Belyavtsev A.N., <https://orcid.org/0000-0002-6224-1323>

Shevchenko N.G., <https://orcid.org/0000-0002-2486-4554>

Stuchinskaya M.D., <https://orcid.org/0000-0001-8544-7482>

Samokhvalov E.I., <https://orcid.org/0000-0002-1941-0996>

Dedova A.V., <https://orcid.org/0000-0002-2491-9324>

Sapronov G.V., <https://orcid.org/0000-0002-2154-2904>

Shastina N.S., <https://orcid.org/0000-0001-8382-7262>

Kuprianov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-8602-1974>

Contribution: Nikolaeva L.I. – study concept and design, antigens and sera testing, data analysis; Belyavtsev A.N. – peptide synthesis, data analysis; Shevchenko N.G. – patients groups' formation, sera testing, data analysis; Stuchinskaya M.D. – peptide synthesis, sera testing, data analysis; Samokhvalov E.I. – HCV RNA identification and genotyping, data analysis; Dedova A.V. – HCV RNA isolation, data analysis; Sapronov G.V. – patients groups' formation, data analysis; Shastina N.S. – peptide synthesis, data analysis; Kuprianov V.V. – obtaining recombinant protein, data analysis. All authors participated in data interpretation, text preparation, and approval of the final version of the article before publication.

Funding. The research was partly funded by the Russian Foundation for Basic Research (Grant No 20-04-00705).

Acknowledgement. The authors are grateful to the scientists of the FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, T.M. Garaev, Ph.D. (Chem.), Senior Researcher, for help in peptide synthesis, and A.A. Vakhrameev, Junior Researcher, for technical assistance in the article preparing.

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

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the patients. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the FSBEI FPE «Russian Medical Academy of Continuous Professional Education» of the Ministry of Health of Russia (Protocol No. 7 dated 17.05.2016).

Received 11 May 2022

Accepted 24 May 2022

Published 30 June 2022

Введение

Вирусный гепатит С – повсеместно распространённое инфекционное заболевание с парентеральным механизмом передачи, часто имеющее длительное хроническое течение. Отечественные и зарубежные эксперты оценивают долю лиц, имеющих антитела (АТ) к вирусу гепатита С (ВГС) в нашей стране, в 2,9–4,0%, что является высоким показателем [1–3]. Абсолютные количественные данные по носителям АТ достигают 4,2 млн человек, подавляющее большинство из которых хронически инфицированы [1]. Регистрация максимального числа случаев острого гепатита С в РФ наблюдалась в 2000 г., хронического гепатита С (ХГС) – в 2008 г. [4]. Впервые зарегистрированные случаи ХГС в 2020 г. составили 24,5 случая на 100 тыс. населения, что в 1,7 раза меньше, чем в 2009 г. [4, 5].

Этиологическим агентом заболевания является вирус гепатита С (ВГС) (*Flaviviridae: Hepacivirus: Hepatitis C virus*) [6]. ВГС имеет липидно-белковую оболочку и характеризуется выраженной неоднородностью размеров при выделении его из биологического материала инфицированных лиц. По данным М.Т. Saitanese и соавт., основная доля вирусных частиц имеет диаметр 67–68 нм [7]. Геном возбудителя представлен одноцепочечной молекулой +РНК (позитивной полярности) также варибельного размера, в среднем составляющего ~9,6 т.п.н. Изоляты ВГС подразделяются на 8 генотипов и несколько десятков субтипов в зависимости от генетической варибельности и филогенетического родства [8, 9].

РНК вируса кодирует большой полипротеин, который расщепляется клеточными и вирусными протеазами на структурные белки: сердцевинный (ядер-

ный, или core), и два оболочечных (E1 и E2), а также неструктурные полипептиды: виropорин (p7), две протеазы (NS2 и NS3), кофактор сериновой протеазы (NS4a), два компонента репликативного комплекса (NS4b, NS5a) и РНК-зависимую РНК-полимеразу (NS5b). Ключевую роль в высечении из полипротеина неструктурных белков выполняют сериновая протеаза NS3 и её кофактор NS4a. Очевидно, именно по этой причине первый противовирусный препарат прямого действия (ПППД) – теллапревир – был разработан против сериновой протеазы; он представлял собой пептидомиметик, нарушающий протеолитическую функцию этого фермента.

Полипептид NS4a состоит из 54 аминокислотных остатков, он частично (N-концевым участком) погружён в липидный матрикс мембраны эндоплазматической сети. В серединной части кофактора находится область контакта с сериновой протеазой. Считается, что C-концевая часть молекулы не имеет вторичной структуры и экспонирована из комплекса NS3/NS4a. В составе NS4a идентифицированы два В-клеточных эпитопа: серединный (позиции 24–36 а.о.) и C-концевой (32–54 а.о.) [10, 11].

Ранее при анализе сывороток пациентов, получавших стандартную интерферонотерапию (пегилированный интерферон- α и рибавирин), установлена связь наличия АТ в высоком титре (более 1 : 1250) к протяжённому C-концевому фрагменту NS4a (1687–1718 а.о.) с достижением устойчивого вирусологического ответа (УВО) [12, 13]. Авторы предложили использовать факт обнаружения АТ в таком высоком титре как предиктивный признак большой вероятности достижения УВО при стандартной интерферонотерапии ХГС. Появление принципиально новой терапии ПППД сделало возможным достижение УВО в значительном количестве случаев (> 95%) [14]. Однако, принимая во внимание высокую стоимость лечения и риск его безуспешного завершения, мы считаем не менее актуальной задачей установление предикторов терапевтических неудач при назначении ПППД. Следует отметить, что иммуногенность серединного В-эпитопа NS4a ВГС и прогностическое значение АТ к этому участку до настоящего времени не исследованы.

Таким образом, целями данного исследования явились установление иммунореактивности В-клеточных эпитопов антигена NS4a и анализ возможной ассоциации АТ к данным детерминантам с достижением УВО при противовирусной терапии ХГС. Для достижения поставленных задач были получены серединный и C-концевой эпитопы, проанализировано их взаимодействие с сыворотками крови от пациентов с разными результатами лечения как при стандартной интерферонотерапии, так и при применении велпаната, ПППД.

Материалы и методы

Образцы крови получены от пациентов ($n = 113$), с подтвержденным ХГС, при их инфицированном согласии. В исследование не включались лица, имеющие ВИЧ-инфекцию (*Retroviridae: Orthoretrovirinae*:

Lentivirus: Human immunodeficiency virus), онко- и гематологические заболевания, а также инфицированные другими гепатотропными вирусами. Изучение биологического материала одобрено Этическим комитетом ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» (РМАНПО) Минздрава России (Протокол № 7 от 17.05.2016). Группу сравнения составили здоровые ($n = 20$) потенциальные кандидаты в доноры крови.

Пептид VIVGRIILSGK (24–34 а.о. в антигене NS4a), почти полностью воспроизводящий серединный В-эпитоп (без аминокислотных остатков в позициях 35 и 36), получен твёрдофазным синтезом в ручном режиме на полимерном носителе (смоле) Ванга по Fmoc-протоколу (*англ.* fluorenylmethoxycarbonyl protecting group, флуоренилметоксикарбонильная защитная группа) с использованием Fmoc-защищённых L-аминокислот (Sigma-Aldrich, США; Merck, Германия). Для активации карбоксильных групп использовали метод активированных эфиров с применением конденсирующего агента 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимида ($C_8H_{17}N_3$) (Merck). Очистку пептида проводили методом обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на хроматографической колонке ReproSil-Pur C18 (Maisch, Германия); элюент – вода/ацетонитрил (Gradient grade for far UV, Fisher Chemical, Великобритания) с 0,1% трифторуксусной кислотой (CF_3COOH). Чистота полученного пептида по данным аналитической ВЭЖХ составила 96%.

Следующий фрагмент NS4a (34–54 а.о.), почти полностью воспроизводящий C-концевой В-эпитоп (без остатков 32 и 33), имел аминокислотную последовательность RPVVCPDREVLVEGFDEMEEC (что соответствует последовательности для ВГС субтипа 1b; база данных GenBank MN200420.1). Данный полипептид синтезировали генно-инженерными методами как рекомбинантную молекулу, соединённую с зелёным флуоресцирующим протеином (*англ.* green fluorescent protein, GFP). Исходно получали клоны *E. coli* DH5 α , содержащие плазмиду *pUC19* с вставкой, кодирующей целевой фрагмент белка NS4a и протеин GFP, что было подтверждено секвенированием. Затем из плазмиды уникальными рестриктазами AscI и SmaI вырезали фрагмент с нужной последовательностью и переносили его в бинарный вектор *pEff*, описанный ранее и предоставленный авторами [15]. После этого плазмиду *pEff* NS4A-GFP переносили из *E. coli* в агробактерии *Agrobacterium tumefaciens* s. *radiobacter*, штамм GV3101 (pMP90). Для этого готовили компетентные клетки агробактерий и трансформировали их плазмидой *pEff* NS4A-GFP, выделенной из клеток *E. coli*. В нижнюю поверхность листьев растения *Nicotiana benthamiana* (табак Бентхама) вводили трансформированные агробактерии и получали транзientную экспрессию, визуально наблюдаемую по свечению GFP в ультрафиолетовых лучах. С целью контроля также был получен индивидуальный рекомбинантный белок GFP.

Выделение, очистку и анализ рекомбинантных протеинов на хроматографическом металлохелатном сорбенте Ni-NTA (Qiagen, США) осуществляли согласно методике производителя последнего. Определение концентрации белка проводили в соответствии со стандартным методом Брэдфорда. Чистоту рекомбинантного белка подтверждали электрофорезом в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия ($C_{12}H_{25}SO_4Na$) (ДДС), используя общепринятый метод Лэммли; показатель чистоты составил 93%.

Процедуру иммуноферментного анализа (ИФА) осуществляли по стандартной методике в планшетах MediSorb (Nunc, Дания), сорбируя пептид и рекомбинантный протеин в концентрации 10 мкг/1 мл в 0,05 М карбонатно-бикарбонатном буфере (рН 9,5) на протяжении 16 ч при 4°C. Остальные этапы выполняли, как описано ранее, с разведением сывороток 1 : 10 [16]. Результаты ИФА регистрировали при помощи спектрофотометра StatFax 3200 (Awareness Technology, США), измеряя оптическую плотность (ОП) в двухволновом режиме: основной фильтр – 450 нм, референс-фильтр – 650 нм. Результаты тестирования образцов представляли в виде коэффициента позитивности (КП), который рассчитывали как отношение ОП образца к пороговой величине ОП. Последнюю величину определяли как сумму средней арифметической величины ОП от 20 отрицательных образцов и трехкратной стандартной ошибки.

РНК ВГС выявляли методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) (нижний предел чувствительности 15 МЕ/мл), используя набор реагентов «РеалБест РНК ВГС» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Генотипирование проводили с системой специфических праймеров или методом автоматического секвенирования зон генома: 5'-нетранслируемого региона (core) и NS5b, – используя секвенатор 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Hitachi, Япония) [17, 18].

Наличие АТ к антигенам ВГС определяли в иммуноферментной тест-системе «Бест анти-ВГС-спектр»

(ЗАО «Вектор-Бест»). Данная система, описанная ранее, позволяет выявлять АТ к четырём отдельным антигенам: core, NS3, NS4ab (единый рекомбинантный белок содержит участок С-концевой области NS4a, фрагмент выщепления и часть N-концевой области NS4b) и NS5a [19].

При обработке статистических данных применяли пакет программ Statistica v10.0 (Tulsa, США). Средние показатели (M) в группах пациентов представляли в виде $M \pm 2SEM$ (двойная стандартная ошибка среднего). Нормальность распределения устанавливали графическим критерием, используя пакет программ Statistica v10.0. В случае невозможности доказать параметрический характер распределения достоверность различий параметров в группах оценивали с помощью χ^2 -критерия Пирсона; при этом в случае необходимости использовали поправку Йейтса либо точный симметричный метод Фишера. Различия между сравниваемыми величинами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

В структуре антигена NS4a, иммунореактивность фрагментов которого изучалась, выявлены В-клеточные и Т-хелперные (Th) эпитопы. Схема их расположения приведена на рис. 1. Серединный В-эпитоп является консервативным, а С-концевой – типоспецифичным, в некоторых положениях аминокислотных остатков возможны вариации в зависимости от конкретного генотипа ВГС.

Перед началом анализа иммунореактивности двух эпитопов сыворотки крови от всех участников были протестированы на наличие АТ к ВГС (анти-ВГС) в тест-системе «Бест анти-ВГС-спектр». В группе сравнения анти-ВГС не обнаружены, в группе участников с ХГС – выявлены во всех образцах ($n = 113$; 100%). К антигену NS4ab (единый рекомбинантный белок) наличие АТ установлено у 83 (73,5%) пациентов.

В образцах группы сравнения при анализе иммунореактивности двух В-эпитопов было установлено, что средняя величина ОП АТ на серединный эпитоп

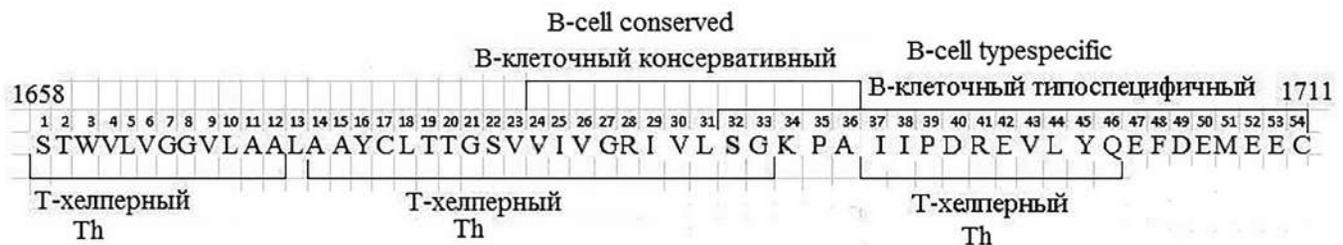


Рис. 1. Схема расположения В-клеточных и Т-хелперных (Th) эпитопов в составе антигена NS4a вируса гепатита С.

