

Эволюционная история ВКЭ не ясна, сложны филогенетические взаимоотношения между генотипами: если генотип 1 самый “молодой”, а генотип 2 наиболее древний, то почему в ряде позиций они имеют общие аминокислоты, не характерные для остальных генотипов. Почему при этом последовательности генотипа 1 более консервативны (стабильны), а у генотипа 1 имеются общие замены с вирусами комплекса КЭ? Вероятнее всего, ярко выраженная “мозаичность” в строении геномов генотипов 4 и 5, как и обозначенные противоречия, есть следствие рекомбинационных событий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демина Т. В. Характеристика генетической variability штаммов вируса клещевого энцефалита на основе анализа гомологии участков вирусного генома: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Иркутск, 1999.
2. Демина Т. В., Джисоев Ю. П., Верховина М. М. и др. Генетическая variability и генотипирование вируса клещевого энцефалита с помощью дезоксирибонуклеотидных зондов // Вопр. вирусол. – 2009. – Т. 54, № 3. – С. 33–42.
3. Демина Т. В., Джисоев Ю. П., Верховина М. М. и др. Молекулярная эпидемиология вируса клещевого энцефалита: географическая variability, определяемая методом молекулярной гибридизации // Эпидемиол. и вакцинопрофилактика. – 2009. – № 3. – С. 27–39.
4. Злобин В. И., Демина Т. В., Беликов С. И. и др. Генетическое типирование штаммов вируса клещевого энцефалита на основе анализа гомологии фрагмента гена белка оболочки // Вопр. вирусол. – 2001. – № 1. – С. 16–21.
5. Злобин В. И., Демина Т. В., Мамаев Л. В. и др. Анализ генетической variability штаммов вируса клещевого энцефалита по первичной структуре фрагмента гена белка оболочки Е // Вопр. вирусол. – 2001. – № 1. – С. 12–16.
6. Карань Л. С., Браславская С. И., Мязин А. Е. Развитие методов детекции и генотипирования вируса клещевого энцефалита на основе амплификационных технологий // Вопр. вирусол. – 2007. – № 6. – С. 17–22.
7. Хаснашинов М. А., Данчинова Г. А., Кулакова Н. В. и др. Генетическая характеристика возбудителя клещевого энцефалита в Монголии // Вопр. вирусол. – 2010. – № 3. – С. 27–32.
8. Demina T. V., Dzhiyev Yu. P., Verkhovina M. M. et al. Genotyping and characterization of the geographical distribution of tick-borne encephalitis virus variants with a set of molecular probes // J. Med. Virol. – 2010. – Vol. 82, N 6. – P. 965–976.
9. Ecker M., Allison S. L., Meixner T., Heinz F. X. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia // J. Gen. Virol. – 1999. – Vol. 80. – P. 179–185.
10. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment // Briefings Bioinform. – 2004. – N 5. – P. 150–163.
11. Pletnev A. G., Yamshchikov V. F., Blinov V. M. Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the polyprotein of tick-borne encephalitis virus // Virology. – 1990. – Vol. 174. – P. 250–263.
12. Shiu S. Y. W., Aires M. D., Gould F. A. Genomic sequence of the structural proteins of Louping ill virus: comparative analysis with tick-borne encephalitis virus // Virology. – 1991. – Vol. 180. – P. 411.
13. Venugopal K., Shiu S. Y. W., Gritsun T., Gould E. A. Nucleotide sequence comparisons of the viral envelope gene of geographically separate tick-borne flaviviruses // Abstracts book 2nd International symposium on tick-borne encephalitis, 6–7 June, 1991. – Baden near Vienna, 1991. – P. 54.

Поступила 06.12.12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012
УДК 578.831.3:578.233.41.083.2

Е. И. Исаева, И. С. Козулина, Р. Я. Подчерняева, О. М. Гринкевич

Репродукция метапневмовируса в различных клеточных линиях

ФГБУ НИИ вирусологии им. Д. И. Иванова Минздравсоцразвития России, Москва

Проведено сравнительное изучение репродукции метапневмовируса человека в 19 перевиваемых клеточных линиях человека и животных. Показано, что наиболее чувствительными являются клетки конъюнктивы человека Chang Conjunctiva (клон 1-5C4) и почки кошек