Примечание. Расположение эпитопов выделено рамками. Аминокислотная последовательность антигена NS4a и локализация В- и Т-клеточных эпитопов соответствуют вирусу гепатита С субтипа 1b [10, 11, 20–22]. Приведена собственная нумерация остатков в NS4a. Внизу показаны возможные вариации аминокислотных остатков (названия даны в соответствии с международной номенклатурой; сверху отмечены концевые остатки по полипротеину).

Fig. 1. Scheme of the location of B-cell and T-helper (Th) epitopes in the NS4a antigen of hepatitis C virus.

Note. The amino acid sequence of the NS4a antigen and localization of B- and T-cell epitopes correspond to hepatitis C virus subtype 1b [10, 11, 20–22]. The author's numbering of residues in NS4a is given. Possible variations of the amino acid residues are shown below (names are given according to the international nomenclature; endpoints numbering in polyprotein is shown at the top).

составила 0,066; на С-концевой – 0,080. При оценке взаимодействия всех образцов групп исследования и сравнения с рекомбинантным GFP не выявлено ни одного позитивного результата (средняя ОП 0,042). Данные по иммунореактивности эпитопов (серединного и С-концевого) с образцами всех пациентов представлены в **табл. 1**.

Из данные табл. 1 следует, что С-концевой эпитоп антигена NS4a (34–54 а.о.) обладает большей иммунореактивностью, АТ на него выявляются чаще, чем на серединный эпитоп ($p = 0,01$). Среднее значение КП АТ к С-концевому эпитопу было выше, чем к серединному, однако ввиду широкого диапазона величин не достигло статистической значимости ($p = 0,11$). Максимальная величина КП этих АТ в 4,9 раза превышал таковую для АТ к серединному эпитопу (39,785 против 8,100).

Из публикаций других авторов следует, что наличие АТ в титре более, чем 1 : 1250 к протяжённому С-концевому эпитопу (1687–1718 а.о.) NS4a перед началом лечения является предиктором эффективности стандартной интерферонотерапии [12, 13]. С учётом этого факта был выполнен сравнительный анализ наличия АТ к изучаемым эпитопам у 55 пациентов перед началом стандартной интерферонотерапии (**табл. 2**). Распределение субтипов ВГС в этой группе было следующим: 1b – 60%; 3a – 36,4%; 2a – 3,6%. Через 6 мес после окончания лечения наличие/отсутствие УВО подтверждался тестом на РНК ВГС. УВО достигли 25 участников (среди них ВГС 1b – 52%; 3a – 44%; 2a – 4%), не достигли – 30 (ВГС субтипа 1b – 66,7%; 3a – 30% и 2a – 3,3%).

Иммунореактивность обоих эпитопов в исследованной выборке образцов имела близкие значения (**табл. 2**). Несмотря на то что АТ к С-концевому эпитопу выявлялись несколько чаще и с более высокими величинами КП, различия были статистически не-

достоверны при сравнении с теми же показателями для серединного эпитопа. Сопоставление данных образцов пациентов, достигших и не достигших УВО, показало более частое выявление АТ к С-концевому эпитопу в первом случае ($p = 0,0245$; 16 из 25 против 9 из 30). В отношении АТ к серединному эпитопу не установлено ассоциации их присутствия с достижением УВО ($p = 0,6936$; 13 из 25 против 14 из 30). Вклад отдельных субтипов ВГС в частоту выявления АТ к С-концевому эпитопу также оказался статистически незначимым ($p = 0,6766$).

В следующей группе пациентов ($n = 50$) перед началом терапии велпанатом (противовирусные компоненты: ингибитор NS5a (даклатасвир) и ингибитор NS5b (софосбувир), эффективны против ВГС генотипов 1–6) проанализированы количественные параметры АТ к обоим эпитопам. УВО достигли 30 участников (распределение субтипов ВГС: 1b – 53,3%; 3a – 40%; 2a – 6,7%) и не достигли – 20 (1b – 65%; 3a – 30% и 2a – 5%). Результаты взаимодействия образцов сывороток, собранных перед началом терапии велпанатом, с анализируемыми эпитопами представлены в **табл. 3**.

АТ к С-концевому эпитопу достоверно чаще детектировались в группе лиц, имевших УВО (30 из 30 против 6 из 20; $p < 0,0001$). Выявление АТ к серединному эпитопу не имело зависимости от результата лечения (12 из 30 против 4 из 20, $p = 0,6738$). Субтип ВГС не оказал значимого влияния на наличие АТ к С-концевой детерминанте ($p = 1,0000$).

Таким образом, из полученных данных следует, что факт наличия АТ к С-концевому эпитопу является прогностическим признаком большей вероятности достижения УВО как при стандартной интерферонотерапии, так и в случае лечения ПППД (велпанатом). Однако ассоциация факта отсутствия АТ к С-концевому эпитопу нуждается в дополнительном изучении.

Таблица 1. Данные по иммунореактивности анализируемых эпитопов, полученные с образцами ($n = 113$) пациентов с хроническим гепатитом С

Table 1. Data on the immunoreactivity of the analyzed epitopes obtained by analyzing samples ($n = 113$) from patients with chronic hepatitis C

Анализируемые эпитопы Analyzed epitopes	Доля образцов с антителами, % (n) Proportion of samples with antibody; percentage (n)	Среднее значение КП* Average PR value*	Доля образцов со значением КП < 3,000 (n) Proportion of samples with PR value < 3.000 (n)	Доля образцов со значением КП > 3,000 (n) Proportion of samples with PR value > 3.000 (n)	Максимальная величина КП Maximum of PR value
Серединный (24–34 а.о.) Middle (aa 24–34)	42,48 ± 4,47 (48)	1,814 ± 0,348	99,91 ± 2,37 (44)	9,09 ± 2,37 (4)	8,100
С-концевой (34–54 а.о.) C-terminal (aa 34–54)	61,06 ± 4,61 (69)	4,878 ± 1,979	55,907 ± 6,030 (38)	44,93 ± 6,03 (31)	39,785
Достоверность различий, p Differences significance, p	0,01	0,11	< 0,01	< 0,01	0,026**

Примечание. *КП – коэффициент позитивности; **значения p рассчитаны с использованием образцов с КП > 8,000.

Note. *PR, positivity ratio; **p value calculated using the samples with a PR > 8.000.

Обсуждение

При сравнении двух В-клеточных эпитопов NS4a, срединного и С-концевого, показано, что иммунореактивность выше у последнего. Обнаруженное различие может быть связано с локализацией ближайших Th-эпитопов. У срединного В-эпитопа имеется частичное перекрытие с аминокислотными остатками Th-эпитопа (14–33 а.о., для аллелей HLA DRB1 и DQB1) [20]. Внутри С-концевого В-эпитопа локализуется другой Th-эпитоп (34–47 а.о.) для аллелей HLA DRB1) [21]. Последний располагается после срединного В-эпитопа и может усиливать его

гуморальный ответ. Возможно, что различие в иммунореактивности двух В-эпитопов обусловлено их разной доступностью для протеолитических ферментов и чувствительностью к ним, с особенностями презентации детерминант в антигенпрезентирующих клетках. По сравнению с С-концевым эпитопом иммунореактивность у срединного эпитопа, имеющего контакт с сериновой протеазой NS3, ниже. Тем не менее ожидается, что он может представлять интерес при конструировании вакцины против гепатита С [16].

Следует отметить, что срединный В-эпитоп характеризуется консервативной последовательностью, т.е. АТ к нему генотип/субтип-независимые. Посколь-

Таблица 2. Данные по иммунореактивности анализируемых эпитопов, полученные с образцами пациентов (n = 55) перед началом стандартной пегинтерферонотерапии

Table 2. Data on the immunoreactivity of the analyzed epitope obtained by analyzing patients' samples (n = 55) obtained before standard peginterferon therapy

Анализируемые эпитопы Analyzed epitopes	Доля образцов с антителами у пациентов, достигших УВО, % (n) Proportion of antibody containing samples from patients with SVR, percentage (n)	Среднее значение величины КП образцов в группе пациентов с УВО Mean value of PR in samples from SVR group	Доля образцов с антителами от пациентов, не достигших УВО, % (n) Proportion of antibody containing samples from patients without SVR, percentage (n)	Среднее значение величины КП образцов в группе пациентов, не достигших УВО Mean value of PR in samples from NR group
Срединный (24–34 а.о.) Middle (aa 24–34)	52,00 ± 10,20 (13)	1,853 ± 0,448	46,67 ± 9,26 (14)	1,981 ± 0,838
С-концевой (34–54 а.о.) C-terminal (aa 34–54)	64,00 ± 9,80 (16, из них 8 с субтипом ВГС 1b) (16, of which 8 with HCV 1b)	4,789 ± 2,118	30,00 ± 8,51 (9, из них 6 с субтипом ВГС 1b) (9, of which 6 with HCV 1b)	2,647 ± 1,262
Достоверность различий, p Differences significance, p	0,921	0,200	0,288	0,520

Примечание. УВО – устойчивый вирусологический ответ; ВГС – вирус гепатита С.

Note. SVR, sustained virological response; NR, non-sustained virological response; HCV, hepatitis C virus.

Таблица 3. Данные по иммунореактивности анализируемых эпитопов, полученные с образцами пациентов (n = 50) перед началом терапии велпанатом

Table 3. Data on the immunoreactivity of analyzed epitope obtained by analyzing patients' samples (n = 50) obtained before velpanate therapy

Анализируемые эпитопы Analyzed epitopes	Доля образцов с антителами у пациентов, достигших УВО, % (n) Proportion of antibody containing samples from patients with SVR, percentage (n)	Среднее значение величины КП образцов в группе пациентов с УВО Mean value of PR in samples from SVR group	Доля образцов с антителами от пациентов, не достигших УВО, % (n) Proportion of antibody containing samples from patients without SVR, percentage (n)	Среднее значение величины КП образцов в группе пациентов, не достигших УВО Mean value of PR in samples from NR group
Срединный (24–34 а.о.) Middle (aa positions 24–34)	40,00 ± 9,10 (12)	1,996 ± 1,134	20,00 ± 9,18(4)	1,864 ± 1,194
С-концевой (позиции 34–54 а.о.) C-terminal (aa 34–54)	98,15 ± 1,85* (30, из них 17 с субтипом ВГС 1b) (30, of which 17 with HCV 1b)	5,407 ± 2,854	30,00 ± 10,51 (6, из них 4 с субтипом ВГС 1b) (6, of which 4 with HCV 1b)	1,306 ± 0,128
Достоверность различий, p Differences significance, p	< 0,0001	0,280	0,715	>0,500

Примечание. *С учётом поправки на объём выборки, при этом все участники имели эти антитела; УВО – устойчивый вирусологический ответ; ВГС – вирус гепатита С.

Note. *Adjusted for the group size, but all participants displayed the antibody; SVR, sustained virological response; NR, non-sustained virological response; HCV, hepatitis C virus.

ку С-концевой эпитоп является типоспецифичным, возможны различия при взаимодействии с ним АТ от лиц, инфицированных вирусом различных генотипов. В представленном исследовании распределение пациентов по доминирующим генотипам (1b и 3a) в группах участников, прошедших стандартную интерферонотерапию и лечение ПППД, оказалось весьма близким (субтип 1b – 60,0 и 58,0%; 3a – 36,4 и 36,0% соответственно). В группе с УВО распределение участников по субтипам ВГС было следующим: при пегинтерферонотерапии 1b – 52%, 3a – 44%; в случае использования ПППД 1b – 53,3% и 3a – 40%. Указанные значения также очень близки к приведённым выше.

Таким образом, различное влияние субтипов ВГС на наличие АТ не установлено. Этот феномен, вероятно, связан с присутствием в С-концевом эпитопе почти консервативного мотива в позиции 39–50 а.о. [23]. В то же время установлены основные особенности области С-концевого эпитопа, характерные только для субтипов 2a и 3a: L (лейцин) в позиции 37, K (лизин) – в 41 и Y (тирозин) в позиции 48 [22]. При сравнении с последовательностью рекомбинантного белка (RPVVC PDREVLVYEGFDEMEEC) можно видеть, что в позиции 37 имеет место синонимичная замена V (валин) → L (гидрофобные аминокислоты); в позиции 41 – также синонимичная замена R (аргинин) → K (положительно заряженные аминокислоты). Только в позиции 48 присутствует синонимичная замена F (фенилаланин) → Y (гидрофобная молекула на незаряженную полярную). Тем не менее обе аминокислоты принадлежат к группе ароматических, стерически сходны между собой и различаются наличием/отсутствием одной гидроксильной группы. Возможно, поэтому показатели выявления АТ к С-концевому эпитопу у пациентов с субтипами 1b, 2a и 3a не имели существенных различий.

В проведённом исследовании показано, что факт наличия АТ к С-концевому В-эпитопу перед началом противовирусной терапии (как стандартной интерферонотерапии, так и ПППД) статистически достоверно ассоциирован с достижением УВО. Некоторые участники, не достигшие УВО, тоже имели эти антитела (табл. 2 и табл. 3). Вероятно, необходим комплекс других предиктивных признаков, чтобы с большей точностью оценить вероятность достижения УВО. Помимо этого, нами подтверждены данные других авторов о прогностической роли АТ к С-концевому В-эпитопу антигена NS4a при интерферонотерапии, но без обязательного наличия их высокого титра [12, 13]. Однако надо отметить, что детальный механизм влияния АТ к С-концевому В-эпитопу NS4a на достижение УВО неясен. Результаты настоящей работы могут представлять интерес для разработки и развития прогностических критериев персонализированной терапии ХГС.

Заключение

Основываясь на результатах исследования, представляется возможным сделать следующие выводы:

1. Из двух проанализированных В-эпитопов антигена NS4a у пациентов с ХГС достоверно чаще выявлялись АТ к С-концевому эпитопу (около 61%).
2. Наличие АТ к С-концевому эпитопу NS4a перед началом лечения было ассоциировано с достижением УВО как при стандартной интерферонотерапии, так и при лечении ПППД.
3. Наличие АТ к срединному эпитопу до начала терапии не имело ассоциации с достижением УВО.
4. АТ к С-концевому эпитопу являются прогностическим признаком большей вероятности достижения УВО при лечении ХГС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чуланов В.П., Пименов Н.Н., Мамонов Н.А., Сагалова О.И., Шестакова И.В., Покровский В.И. Хронический гепатит С как проблема здравоохранения России сегодня и завтра. *Тепаневрологический архив*. 2015; 87(11): 5–10. <https://doi.org/10.17116/terarkh201587115-10>
2. Daw M.A., El-Bouzedi A.A., Ahmed M.O., Dau A.A., Agnan M.M., Drah A.M. Geographic integration of hepatitis C virus: A global threat. *World J. Virol.* 2016; 5(4): 170–82. <https://doi.org/10.5501/wjv.v5.i4.170>
3. Petruzzello A., Marigliano S., Loquercio G., Cozzolono A., Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J. Gastroenterol.* 2016; 22(34): 7824–40. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i34.7824>
4. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2014 году». Москва; 2015.
5. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; с. 158. Доступно на: <https://36.rospotrebnadzor.ru/documents/public-reports>
6. Smith D.B., Bercher P., Bukh J., Gould E.A., Meyers G., Monath T., et al. Proposal update to the taxonomy of the genera *Hepacivirus* and *Pegivirus* within the *Flaviviridae* family. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(11): 2894–907. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000612>
7. Catanese M.T., Uryu K., Kopp M., Edwards T., Andrus L., Rice W.J., et al. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2013; 110(23): 9505–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307527110>
8. Smith D.B., Bukh J., Kuiken C., Muerhoff A.S., Rice C.M., Stapleton J., et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology.* 2014; 59(1): 318–27. <https://doi.org/10.1002/hep.26744>
9. Borgia S.M., Hedskog C., Parhy B., Hyland R.H., Stamm L.M., Brainard D.M., et al. Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: expanding classification of hepatitis C virus into 8 genotypes. *J. Infect. Dis.* 2018; 218(11): 1722–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy401>
10. Pereboeva L.A., Pereboev A.V., Morris G.E. Identification of antigenic sites on three hepatitis C virus proteins using phage-displayed peptide libraries. *J. Med. Virol.* 1998; 56(2): 105–11. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9071\(199810\)56:2<105::aid-jmv1>3.0.co;2-c](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9071(199810)56:2<105::aid-jmv1>3.0.co;2-c)
11. Chien D.Y., McFarland J., Tabrizi A., Kuo C., Houghton M., Kuo G. Distinct subtypes of hepatitis C virus defined by antibodies directed to the putative core, NS4, and NS5 region polypeptides. In: Nishioaka N., Suzuki S., Mishiro S., Oda T., eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease*. Tokyo: Springer-Verlag; 1994: 320–4.
12. Desombere I., Van Vlierberghe H., Weiland O., Hultgren C., Sällberg M., Quiroga J., et al. Serum levels of anti-NS4a and anti-NS5a predict treatment response of patients with chronic hepatitis C. *J. Med. Virol.* 2007; 79(6): 701–13. <https://doi.org/10.1002/jmv.20846>
13. Orlent H., Desombere I., Hansen B., Van Vlierberghe H., Haagmans B., De Knecht J., et al. Baseline anti-NS4a antibodies in combination with on-treatment quantitative HCV-RNA reliably identifies non responders to peginterferon-ribavirin combination therapy after 4 weeks of treatment. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2010; 22(12): 1443–8. <https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e32833ef6e3>
14. Falada-Nwulia O., Soares-Cuervo C., Nelson D.R., Fried M.W., Segals J.B., Sulkowski M.S. Oral direct-acting agent therapy for

- hepatitis C virus infection: a systematic review. *Ann. Intern. Med.* 2017; 166(9): 637–48. <https://doi.org/10.7326/M16-2575>
15. Mardanova E.S., Blokhina E.A., Tsybalova L.M., Peyret H., Lomonosoff G.P., Ravin N.V. Efficient transient expression of recombinant proteins in plants by the novel pEff vector based on the genome of Potato Virus X. *Front. Plant Sci.* 2017; 8: 247. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00247>
 16. Белявцев А.Н., Мельникова М.В., Шевченко Н.Г., Сапронов Г.В., Вахренев Р.Г., Шастина Н.С., и др. Синтез и анализ свойств иммуногенного фрагмента полипептида NS4A вируса гепатита С. *Биоорганическая химия.* 2021; 47(3): 341–7. <https://doi.org/10.31857/S0132342321030039>
 17. Ohno O., Mizokami M., Wu R.R., Saleh M.G., Ohba K., Orito E., et al. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(1): 201–7. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.1.201-207.1997>
 18. Sanger F., Niclein S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74(12): 5463–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
 19. Nikolaeva L.I., Blokhina N.P., Tsurikova N.N., Voronkova N.V., Miminoshvili M.I., Braginsky D.M., et al. Virus-specific antibody titres in different phases of hepatitis C virus infection. *J. Viral. Hepat.* 2002; 9(6): 429–37. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.2002.00369.x>
 20. Day C.L., Lauer G.M., Robbins G.K., McGovern B., Wurcel A.G., Gandhi R.T., et al. Broad specificity of virus-specific CD4⁺ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 2002; 76(24): 12584–95. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.12584-12595.2002>
 21. Gerlach J.T., Ulsenheimer A., Gruener N.H., Jung M.C., Schraut W., Schirren C.A., et al. Minimal T-cell-stimulatory sequences and spectrum of HLA restriction of immunodominant CD4⁺ T-cell epitopes within hepatitis C virus NS3 and NS4 proteins. *J. Virol.* 2005; 79(19): 12425–33. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.19.12425-12433.2005>
 22. Sarwar M.T., Kausar H., Ijaz B., Ahmad W., Ansar M., Sumrin A., et al. NS4A as a marker of HCV history suggests that different HCV genotypes originally evolved from genotype 1b. *Virology.* 2011; 8: 317. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-317>
 23. Chang J.C., Seidel C., Ofenloch B., Jue D.L., Fields H.A., Khudyakov Y.E. Antigenic heterogeneity of the hepatitis C virus NS4 protein as modeled with synthetic peptides. *Virology.* 1999; 257(1): 177–90. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9612>
 7. Catanese M.T., Uryu K., Kopp M., Edwards T., Andrus L., Rice W.J., et al. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013; 110(23): 9505–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307527110>
 8. Smith D.B., Bukh J., Kuiken C., Muerhoff A.S., Rice C.M., Stapleton J., et al. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology.* 2014; 59(1): 318–27. <https://doi.org/10.1002/hep.26744>
 9. Borgia S.M., Hedskog C., Parhy B., Hyland R.H., Stamm L.M., Brainard D.M., et al. Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: expanding classification of hepatitis C virus into 8 genotypes. *J. Infect. Dis.* 2018; 218(11): 1722–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy401>
 10. Pereboeva L.A., Pereboev A.V., Morris G.E. Identification of antigenic sites on three hepatitis C virus proteins using phage-displayed peptide libraries. *J. Med. Virol.* 1998; 56(2): 105–11. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9071\(199810\)56:2<105::aid-jmv1>3.0.co;2-c](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9071(199810)56:2<105::aid-jmv1>3.0.co;2-c)
 11. Chien D.Y., McFarland J., Tabrizi A., Kuo C., Houghton M., Kuo G. Distinct subtypes of hepatitis C virus defined by antibodies directed to the putative core, NS4, and NS5 region polypeptides. In: Nishioka N., Suzuki S., Mishiro S., Oda T., eds. *Viral Hepatitis and Liver Disease.* Tokyo: Springer-Verlag; 1994: 320–4.
 12. Desombere I., Van Vlierberghe H., Weiland O., Hultgren C., Sällberg M., Quiroga J., et al. Serum levels of anti-NS4a and anti-NS5a predict treatment response of patients with chronic hepatitis C. *J. Med. Virol.* 2007; 79(6): 701–13. <https://doi.org/10.1002/jmv.20846>
 13. Orlent H., Desombere I., Hansen B., Van Vlierberghe H., Haagsmans B., De Knecht J., et al. Baseline anti-NS4a antibodies in combination with on-treatment quantitative HCV-RNA reliably identifies non responders to peginterferon-ribavirin combination therapy after 4 weeks of treatment. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2010; 22(12): 1443–8. <https://doi.org/10.1097/MEG.0b013e3283ef6e3>
 14. Falada-Nwulia O., Soares-Cuervo C., Nelson D.R., Fried M.W., Segasl J.B., Sulkowski M.S. Oral direct-acting agent therapy for hepatitis C virus infection: a systematic review. *Ann. Intern. Med.* 2017; 166(9): 637–48. <https://doi.org/10.7326/M16-2575>
 15. Mardanova E.S., Blokhina E.A., Tsybalova L.M., Peyret H., Lomonosoff G.P., Ravin N.V. Efficient transient expression of recombinant proteins in plants by the novel pEff vector based on the genome of Potato Virus X. *Front. Plant Sci.* 2017; 8: 247. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00247>
 16. Belyavtsev A.N., Shastina N.S., Shevchenko N.G., Nikolaeva L.I., Melnikova M.V., Vahrenev R.G., et al. Synthesis and analysis of properties of an immunogenic fragment from NS4A polypeptide of hepatitis C virus. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. 2021; 47(3): 713–18. <https://doi.org/10.1134/S1068162021030031> (in Russian)
 17. Ohno O., Mizokami M., Wu R.R., Saleh M.G., Ohba K., Orito E., et al. New hepatitis C virus (HCV) genotyping system that allows for identification of HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 3a, 3b, 4, 5a, and 6a. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35(1): 201–7. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.1.201-207.1997>
 18. Sanger F., Niclein S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977; 74(12): 5463–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
 19. Nikolaeva L.I., Blokhina N.P., Tsurikova N.N., Voronkova N.V., Miminoshvili M.I., Braginsky D.M., et al. Virus-specific antibody titres in different phases of hepatitis C virus infection. *J. Viral. Hepat.* 2002; 9(6): 429–37. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2893.2002.00369.x>
 20. Day C.L., Lauer G.M., Robbins G.K., McGovern B., Wurcel A.G., Gandhi R.T., et al. Broad specificity of virus-specific CD4⁺ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection. *J. Virol.* 2002; 76(24): 12584–95. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.24.12584-12595.2002>
 21. Gerlach J.T., Ulsenheimer A., Gruener N.H., Jung M.C., Schraut W., Schirren C.A., et al. Minimal T-cell-stimulatory sequences and spectrum of HLA restriction of immunodominant CD4⁺ T-cell epitopes within hepatitis C virus NS3 and NS4 proteins. *J. Virol.* 2005; 79(19): 12425–33. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.19.12425-12433.2005>
 22. Sarwar M.T., Kausar H., Ijaz B., Ahmad W., Ansar M., Sumrin A., et al. NS4A as a marker of HCV history suggests that different HCV genotypes originally evolved from genotype 1b. *Virology.* 2011; 8: 317. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-317>
 23. Chang J.C., Seidel C., Ofenloch B., Jue D.L., Fields H.A., Khudyakov Y.E. Antigenic heterogeneity of the hepatitis C virus NS4 protein as modeled with synthetic peptides. *Virology.* 1999; 257(1): 177–90. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9612>

REFERENCES



Вирус Эпштейна–Барр (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*) у калмыков и славян, проживающих на территории России: типы вируса, варианты онкогена *LMP1* и злокачественные опухоли

Гурцевич В.Э.¹, Лубенская А.К.¹, Сенюта Н.Б.¹, Душенькина Т.Е.¹, Смирнова К.В.^{1,2}

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова (РНИМУ)» Минздрава России, 117997, Москва, Россия

Введение. Открытие типов вируса Эпштейна–Барр (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*) (ВЭБ) – ВЭБ-1 и ВЭБ-2, обладающих различной трансформирующей способностью *in vitro*, стимулировало изучение их распространённости в популяциях с целью выяснения связи со злокачественными новообразованиями.

Цели работы – изучение распространённости ВЭБ-1 и ВЭБ-2 у представителей 2 этносов России, калмыков и славян, сиквенный анализ онкогена *LMP1* в изолятах вируса и анализ корреляции между типами вируса и заболеваемостью определенными формами опухолей.

Материалы и методы. Из биологического материала смывов полости рта, полученных от этнических калмыков Республики Калмыкия (РК) ($n = 50$) и славян, жителей Московской области (МО) ($n = 40$), выделяли образцы ДНК. Последние использовали для амплификации ДНК ВЭБ, с последующим определением её концентрации на 1 клетку смыва, амплификацией в вирусных образцах онкогена *LMP1*, их секвенированием и определением белковых вариантов *LMP1*.

Результаты. Установлено, что при одинаковой нагрузке ВЭБ среди представителей обоих этносов в группе калмыков соотношение лиц, инфицированных трансформирующим и нетрансформирующим типами вируса, было практически одинаковым (ВЭБ-1 – 51%; и ВЭБ-2 – 49%), а в группе славян доминировал трансформирующий тип ВЭБ-1 (80,6%). Доминантное инфицирование представителей славян 1-м типом вируса (ВЭБ-1) коррелировало с повышенными показателями заболеваемости некоторыми формами опухолей у населения МО при сравнении с аналогичными показателями у населения РК, представители которой инфицированы обоими типами вируса. Различия между сравниваемыми показателями онкозаболеваемости не были статистически значимыми. Анализ вирусных изолятов показал близкий набор вариантов *LMP1* у обеих этнических групп.

Заключение. С целью установления влияния типов ВЭБ на заболеваемость злокачественными новообразованиями необходимы дополнительные исследования с участием представителей различных этнических групп из разных географических регионов.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ); калмыки; славяне; типы ВЭБ-1 и ВЭБ-2; *LMP1*; полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ); сиквенный анализ; опухоли с встречающимися ВЭБ-ассоциированными случаями

Для цитирования: Гурцевич В.Э., Лубенская А.К., Сенюта Н.Б., Душенькина Т.Е., Смирнова К.В. Вирус Эпштейна–Барр (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*) у калмыков и славян, проживающих на территории России: типы вируса, варианты онкогена *LMP1* и злокачественные опухоли. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(3): 246–257. DOI: https://doi.org/10.36233/0507-4088-120

Для корреспонденции: Гурцевич Владимир Эдуардович, д-р мед. наук, главный научный консультант лаборатории вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, 115478, Москва, Россия. E-mail: gurtsevitch-vlad-88@yandex.ru

Участие авторов: Гурцевич В.Э. – идея и дизайн исследования, оформление графического и иллюстративного материала, написание текста статьи; Лубенская А.К. – определение типов вируса, амплификация онкогена; Сенюта Н.Б. – систематизация результатов исследования, анализ сиквенсов, определение вариантов онкогена; Душенькина Т.Е. – сбор и обработка биологического материала; Смирнова К.В. – организация исследования, анализ полученных результатов, редактирование текста.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Благодарности. Авторы выражают признательность всем сотрудникам лаборатории вирусного канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии (НМИЦО) им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии участников исследования. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ ОИМ. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Протокол № 1726 от 15.03.2022).

Поступила 26.04.2022
Принята в печать 02.06.2022
Опубликована 30.06.2022

ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-120>

Epstein–Barr virus (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*) in Kalmyks and Slavs living in Russia: virus types, *LMP1* oncogene variants, and malignancies

Vladimir E. Gurtsevitch¹, Alexandra K. Lubenskaya¹, Natalia B. Senyuta¹,
Tatiana E. Dushenkina¹, Ksenia V. Smirnova^{1,2}

¹Research Institute of Carcinogenesis, FSBI «National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin» of the Ministry of Health of Russia 115478, Moscow, Russia;

²FSAEI HE «Pirogov Russian National Medical University of the Ministry of the Health of Russia (Pirogov Medical University)», 117997, Moscow, Russia

Introduction. The discovery of the Epstein-Barr virus types (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*) (EBV) – EBV-1 and EBV-2, which have different transforming abilities in vitro, stimulated the study of their prevalence in populations in order to elucidate the relationship with malignant neoplasms.

The aims of the work are to study the prevalence of EBV-1 and EBV-2 among representatives of 2 ethnic groups of Russia, Kalmyks and Slavs, sequencing analysis of the *LMP1* oncogene in virus isolates, and analysis of the correlation between virus types and the incidence of certain forms of tumors.

Materials and methods. DNA samples were isolated from the biological material of oral swabs obtained from ethnic Kalmyks of the Republic of Kalmykia (RK) ($n = 50$) and Slavs, residents of the Moscow Region (MR) ($n = 40$). DNA samples were used to amplify EBV DNA, followed by determination of its concentration per 1 cell of washout, amplification of the *LMP1* oncogene in viral samples, their sequencing, and determination of *LMP1* protein variants.

Results. It has been established that with the same burden of EBV among representatives of both ethnic groups in the Kalmyk group, the ratio of persons infected with transforming and non-transforming types of the virus was almost the same (EBV-1 – 51%; and EBV-2 – 49%). Meanwhile, in the group of Slavs the transforming EBV-1 type virus dominated (80.6%). The predominance of EBV-1 type in representatives of the Slavs correlated with increased incidence of certain forms of tumors in the population of the MR when compared with similar values in the population of the RK, where both types of the virus were prevalent. Differences between the compared rates of cancer incidence were not statistically significant. Analysis of viral isolates showed a similar set of *LMP1* variants in both ethnic groups.

Conclusion. In order to establish the influence of EBV types on the incidence of malignant tumors, additional studies involving representatives of various ethnic groups from different geographical regions are needed.

Keywords: Epstein–Barr virus (EBV); EBV-1 and EBV-2 types; latent membrane protein 1 (*LMP1*); sequence analysis; Kalmyks; Slavs; real-time polymerase chain reaction (PT-PCR); tumors with EBV-associated cases

For citation: Gurtsevitch V.E., Lubenskaya A.K., Senyuta N.B., Dushenkina T.E., Smirnova K.V. Epstein–Barr virus (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*) in Kalmyks and Slavs living in Russia: virus types, *LMP1* oncogene variants, and malignancies. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(3): 246–257. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-120>

For correspondence: Vladimir E. Gurtsevitch, D. Sci. (Med.), Chief Scientific Advisor, Viral Carcinogenesis Laboratory, Research Institute of Carcinogenesis, FSBI «National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin» of the Ministry of Health of Russia 115478, Moscow, Russia. E-mail: gurtsevitch-vlad-88@yandex.ru

Information about the authors:

Gurtsevitch E.V., <https://orcid.org/0000-0003-1840-4364>

Lubenskaya A.K., <https://orcid.org/0000-0003-3953-7449>

Senyuta N.B., <https://orcid.org/0000-0001-8915-8274>

Dushenkina T.E., <https://orcid.org/0000-0001-8279-514X>

Smirnova K.V., <https://orcid.org/0000-0001-6209-977X>

Contribution: Gurtsevitch V.E. – study idea and design, preparing of graphic and illustrative material, text writing; Lubenskaya A.K. – virus types determination, oncogene amplification; Senyuta N.B. – study results systematization, sequences analysis, oncogene variants determination; Dushenkina T.E. – biological material collection and processing; Smirnova K.V. – study organization, results analysis, text editing.

Funding. The research was funded by the State budget.

Acknowledgement. The authors are grateful to the colleagues of the Viral Carcinogenesis Laboratory, Research Institute of Carcinogenesis, FSBI «National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin» of the Ministry of Health of Russia.

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

Ethics approval. The study was conducted with the informed consent of the study participants. The research protocol was approved by the Ethics Committee of the Research Institute of Carcinogenesis, FSBI «National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Blokhin» of the Ministry of Health of Russia (Protocol No. 1726 dated March 15, 2022).

Received 26 April 2022
Accepted 02 June 2022
Published 30 June 2022

Введение

Вирус Эпштейна–Барр (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Lymphocryptovirus: Human gammaherpesvirus 4*) (ВЭБ, EBV) – один из наиболее распространённых на земном шаре вирусных патогенов. Ранее этот агент обозначался как *Human herpesvirus 4 (HHV4)* [1]. Сложный геном ВЭБ состоит из линейной двухцепочечной ДНК длиной 170–185 т.п.н., включающей около 85 возможных кодирующих областей [2]. Единственный естественный хозяин вируса – человек. Известно, что свыше 90% взрослого населения планеты являются носителями ВЭБ [3]. Заражение происходит в раннем детском возрасте и протекает бессимптомно; при этом инфицированный пожизненно остаётся носителем вируса, как правило, без каких-либо клинических проявлений. В некоторых случаях ВЭБ принимает участие в возникновении доброкачественных или злокачественных новообразований. Количество их впервые выявленных случаев может достигать 200 тыс. в год [3, 4]. В отличие от других онкогенных вирусов человека, таких как вирусы папилломы (*Papillomaviridae: Alphapapillomavirus: Human papillomavirus*), полиомавируса клеток Меркеля (*Polyomaviridae: Alphanpolyomavirus: Human polyomavirus 5*; прежнее название – *Merkel cell polyomavirus*) (MCPyV, MCV), вирус Т-клеточного лейкоза взрослых 1-го типа (*Retroviridae: Deltaretrovirus. Primate T-lymphotropic virus 1: Human T-lymphotropic virus 1*) (HTLV-1), вирус гепатита В (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*) (HBV), проявляющих свой онкогенный потенциал только по отношению к определённым клеткам-мишеням, ВЭБ обладает широким клеточным тропизмом. С ним ассоциировано возникновение целого спектра новообразований лимфоидного и эпителиального происхождения. В частности, данный патоген известен как этиологический агент для 2 нозологических форм В- и Т/НК-клеточных злокачественных лимфопролиферативных заболеваний (В-cell/Т/НК-cell lymphoproliferative disorders; В-LPD и Т/НК-LPD). Показана роль ВЭБ в возникновении по крайней мере 9 патогенетически различающихся неоплазий. К ним относятся лимфомы Бёркитта (Burkitt Lymphoma, BL) и Ходжкина (Hodgkin lymphoma, HL), диффузная В-крупноклеточная лимфома (diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL), плазмобластная (плазмо-

бластическая) лимфома (plasmablastic lymphoma, PBL), лимфома из Т/НК-клеток (natural killers – натуральных, или естественных, киллеров) (NK/T-cell lymphoma), рак носоглотки (nasopharyngeal carcinoma, NPC) и рак желудка (gastric carcinoma, GC), лейомиосаркома, а также первичная выпотная лимфома (primary effusion lymphoma PEL), в которой всегда присутствует вирус саркомы Капоши (*Herpesviridae: Gammaherpesvirinae: Rhadinovirus: Human gammaherpesvirus 8*) (KSHV) [3]. Из этих 9 опухолей 5, в том числе PEL, происходят из В-клеточной популяции. Другие же новообразования развиваются из инфицированных Т- и/или НК-клеток, а также из эпителия носоглотки, желудка и гладких мышц у лиц с иммунодефицитным синдромом.

В ходе эволюции ВЭБ приобрёл уникальный набор латентных, так называемых рост-трансформирующих генов. Спектр их активации в разных инфицируемых субстратах включает несколько вариантов, обозначаемых типами латенции (программы роста) [5]. Для содержащих вирусный геном лимфобластоидных клеточных линий (lymphoblastoid cell lines, LCL) характерен III тип латенции, включающий экспрессию кодируемых вирусом ядерных антигенов EBNA-1 (поддерживает среди прочего эписомальное состояние генома ВЭБ), EBNA-2, -3A, -3B, -3C и EBNA-LP (активаторы/регуляторы транскрипции), а также латентных мембранных белков LMP1 (latent membrane protein 1, латентный мембранный белок 1), LMP2A и LMP2B (сигнальные преобразователи). На низком уровне экспрессируются EBER – ВЭБ малые некодирующие, нкРНК ВЭБ, и два блока микроРНК (так называемые BHRF1- и BART-miRNAs). Латенция II типа, сопровождаемая экспрессией EBNA-1, LMP1, LMP2A/2B, а также EBER и BART-miRNAs, характерна для HL и NPC. Наконец, определяемый в клетках ВЭБ-позитивной BL вариант латенции I типа характеризуется экспрессией EBNA-1, EBER и BART-miRNAs.

На основе генетического полиморфизма, обнаруженного в генах *EBNA-2*, *-3A*, *-3B* и *-3C*, идентифицированы два основных штамма ВЭБ, соответствующие его типам: ВЭБ-1 и ВЭБ-2 [6]. Результаты многочисленных исследований показали, что в разных географических регионах они встречаются с неодинаковой частотой [7]. При этом важным отличием одного типа

ВЭБ от другого выступает их неодинаковая трансформирующая активность *in vitro*. ВЭБ-1 легко трансформирует В-клетки в культуре ткани, что обуславливает рост иммортализованных LCL, тогда как ВЭБ-2 подобным свойством не обладает [6, 8]. Различная способность к иммортализации В-клеток *in vitro* позволяет предположить, что *in vivo* вирусы этих типов используют альтернативные подходы для установления латенции. Имеются данные в пользу того, что, в отличие от ВЭБ-1, ВЭБ-2 характеризуется уникальным тропизмом к Т-клеткам, являясь естественной частью его жизненного цикла [8]. Относительно же ВЭБ-2 парадокс заключается и в том, что хотя заражение В-клеток в культуре не приводит к образованию LCL, ВЭБ-2 регулярно выявляется в клетках эндемической BL [9]. Таким образом, неспособность к В-клеточной трансформации *in vitro* не свидетельствует об отсутствии онкогенного потенциала вируса этого типа *in vivo*.

Экспериментальные исследования продемонстрировали, что из более чем 85 генов ВЭБ наиболее выраженным трансформирующим и онкогенным потенциалом обладает *LMP1*, что послужило основанием отнести его к основным (классическим) онкогенам вируса [10]. Кодированный этим геном одноимённый протеин состоит из 356 аминокислот, включает короткий цитоплазматический N-концевой домен, 6 трансмембранных и длинный цитоплазматический C-концевой домен [11]. *LMP1* характеризуется способностью стимулировать клеточный рост, ингибировать апоптоз и усиливать подвижность клеток различных типов *in vitro*, вызывать трансформацию фибробластов грызунов (*Rodentia*) и В-лимфоцитов человека, а также индуцировать гиперплазию и лимфому у трансгенных мышей (*Mus*) [12]. При этом белок отличается выраженным полиморфизмом, часто отражающим географическое происхождение вируса, что позволило R.H. Edwards и соавт. в 1999 г. предложить широко используемую в настоящее время классификацию. В соответствии с ней все изученные авторами образцы *LMP1* разделены на варианты, различающиеся по содержанию ключевых аминокислотных замен по отношению к прототипному варианту *LMP1*-B95.8 [13]. В предложенной классификации разновидности *LMP1* получили названия в соответствии с географическим происхождением: Alaskan (Ala), China1, -2 и -3 (Chi1, Chi2, Chi3), Mediterranean+ (Med+), Mediterranean- (Med-) и North Carolina (NC). В последнее время описаны несущие уникальные аминокислотные замены новые варианты *LMP1* в штаммах ВЭБ из Таиланда (Thai1 и Thai2), Юго-Восточной Азии (SEA1, SEA2) и Аргентины (Arg) [14–16].

Обнаружение новых, ранее не известных разновидностей *LMP1* позволяет предположить связь молекулярной структуры вируса и его онкогена *LMP1* не только с географическим регионом происхождения, но и с генетическими особенностями населения (этносов), проживающих в этих регионах. Процесс отбора вирусных рекомбинантов и/или вариантов ВЭБ *in vivo* протекает под влиянием иммунного надзора и определяется способностью патогена сохраняться на протяжении своего жиз-

ненного цикла в организме. В свою очередь, иммунный надзор зависит от типов МНС (major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости), так как функциональные эпитопы подвергаются модификациям в зависимости от их представления антигенам МНС. Поскольку преобладающие типы последнего различаются между этносами и популяциями из разных географических регионов, указанные факторы могут иметь важное значение в определении структурных модификаций вируса [17, 18].

Целью настоящей работы позиционировано определение уровня инфицированности и преобладающих типов ВЭБ у этнических калмыков из Республики Калмыкия (РК) и этнических славян Московской области (МО) в продолжение исследований, посвящённых изучению особенностей ВЭБ-инфекции у древних этносов Российской Федерации [19]. Представлялось также важным установить превалирующие варианты гена *LMP1* у штаммов, инфицирующих представителей указанных этносов, а также выявить возможную зависимость показателей заболеваемости населения РК и МО злокачественными новообразованиями, в состав которых могут входить ВЭБ-ассоциированные опухоли, от типа ВЭБ.

Материалы и методы

Объекты исследования. Изучению подвергали смывы полости рта (СПР) 50 жителей г. Элисты (столица РК), являющихся этническими калмыками не менее чем в 3 поколениях. Данная группа состояла из 19 мужчин и 31 женщины; средний возраст их составлял 38,8 года. Аналогичные образцы биологического материала получали от коренных жителей МО, этнических славян – 21 мужчины и 19 женщин (средний возраст – 34,7 года). Каждый смыв представлял собой суспензию клеток, полученных индивидуально от каждого лица, после полоскания полости рта в течение 30 с стерильным физиологическим раствором (0,9% хлорида натрия, NaCl) в объёме 15 мл. Образцы смывов, собранные в герметично закрывающиеся пластиковые пробирки, хранились при температуре 4°C не более 2 сут до начала исследования. От всех участников получено письменное информированное согласие на проведение исследовательского протокола. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «НМИЦО им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (Протокол № 1726 от 15.03.2022).

Экстракция ДНК и амплификация гена *LMP1*. Из собранных после центрифугирования клеток СПР выделяли тотальную ДНК путём фенол-хлороформной депротенинизации (экстракции). Наличие и концентрацию ДНК ВЭБ в выделенных образцах анализировали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), описанным нами ранее [19]. Амплификацию гена *LMP1* проводили в два этапа с внешними и внутренними праймерами в соответствии с использованной нами ранее методикой [20]. Каждый ПЦР-продукт очищали на мини-колонке (QIAquick PCR Purification kit, cat. 28104, Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Для ре-

акции использовали ~100–200 нг ПЦР-продукта; концентрацию ДНК оценивали визуально в агарозном геле. В качестве положительного контроля служила выделенная из клеточной линии LMP1-B95.8 (стандарт) ДНК в количестве 1 мкг, а отрицательного контроля – вода (H₂O).

Типирование ВЭБ. Детекцию нуклеиновой кислоты ВЭБ 1-го и 2-го типов осуществляли посредством гнёздной (гнездовой, или «вложенной») ПЦР (англ. nested PCR). Используемые праймеры продемонстрировали высокую специфичность и отсутствие перекрёстной реактивности с геномом человека, другими вирусами или микроорганизмами [21]. Пары праймеров были следующими:

1-й этап амплификации – 5'-AGG GAT GCC TGG ACA CAA GA-3' и 5'-TGG TGC TGC TGG TGG TGG CAA-3';

2-й этап амплификации:

для ВЭБ-1 – 5'-TCT TGA TAG GGA TCC GCT AGG ATA-3' и 5'-ACC GTG GTT CTG GAC TAT CTG GAT C-3';

для ВЭБ-2 – 5'-CAT GGT AGC CTT AGG ACA TA-3' и 5'-AGA CTT AGT TGA TGC TGC CCT AG-3'.

Первый раунд ПЦР осуществляли в смеси объёмом 24 мкл, которая включала: 3 мкл матрицы; 2,5 мкл 10x буфера для ПЦР (pH 8,3); 0,2 мкл ДНК-полимеразы; по 0,2 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата общим объёмом 0,2 мкл; 0,6 мкл внешних праймеров (в разведении 5 пкМ на 100 мкл) и 17,5 мкл стерильной H₂O. Проводимая в амплификаторе для ДНК Mastercycler Personal (Eppendorf, Германия) ПЦР-амплификация включала этап начальной денатурации при 94°C в течение 5 мин, затем 30 циклов: денатурация при 94°C на протяжении 30 с, отжиг праймеров при 60°C – 30 с, элонгация при 72°C – 1 мин с заключительным шагом элонгации при 72°C в течение 5 мин.

Второй раунд амплификации выполняли в другой пробирке с 3 мкл ПЦР-продукта первого раунда в качестве матрицы. Состав ПЦР-смеси был следующим: 2,5 мкл 10x буфера для ПЦР (pH 8,3); 0,2 мкл ДНК-полимеразы; по 0,2 мМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата общим объёмом 0,2 мкл; 0,6 мкл внутренних праймеров (в разведении 5 пкМ на 100 мкл) и 17,9 мкл стерильной воды. ПЦР-амплификацию проводили также на приборе Mastercycler Personal (Eppendorf). Программа для второго раунда ПЦР состояла из 35 циклов денатурации при 94°C в течение 30 с, отжига при 55°C – 30 с, элонгации при 72°C – 1 мин 30 с и заключительной стадии элонгации при 72°C на протяжении 7 мин.

Положительные контроли включали очищенную ДНК из линии человеческих клеток BL Namalva. Ампликоны обнаруживали с помощью электрофореза, используя 12 мкл образца в 1,5% агарозном геле с содержанием 1 мкг/мл бромида этидия (C₂₁H₂₀BrN₃). Ожидаемые размеры целевых фрагментов ВЭБ-1 и ВЭБ-2 составляли 497 и 165 п.н. соответственно. ПЦР-анализ повторяли дважды для каждого клинического образца.

Количественное измерение вирусной ДНК. Число копий ДНК ВЭБ в каждом СПР определяли посредством ПЦР-РВ, следуя методике, описанной в работе Y.M. Lo и соавт. [22]. Для построения калибровочных кривых использовали ДНК клеточной линии Namalva, содержащих 2 интегрированных вирусных генома; при этом исходили из соотношения 3,3 пг геномной ДНК на 1 копию нуклеиновой кислоты вируса [23]. Детали проведения реакции описаны нами ранее [24].

Секвенирование ПЦР-продуктов гена LMP1. Ампликоны LMP1 секвенировали в обоих направлениях. Процесс секвенирования осуществляли с применением набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v. 3.1 (ThermoFisher Scientific, США) и последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ДНК ABI PRISM 3100-Avant (ThermoFisher Scientific). Обработку данных выполняли при помощи программ Chromas 230 и Vector NT (Invitrogen, США).

Классифицирование образцов гена LMP1. Нуклеотидные последовательности образцов LMP1, амплифицированные из смывов ротоглотки и транслированные в аминокислотные последовательности, подверглись анализу на основании известной в литературе классификации R.H. Edwards и соавт. [13]. Последняя сформирована на базе сиквенсного анализа транслированных последовательностей гена LMP1, полученных от имеющих ВЭБ-ассоциированные заболевания и здоровых вирусоносителей из различных географических регионов мира.

Статистический анализ. Количество копий ДНК ВЭБ в СПР участников исследуемых групп оценивали с использованием U-критерия Манна–Уитни. Результаты представляли в виде значений медиан с межквартильным интервалом (МКИ) (25-й и 75-й процентиля). При помощи точного теста Фишера (Fisher's exact test) рассчитывали точные величины *p* при сравнении числа инфицированных ВЭБ 1-го или 2-го типов; различия считали статистически значимыми при *p* ≤ 0,05. Вычисления производили с помощью статистических программных пакетов Statistica for Windows v10.0.

Результаты

Инфицированность ВЭБ в группах калмыков и славян, типы вируса. Проведённое исследование показало, что уровни инфицированности ВЭБ полости рта у представителей калмыков и славян приблизительно одинаковы (табл. 1). Значение медианы копий вирусной ДНК на 1 клетку СПР у представителей каждой этнической группы практически равнялось нулю (*M* = 0,007 и 0,000 соответственно) при незначительно различающихся МКИ. Указанные факты позволяют предположить, что показатели концентрации вируса в кровеносном русле сравниваемых групп также существенно не различаются.

Изучение типов вируса у представителей указанных популяций позволило выявить соотношение ВЭБ-1 и ВЭБ-2, а также концентрацию патогена в каждой из них (рис. 1).

Как следует из **рис. 1**, ВЭБ обоих типов в группе калмыков распределились приблизительно одинаково (52% для 1 и 48% – для 2-го типа вируса), в то время как у славян ВЭБ-1 доминировал по отношению к ВЭБ-2 (80,6 против 19,4% соответственно). Различие в этих показателях для 1-го и 2-го типов ВЭБ, обнаруженное у представителей обоих этносов, свидетельствует о том, что этнический, а возможно, географический и другие факторы могут существенно влиять на распространённость и соотношение типов ВЭБ в разных этнических популяциях РФ. Из **рис. 1** также видно, что в группе калмыков число смывов, содержащих копии вирусной ДНК (обоих типов) было несколько выше, чем у славян (70,2%; 33/47 против 48,6%; 18/37 соответственно). Указанный факт может быть объяснён большим количеством вирусосодержащих клеток в образцах СПР в первом случае.

Полиморфизм гена LMP1 ВЭБ у калмыков и славян. Распределение вариантов гена *LMP1* в изолятах вируса, полученных из биоматериала представителей калмыцкого и славянского этносов, отражает характер полиморфизма штаммов ВЭБ (в частности, в STAR областях изучаемых образцов онкобелка), циркулирующих в соответствующих популяциях (**табл. 2**). Анализ нуклеотидных и дедуктивных аминокислотных последовательностей 29 ампликонов *LMP1*, полученных из СПР калмыков ($n = 50$) и славян ($n = 40$), выявил определённые черты сходства. Во всех случаях доминировали образцы *LMP1*, относящиеся к его прототипному варианту LMP1-B95.8 (75,9 и 82,5% соответственно). В обеих этнических группах обнаружены и другие разновидности белка: Med– (3,4 и 2,5% соответственно) и NC (3,4 и 7,5% соответственно). Отличие же состояло в том, что вариант China выявлялся только у славян (75,9%), а Med+ – среди калмыков. Обе эти разновидности характеризуются наличием так называемой Сао-делеции (по названию варианта гена *LMP1* Сао, амплифицированного из опухолевой ткани больного с NPC в 2000-х гг.) и относятся к высоко трансформирующим вариантам [25].

Сиквенный анализ амплифицированных образцов *LMP1* группы калмыков позволил в 6 образцах из 29 (20,7%) обнаружить в области STAR2 (С-терминальная активирующая область, С-terminal activator region) Сао-ассоциированную замену S366A/T, а в области STAR3 (8 проб из 29) – замену S309T/N. Следует отметить, что 5 проб этой группы *LMP1* содержали делецию 30 п.н. (позиции 326–355), формирующую, в свою очередь, характерную для варианта del-LMP1 делецию 10 аминокислот [26]. О том, насколько подобные мутации типичны для всей указанной популяции, вероятно, можно будет судить при существенном расширении выборки наблюдений.

Генотипирование изолятов ВЭБ в образцах группы этнических калмыков. Известно, что С-концевой домен *LMP1* имеет три С-терминальных активирующих области, инициирующих процессы передачи сигналов: STAR1 (регион 191–232 а.о.), STAR2 (351–386 а.о.) и расположенную между ними STAR3 (275–330 а.о.). Показано также, что этот домен содержит различное число повторов (мотивов), состоящих из локализованных между позициями 253 и 306 а.о. 11 аминокислот (PQDPDNTDDNG) [11, 27]. При этом прототипный вариант LMP1-B95.8 содержит 4 аналогичных фрагмента, а также 2 вставки из 5 аминокислот (PHDPL): между 2 и 3 повторами (275–279 а.о.) и после последнего повтора (302–306 а.о.). Высокотрансформирующий вариант LMP1-Сао несёт 7 указанных повторов и вставку PHDPL, локализованную также после последнего повтора. Значение изменения количества повторяющихся участков PQDPDNTDDNG до настоящего времени не известно. Состоящая же из 5 аминокислот вставка представляет собой так называемый JAK3-сайт области STAR3 (275–330 а.о.), предположительно участвующей в JACK3/STAT-сигналинге [23, 27].

Анализ 29 образцов *LMP1*, полученных из СПР этнических калмыков, позволил в 24 (82,3%) случаях выявить структуру, состоящую из фрагмента в 11 аминокислот и вставки PHDPL, подобную прототипному варианту LMP1-B95.8 (**рис. 2**).

Остальные 5 образцов содержали 7 повторов из 11 аминокислот и вставку 5 фрагментов PHDPL так-

Таблица 1. Инфицированность полости рта вирусом Эпштейна–Барр в группах калмыков и славян

Table 1. The rate of Epstein–Barr virus infection of the oral cavity of the Kalmyks and Slavs

Показатель Parameter	Этнические калмыки, Республика Калмыкия Ethnic Kalmyks, Republic of Kalmykia	Этнические славяне, Московская область Ethnic Slavs, Moscow Region
Число обследованных, мужчины/женщины (n) Number of persons studied, male/female (n)	19/31	15/25
Средний возраст (годы) Average age (years)	38,8	34,7
Число копий вируса на 1 клетку смыва полости рта Number of virus copies per 1 cell of oral cavity wash sample	МКИ/IQR = 0,000–0,184 Медиана/Median = 0,007	МКИ/IQR = 0,000–0,257 Медиана/Median = 0,000
Всего Total	50	40

Примечание. МКИ – межквартильный интервал.

Note. IQR, interquartile range.

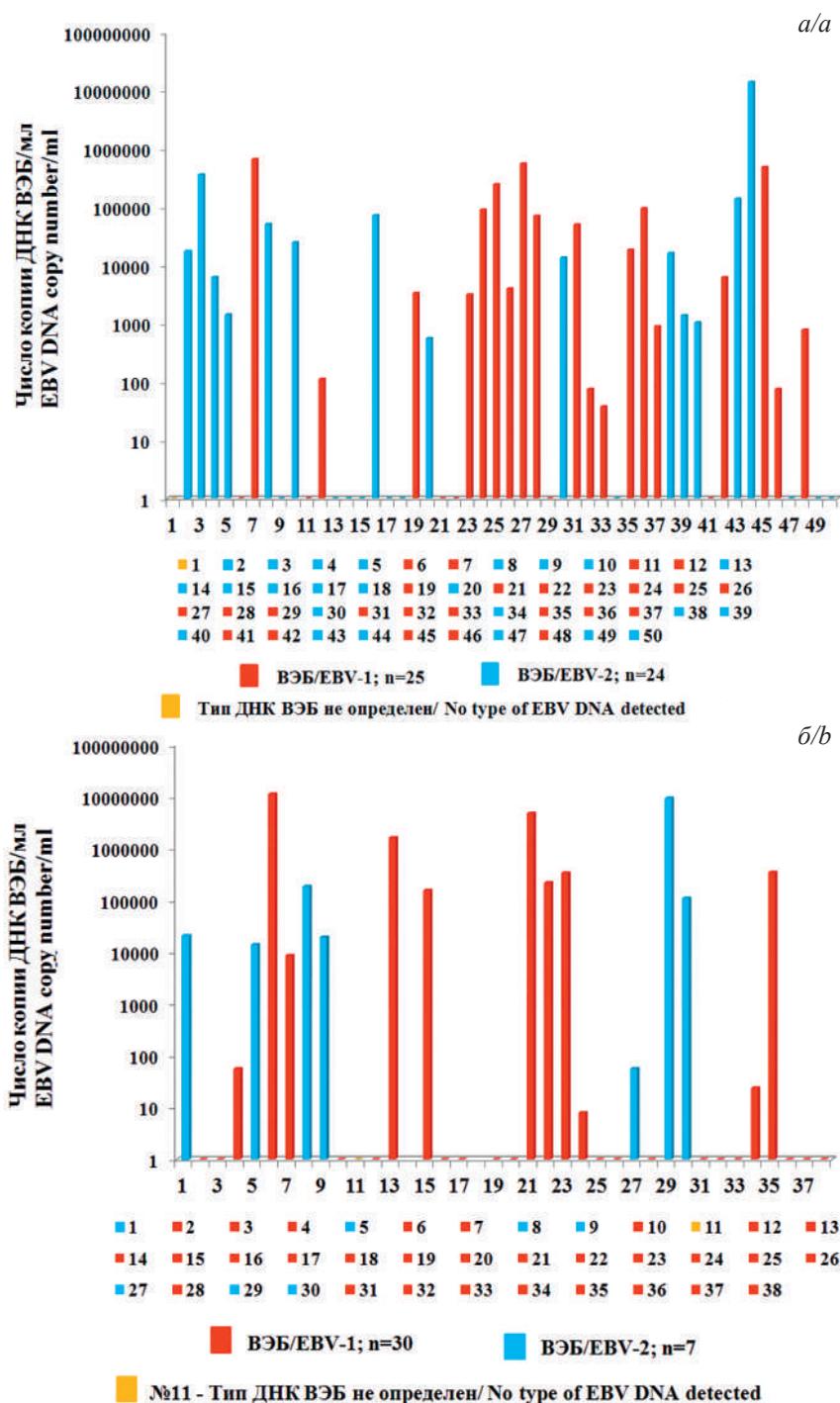


Рис. 1. Типы вируса Эпштейна–Барр и концентрация ДНК в 1 мл смыва полости рта: *а* – в группе калмыков; *б* – в группе славян.
Fig. 1. Epstein–Barr virus types and DNA concentrations per 1 ml of oral cavity wash sample: *a*, in the Kalmyk group; *b*, in the Slavic group.

же после последнего повтора. Точечные (сайт-специфические) мутации D (Asp, аспарагиновая кислота) → G (Gly, глицин) в области повторов PQDPDNTDDMG наблюдали в 7 образцах.

На основании полученных данных можно заключить, что образцы LMP1 из группы калмыков обладают структурой повторяющихся элементов, подобной вариантам LMP1-B95.8 африканского и японского

происхождения [28]. Однако, в отличие от японских разновидностей белка, у вариантов LMP1 из РК встречаются точечные замены D→G, как и в LMP1-образцах других российских изолятов [28]. Различие в числе повторов фрагмента PQDPDNTDDMG и вставок PNDPL (JAK3-мотива) объясняется рекомбинациями, имеющими место в процессе репликации вируса [27]. Существуют также гипотезы, предполагающие зави-

Таблица 2. Полиморфизм гена *LMP1* в изолятах вируса Эпштейна–Барр из смывов полости рта в группах калмыков и славян
Table 2. *LMP1* gene polymorphism in Epstein–Barr virus isolates from oral cavity wash samples in groups of Kalmyks and Slavs

Число обследованных (<i>n</i>) Number of persons studied (<i>n</i>)	Число образцов <i>LMP1</i> (<i>n</i> %) Number of <i>LMP1</i> samples (absolute value/percentage)	Варианты <i>LMP1</i> по классификации Edwards и соавт. (1999) [13] из числа положительных образцов <i>LMP1</i> variants according to classification of Edwards et al. (1999) [13] out of positive samples					Мутации в областях STAR гена <i>LMP1</i> (позиции а.о.) (<i>n</i> %) Mutations in STAR regions of the <i>LMP1</i> gene (aa positions) (absolute value/percentage)		
		B95.8	China	Med+	Med–	NC	STAR1 191–232	STAR2 351–386	STAR3 275–330
Этнические калмыки, Республика Калмыкия Ethnic Kalmyks, Republic of Kalmykia									
50	29 (58,0)	22/29 (75,9%)	0/29 (0,0%)	5/29 (17,2%)	1/29 (3,4%)	1/29 (3,4%)	0 (0,0%)	S366A/T: 6/29 (20,7%)	S309T/N: 8/29 (27,6%)
Этнические славяне, Московская область Ethnic Slavs, Moscow region									
40	40 (100,0)	33/40 (82,5%)	3/40 (7,5%)	0/40 (0,0%)	1/40 (2,5%)	3/40 (7,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)

Примечание. STAR – С-терминальная активирующая область. B95.8, China, Med+, Med–, NC – варианты *LMP1* ВЭБ.

Note. STAR, C-terminal activator region. B95.8, China, Med+, Med–, NC are EBV *LMP1* variants.

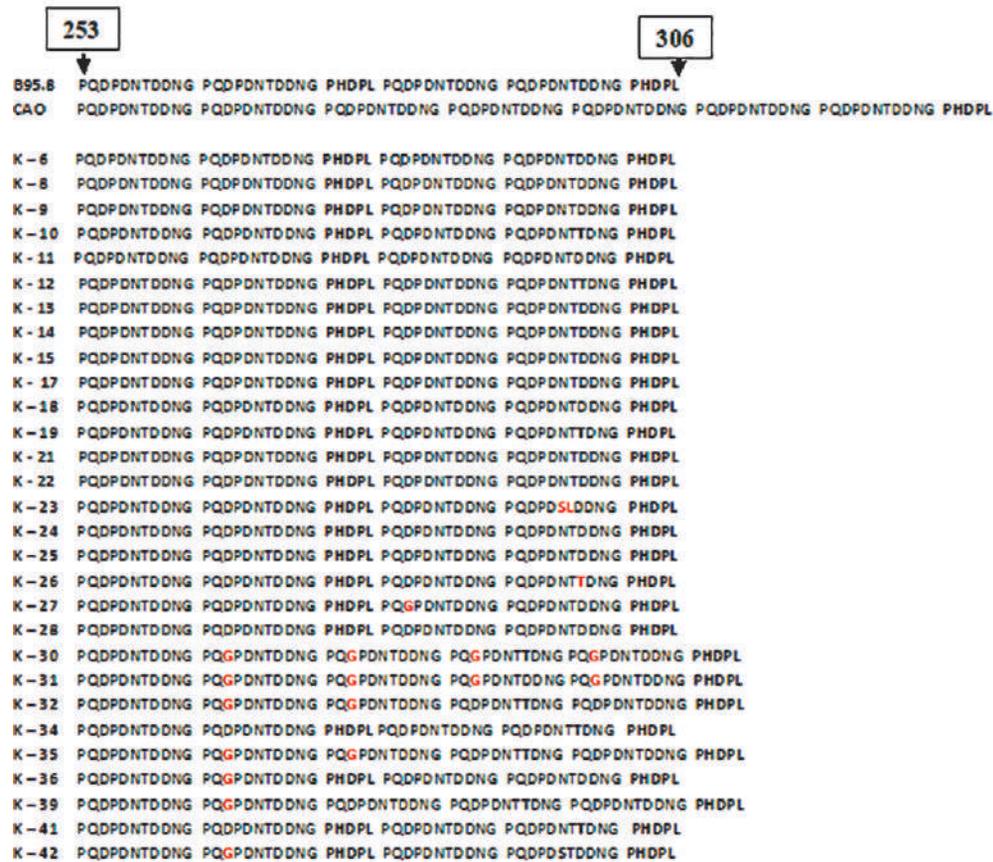


Рис. 2. Варианты повторов участков из 11 аминокислот в С-концевом домене изолятов гена *LMP1* вируса Эпштейна–Барр в группе этнических калмыков (Республика Калмыкия).

Примечание. B95.8, Cao – варианты гена *LMP1*; K-6–K-42 – кодовое обозначение изолятов *LMP1* группы калмыков; PQDPDNTDDNG – повторяющаяся группа 11 аминокислот; PHDPL – вставка из 5 последовательностей аминокислот (выделена жирным); D→G – точечные (сайт-специфические) мутации в области фрагмента из 11 аминокислот (позиции выделены красным цветом). Названия аминокислот даны в соответствии с международной номенклатурой.

Fig. 2. Variants of 11 amino acid repeat fragments in the C-terminal domain of Epstein–Barr virus *LMP1* gene in isolates from a group of ethnic Kalmyks, Republic of Kalmykia.

Note. B95.8, Cao are variants of the *LMP1* gene; K-6–K-42, coding for *LMP1* isolates from the Kalmyk group; PQDPDNTDDNG, repeat fragment of 11 amino acid residues; PHDPL, insertion of 5 amino acid residues (highlighted in bold); D→G, point (site-specific) mutations in 11 amino acid fragment (positions highlighted in red). The names of the amino acids are given according to the international nomenclature.

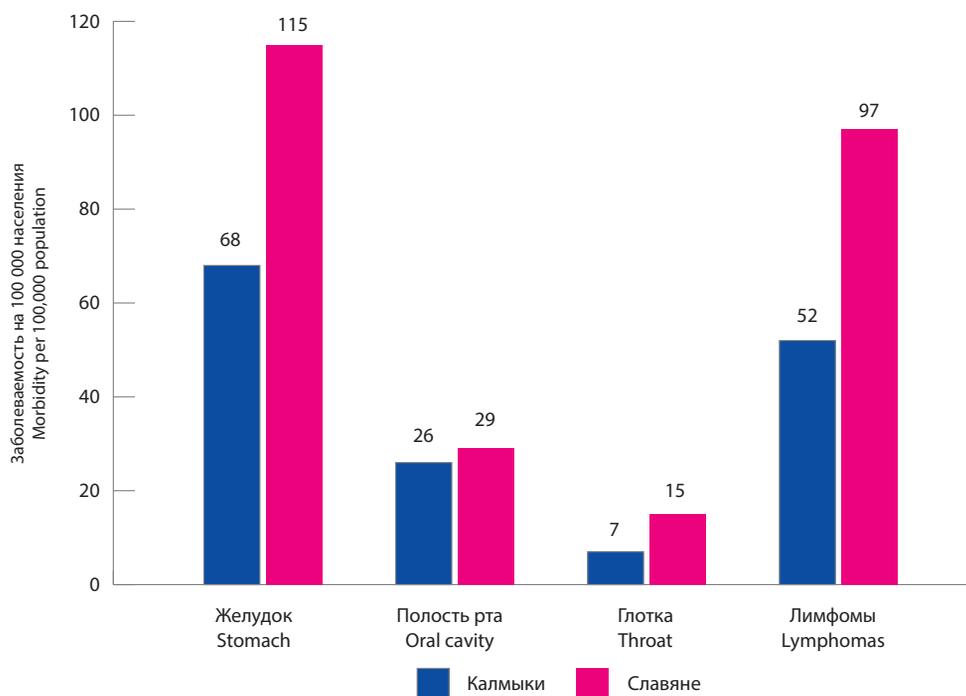


Рис. 3. Заболеваемость злокачественными опухолями, частично ассоциированными с вирусом Эпштейна–Барр, у населения Республики Калмыкия и Московской области в 2019 г.

Fig. 3. Incidence of malignant tumors partially associated with Epstein-Barr virus in the population of the Republic of Kalmykia and Moscow Region in 2019.

симость мутационных изменений от географического происхождения штаммов ВЭБ [29].

Корреляция типов ВЭБ с заболеваемостью злокачественными опухолями. Анализ взаимосвязи между типами ВЭБ у представителей двух этносов и уровнями заболеваемости злокачественными новообразованиями различных локализаций в соответствующих популяциях показал, что (рис. 3) заболеваемость злокачественными новообразованиями желудка и лимфомами у славянского населения МО была примерно в 2 раза выше, чем у населения РК.

Доминирование трансформирующего *in vitro* типа ВЭБ-1 среди этнических славян позволило предположить наличие более высокой заболеваемости соответствующими новообразованиями в МО (с весьма значительной долей славянского населения) по сравнению РК, где калмыки составляют 57,4%, при том, что представители обеих этнических групп инфицированы обоими типами ВЭБ примерно в равном соотношении. Действительно, стандартизованные показатели заболеваемости на 100 тыс. населения МО раком желудка, полости рта, глотки и злокачественными лимфомами, (среди которых встречались ВЭБ-ассоциированные случаи), были существенно выше, чем у населения РК (115, 29, 15 и 97 против 68, 26, 7 и 52 соответственно); различия, однако, оказались статистически недостоверными ($p > 0,05$). Полученные данные находятся в соответствии с зарубежными публикациями, согласно которым в странах с преобладающим распространением вируса 1-го типа, обладающего (в отличие от ВЭБ-2) способностью

трансформировать В-клетки *in vitro*, повышенная заболеваемость ВЭБ-ассоциированными опухолями не установлена [30]. По мнению ряда авторов, распространение вируса 2-го типа, характеризующегося Т-клеточным тропизмом, также не сопровождается ростом частоты ВЭБ-ассоциированных нозологических форм у населения [31].

Обсуждение

ВЭБ этиологически связан с развитием доброкачественных и злокачественных новообразований человека, характеризующихся их разнообразием и неоднородным распределением по всему миру. Изучение полиморфизма генов, влияющих на биологические функции вируса, призвано объяснить географические различия рисков возникновения ВЭБ-ассоциированных заболеваний, установить роль вируса в их возникновении и тем самым способствовать созданию эффективной вакцины против этого агента.

Полученные нами в настоящем и предыдущих исследованиях результаты свидетельствуют о том, что у этносов одной и той же страны (Российской Федерации) оба типа ВЭБ могут персистировать в разных соотношениях. В частности, по нашим данным, среди адыгейцев, проживающих на территории Республики Адыгея [32], доминирует тип 2 вируса (81%), в популяциях славян МО и татар Республики Татарстан [19] преобладает ВЭБ-1 (81 и 71% соответственно), а у калмыков РК наблюдается приблизительно равное распределение обоих типов (52 и 48% соответственно). Факт и характер инфицирования ВЭБ того или

инога типа, по-видимому, зависят от многих причин, включая генотип этносов, который, вероятно, способен определять исход инфекции, проявляющейся либо в форме хронического вирусоносительства, либо ВЭБ-ассоциированной патологии.

Результаты работы показали, что обнаружение у представителей обоих этносов того или иного типа ВЭБ не оказывает влияния на показатели заболеваемости опухолями (среди которых встречаются ВЭБ-ассоциированные случаи) у населения, представляющих соответствующие этнические группы. Отсутствие подобных ассоциаций объясняется прежде всего малым (в большинстве ситуаций) количеством ВЭБ-позитивных случаев среди анализируемых новообразований (рак желудка, полости рта, глотки и злокачественные лимфомы), не относящихся к категории высокоассоциированных с ВЭБ, как, например, NPC. Помимо этого, население как РК, так и МО состоит из представителей различных этносов, среди которых этнические калмыки и славяне составляют лишь некоторую часть (см. Дополнение). Показатели онкологической заболеваемости для этих регионов являются обобщёнными, отражающими структуру их этнически разнородных жителей. Следовательно, онкозаболеваемость всего населения указанных регионов не может быть связана с действием определённого типа ВЭБ, детектированного у выбранных этнических представителей. Различное соотношение ВЭБ-1 и ВЭБ-2 среди них также существенно не повлияло ни на спектр обнаруживаемых вариантов гена *LMP1*, ни на структуру повторяющихся элементов кодируемого им онкобелка.

Таким образом, анализ совокупности полученных данных делает возможным предположить, что штаммы ВЭБ, циркулирующие в двух этнических популяциях, обладают приблизительно одинаковыми биологическими свойствами. Обнаруженная же тенденция повышенной заболеваемости раком желудка, полости рта, глотки и злокачественными лимфомами у населения МО по отношению к жителям РК не связана с преимущественным распространением у представителей славян трансформирующего типа ВЭБ-1, а скорее всего, обусловлена генетической предрасположенностью лиц, проживающих на территории МО, к перичесленным опухолям. Лишь определение процентного соотношения вирус-ассоциированных случаев среди этих новообразований у представителей конкретных этносов позволит подтвердить или опровергнуть факт влияния типов ВЭБ на развитие злокачественных опухолей в соответствующих популяциях. При отсутствии подобных данных существование охарактеризованной связи остаётся до конца не исследованной проблемой и требует дальнейшего изучения.

Заключение

Полученные в работе данные позволяют прийти к выводу о том, что каждый из 2 типов ВЭБ в разных популяциях может иметь как преимущественный, так и смешанный тип распространения, что, возможно, связано с конкретным этносом, в част-

ности его генотипом. Нельзя исключить влияние на этот процесс и других факторов, включая географический, – особенностей окружающей среды региона проживания. Продолжение исследований, направленных на анализ распространённости типов ВЭБ в других популяциях и прежде всего у больных с высокой частотой ВЭБ-ассоциированных злокачественных опухолей (например, NPC), с большой долей вероятности позволит раскрыть молекулярные и субмолекулярные механизмы воздействия каждого из типов вируса на инициацию и развитие канцерогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Davison A.J., Eberle R., Ehlers B., Hayward G.S., McGeoch D.J., Minson A.C., et al. The order *Herpesvirales*. *Arch. Virol.* 2009; 154(1): 171–7. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4>
2. Dolan A., Addison C., Gatherer D., Davison A.J., McGeoch D.J. The genome of Epstein–Barr virus type 2 strain AG876. *Virology.* 2006; 350(1): 164–70. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.01.015>
3. Young L.S., Rickinson A.B. Epstein–Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer.* 2004; 4(10): 757–68. <https://doi.org/10.1038/nrc1452>
4. Moore P.S., Chang Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat. Rev. Cancer.* 2010; 10(12): 878–89. <https://doi.org/10.1038/nrc2961>
5. McGeoch D.J. Molecular evolution of the γ -*Herpesvirinae*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2001; 356(1408): 421–35. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0775>
6. Sample J., Young L., Martin B., Chatman T., Kieff E., Rickinson A., et al. Epstein–Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J. Virol.* 1990; 64(9): 4084–92. <https://doi.org/10.1128/JVI.64.9.4084-4092.1990>
7. Gratama J.W., Ernberg I. Molecular epidemiology of Epstein–Barr virus infection. *Adv. Cancer Res.* 1995; 67: 197–255.
8. Coleman C.B., Wohlford E.M., Smith N.A., King C.A., Ritchie J.A., Baresel P.C., et al. Epstein–Barr virus type 2 latently infects T cells, inducing an atypical activation characterized by expression of lymphotactic cytokines. *J. Virol.* 2015; 89(4): 2301–12. <https://doi.org/10.1128/JVI.03001-14>
9. Kaymaz Y., Oduor C.I., Yu H., Otiemo J.A., Ong'echa J.M., Moormann A.M., et al. Comprehensive transcriptome and mutational profiling of endemic Burkitt lymphoma reveals EBV type-specific differences. *Mol. Cancer Res.* 2017; 15(5): 563–76. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0305>
10. Bentz G.L., Whitehurst C.B., Pagano J.S. Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) C-terminal-activating region 3 contributes to LMP1-mediated cellular migration via its interaction with Ubc9. *J. Virol.* 2011; 85(19): 10144–53. <https://doi.org/10.1128/JVI.05035-11>
11. Li H.P., Chang Y.S. Epstein–Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions. *J. Biomed. Sci.* 2003; 10(5): 490–504. <https://doi.org/10.1007/BF02256110>
12. Dawson C.W., Port R.J., Young L.S. The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Semin. Cancer Biol.* 2012; 22(2): 144–53. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.01.004>
13. Edwards R.H., Seillier-Moisewitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein–Barr virus strains. *Virology.* 1999; 261(1): 79–95. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9855>
14. Saechan V., Settheetham-Ishida W., Kimura R., Tiwawech D., Mitarnun W., Ishida T. Epstein–Barr virus strains defined by the latent membrane protein 1 sequence characterize Thai ethnic groups. *J. Gen. Virol.* 2010; 91(Pt. 8): 2054–61. <https://doi.org/10.1099/vir.0.021105-0>
15. Saechan V., Mori A., Mitarnun W., Settheetham-Ishida W., Ishida T. Analysis of LMP1 variants of EBV in Southern Thailand: evidence for strain-associated T-cell tropism and pathogenicity. *J. Clin. Virol.* 2006; 36(2): 119–25. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.01.018>

16. Gantuz M., Lorenzetti M.A., Chabay P.A., Preciado M.V. A novel recombinant variant of latent membrane protein 1 from Epstein Barr virus in Argentina denotes phylogeographical association. *PLoS One*. 2017; 12(3): e0174221. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174221>

17. Burrows J.M., Bromham L., Woolfit M., Piganeau G., Tellam J., Connolly G., et al. Selection pressure-driven evolution of the Epstein-Barr virus-encoded oncogene LMP1 in virus isolates from Southeast Asia. *J. Virol.* 2004; 78(13): 7131–7. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.13.7131-7137.2004>

18. Lin H.J., Cherng J.M., Hung M.S., Sayion Y., Lin J.C. Functional assays of HLA A2-restricted epitope variant of latent membrane protein 1 (LMP-1) of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma of Southern China and Taiwan. *J. Biomed. Sci.* 2005; 12(6): 925–36. <https://doi.org/10.1007/s11373-005-9017-y>

19. Smirnova K.V., Senyuta N.B., Botezatu I.V., Dushenkina T.E., Lubenskaya A.K., Frolovskaya A.A., et al. Epstein-Barr virus in the ethnic Tatars population: the infection and sequence variants of LMP1 oncogene. *Успехи молекулярной онкологии*. 2018; 5(3): 65–74. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2018-5-3-65-74>

20. Hahn P., Novikova E., Scherback L., Janik C., Pavlish O., Arkhipov V., et al. The LMP1 gene isolated from Russian nasopharyngeal carcinoma has no 30-bp deletion. *Int. J. Cancer*. 2001; 91(6): 815–21. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(200002\)9999:9999<::aid-ijc1122>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/1097-0215(200002)9999:9999<::aid-ijc1122>3.0.co;2-w)

21. Salahuddin S., Khan J., Azhar J., Khan J., Muhammad N. Prevalence of Epstein-Barr virus genotypes in Pakistani lymphoma patients. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 2018; 19: 3153–9. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2018.19.11.3153>

22. Lo Y.M., Chan L.Y., Chan A.T., Leung S.F., Lo K.W., Zhang J. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein-Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 1999; 59(21): 5452–5.

23. Lawrence J.B., Villnave C.A., Singer R.H. Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell*. 1988; 52(1): 51–61. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90530-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90530-2)

24. Botezatu I.V., Kondratova V.N., Shelepov V.P., Lichtenstein A.V. DNA melting analysis: application of the “open tube” format for detection of mutant *KRAS*. *Anal. Biochem.* 2011; 419(2): 302–8. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.08.015>

25. Смирнова К.В., Дидук С.В., Сенюта Н.Б., Гурцевич В.Э. Молекулярно-биологические свойства гена LMP1 вируса Эпштейна-Барр: структура, функции и полиморфизм. *Вопросы вирусологии*. 2015; 60(3): 5–13.

26. Scheinfeld A.G., Nador R.G., Cesarman E., Chadburn A., Knowles D.M. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 oncogene deletion in post-transplantation lymphoproliferative disorders. *Am. J. Pathol.* 1997; 151(3): 805–12.

27. Miller W.E., Edwards R.H., Walling D.M., Raab-Traub N. Sequence variation in the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *J. Gen. Virol.* 1994; 75(Pt. 10): 2729–40. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-10-2729>

28. Kanai K., Satoh Y., Saiki Y., Ohtani H., Sairenji T. Difference of Epstein-Barr virus isolates from Japanese patients and African Burkitt's lymphoma cell lines based on the sequence of latent membrane protein 1. *Virus Genes*. 2007; 34(1): 55–61. <https://doi.org/10.1007/s11262-006-0010-y>

29. Senyuta N., Yakovleva L., Goncharova E., Scherback L., Diduk S., Smirnova K., et al. Epstein-barr virus latent membrane protein 1 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma and other oral cavity tumors in Russia. *J. Med. Virol.* 2014; 86(2): 290–300. <https://doi.org/10.1002/jmv.23729>

30. Schuster V., Ott G., Seidenspinner S., Kreth H.W. Common Epstein-Barr virus (EBV) type-1 variant strains in both malignant and benign EBV-associated disorders. *Blood*. 1996; 87(4): 1579–85.

31. Khanim F., Yao Q.Y., Niedobitek G., Sihota S., Rickinson A.B., Young L.S. Analysis of Epstein-Barr virus gene polymorphisms in normal donors and in virus-associated tumors from different geographic locations. *Blood*. 1996; 88(9): 3491–501.

32. Лубенская А.К., Сенюта Н.Б., Ботезату И.В., Душенькина Т.Е., Лихтенштейн А.В., Гурцевич В.Э., Смирнова К.В. Вирус Эпштейна-Барр у адьгейцев и славян в России: типы вируса, варианты LMP1 и злокачественные новообразования. Материалы VI Всероссийской конференции по молекулярной онкологии, 21–23 декабря 2021 г., Москва. *Успехи молекулярной онкологии*. 2021; 4(8): 96–97.

REFERENCES

1. Davison A.J., Eberle R., Ehlers B., Hayward G.S., McGeoch D.J., Minson A.C., et al. The order *Herpesvirales*. *Arch. Virol.* 2009; 154(1): 171–7. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0278-4>

2. Dolan A., Addison C., Gatherer D., Davison A.J., McGeoch D.J. The genome of Epstein-Barr virus type 2 strain AG876. *Virology*. 2006; 350(1): 164–70. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.01.015>

3. Young L.S., Rickinson A.B. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer*. 2004; 4(10): 757–68. <https://doi.org/10.1038/nrc1452>

4. Moore P.S., Chang Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat. Rev. Cancer*. 2010; 10(12): 878–89. <https://doi.org/10.1038/nrc2961>

5. McGeoch D.J. Molecular evolution of the γ -Herpesvirinae. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2001; 356(1408): 421–35. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0775>

6. Sample J., Young L., Martin B., Chatman T., Kieff E., Rickinson A., et al. Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J. Virol.* 1990; 64(9): 4084–92. <https://doi.org/10.1128/JVI.64.9.4084-4092.1990>

7. Gratama J.W., Ernberg I. Molecular epidemiology of Epstein-Barr virus infection. *Adv. Cancer Res.* 1995; 67: 197–255.

8. Coleman C.B., Wohlford E.M., Smith N.A., King C.A., Ritchie J.A., Baresel P.C., et al. Epstein-Barr virus type 2 latently infects T cells, inducing an atypical activation characterized by expression of lymphotactic cytokines. *J. Virol.* 2015; 89(4): 2301–12. <https://doi.org/10.1128/JVI.03001-14>

9. Kaymaz Y., Oduor C.I., Yu H., Otiemo J.A., Ong'echa J.M., Moormann A.M., et al. Comprehensive transcriptome and mutational profiling of endemic Burkitt lymphoma reveals EBV type-specific differences. *Mol. Cancer Res.* 2017; 15(5): 563–76. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-16-0305>

10. Bentz G.L., Whitehurst C.B., Pagano J.S. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) C-terminal-activating region 3 contributes to LMP1-mediated cellular migration via its interaction with Ubc9. *J. Virol.* 2011; 85(19): 10144–53. <https://doi.org/10.1128/JVI.05035-11>

11. Li H.P., Chang Y.S. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1: structure and functions. *J. Biomed. Sci.* 2003; 10(5): 490–504. <https://doi.org/10.1007/BF02256110>

12. Dawson C.W., Port R.J., Young L.S. The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Semin. Cancer Biol.* 2012; 22(2): 144–53. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.01.004>

13. Edwards R.H., Seillier-Moiseiwitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein-Barr virus strains. *Virology*. 1999; 261(1): 79–95. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9855>

14. Saechan V., Settheetham-Ishida W., Kimura R., Tiwawech D., Mitarnun W., Ishida T. Epstein-Barr virus strains defined by the latent membrane protein 1 sequence characterize Thai ethnic groups. *J. Gen. Virol.* 2010; 91(Pt. 8): 2054–61. <https://doi.org/10.1099/vir.0.021105-0>

15. Saechan V., Mori A., Mitarnun W., Settheetham-Ishida W., Ishida T. Analysis of LMP1 variants of EBV in Southern Thailand: evidence for strain-associated T-cell tropism and pathogenicity. *J. Clin. Virol.* 2006; 36(2): 119–25. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.01.018>

16. Gantuz M., Lorenzetti M.A., Chabay P.A., Preciado M.V. A novel recombinant variant of latent membrane protein 1 from Epstein Barr virus in Argentina denotes phylogeographical association. *PLoS One*. 2017; 12(3): e0174221. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174221>

17. Burrows J.M., Bromham L., Woolfit M., Piganeau G., Tellam J., Connolly G., et al. Selection pressure-driven evolution of the Epstein-Barr virus-encoded oncogene LMP1 in virus isolates from Southeast Asia. *J. Virol.* 2004; 78(13): 7131–7. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.13.7131-7137.2004>

18. Lin H.J., Cherng J.M., Hung M.S., Sayion Y., Lin J.C. Functional assays of HLA A2-restricted epitope variant of latent membrane protein 1 (LMP-1) of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma of Southern China and Taiwan. *J. Biomed. Sci.* 2005; 12(6): 925–36. <https://doi.org/10.1007/s11373-005-9017-y>

19. Smirnova K.V., Senyuta N.B., Botezatu I.V., Dushenkina T.E., Lubenskaya A.K., Frolovskaya A.A., et al. Epstein-Barr virus in

- the ethnic Tatars population: the infection and sequence variants of LMP1 oncogene [*Virus Epshteyna–Barr u etnicheskikh tatar: infitsirovannost' i sikvensnye varianty onkogeno LMP1*]. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii*. 2018; 5(3): 65–74. <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2018-5-3-65-74> (in Russian)
20. Hahn P., Novikova E., Scherback L., Janik C., Pavlish O., Arkhipov V., et al. The LMP1 gene isolated from Russian nasopharyngeal carcinoma has no 30-bp deletion. *Int. J. Cancer*. 2001; 91(6): 815–21. [https://doi.org/10.1002/1097-0215\(200002\)9999:9999<::aid-ijc1122>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/1097-0215(200002)9999:9999<::aid-ijc1122>3.0.co;2-w)
 21. Salahuddin S., Khan J., Azhar J., Khan J., Muhammad N. Prevalence of Epstein–Barr virus genotypes in Pakistani lymphoma patients. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 2018; 19: 3153–9. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2018.19.11.3153>
 22. Lo Y.M., Chan L.Y., Chan A.T., Leung S.F., Lo K.W., Zhang J. Quantitative and temporal correlation between circulating cell-free Epstein–Barr virus DNA and tumor recurrence in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*. 1999; 59(21): 5452–5.
 23. Lawrence J.B., Villnave C.A., Singer R.H. Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell*. 1988; 52(1): 51–61. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90530-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90530-2)
 24. Botezatu I.V., Kondratova V.N., Shelepov V.P., Lichtenstein A.V. DNA melting analysis: application of the “open tube” format for detection of mutant *KRAS*. *Anal. Biochem*. 2011; 419(2): 302–8. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.08.015>
 25. Smirnova K.V., Diduk S.V., Senyuta N.B., Gurtsevitch V.E.. Molecular biological properties of the Epstein-Barr virus LMP1 gene: structure, function and polymorphism. [*Molekulyarno-biologicheskie svoystva gena LMP1 virusa Epshteyna-Barra: struktura, funktsiya i polimorfizm*] *Voprosi Virusologii*. 2015; 60(3):5-13. (in Russian)
 26. Scheinfeld A.G., Nador R.G., Cesarman E., Chadburn A., Knowles D.M. Epstein–Barr virus latent membrane protein-1 oncogene deletion in post-transplantation lymphoproliferative disorders. *Am. J. Pathol*. 1997; 151(3): 805–12.
 27. Miller W.E., Edwards R.H., Walling D.M., Raab-Traub N. Sequence variation in the Epstein–Barr virus latent membrane protein 1. *J. Gen. Virol*. 1994; 75(Pt. 10): 2729–40. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-10-2729>
 28. Kanai K., Satoh Y., Saiki Y., Ohtani H., Sairenji T. Difference of Epstein–Barr virus isolates from Japanese patients and African Burkitt’s lymphoma cell lines based on the sequence of latent membrane protein 1. *Virus Genes*. 2007; 34(1): 55–61. <https://doi.org/10.1007/s11262-006-0010-y>
 29. Senyuta N., Yakovleva L., Goncharova E., Scherback L., Diduk S., Smirnova K., et al. Epstein–barr virus latent membrane protein 1 polymorphism in nasopharyngeal carcinoma and other oral cavity tumors in Russia. *J. Med. Virol*. 2014; 86(2): 290–300. <https://doi.org/10.1002/jmv.23729>
 30. Schuster V., Ott G., Seidenspinner S., Kreth H.W. Common Epstein–Barr virus (EBV) type-1 variant strains in both malignant and benign EBV-associated disorders. *Blood*. 1996; 87(4): 1579–85.
 31. Khanim F., Yao Q.Y., Niedobitek G., Sihota S., Rickinson A.B., Young L.S. Analysis of Epstein–Barr virus gene polymorphisms in normal donors and in virus-associated tumors from different geographic locations. *Blood*. 1996; 88(9): 3491–501.
 32. Lubenskaya A.K., Senyuta N.B., Botezatu I.V., Dushenkina T.E., Lichtenstein A.V., Gurtsevich V.E., Smirnova K.V. Epstein-Barr virus in Adyghes and Slavs in Russia: types of virus, LMP1 variants and malignancies. [*Virus Epshteyna–Barr u adygeytsev i slavyan v Rossii: tipy virusa, varianty LMP1 i zlokachestvennye novoobrazovaniya*] *Materialy VI Vserossiyskoy konferentsii po molekulyarnoy onkologii*, 21–23 dekabrya 2021 g., Moskva. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii*. 2021; 4(8): 96–97. (in Russian)

ИНФОРМАЦИЯ

1–3 июня 2022 г. состоялось общее собрание Российской академии наук (РАН), на котором проведены очередные выборы членов-корреспондентов и академиков РАН. По результатам выборов ответственный секретарь редакционной коллегии журнала «Вопросы вирусологии», доктор биологических наук С.В. Альховский избран членом-корреспондентом РАН по специальности «вирусология».

Член редакционного Совета журнала «Вопросы вирусологии», доктор биологических наук, член-корреспондент РАН С.В. Борисевич избран академиком РАН по специальности «эпидемиология».

Член редакционного Совета журнала «Вопросы вирусологии», доктор биологических наук, член-корреспондент РАН С.В. Нетёсов избран академиком РАН по специальности «физико-химическая биология».

По специальностям и направлениям науки, входящим в сферу научных интересов журнала «Вопросы вирусологии», избраны:

член-корреспондент РАН А.В. Горелов – академиком РАН по специальности «инфекционные болезни»;

член-корреспондент РАН Д.Ю. Логунов – академиком РАН по специальности «вакцинология»;

член-корреспондент РАН А.А. Ишмухаметов – академиком РАН по специальности «фармация»;

член-корреспондент РАН А.Н. Куличенко – академиком РАН по специальности «медицинская микробиология».

Членами-корреспондентами РАН избраны М.П. Костинов и И.Н. Исакова-Сивак – по специальности «вакцинология»; А.В. Алёшкин – по специальности «вирусология»; С.В. Сидоренко и Т.В. Припутневич – по специальности «медицинская микробиология»; Е.Б. Бруснина – по специальности «эпидемиология».

Редакционная коллегия журнала «Вопросы вирусологии» поздравляет вновь избранных членов Российской академии наук.

Problems
of Virology

Voprosy
Virusologii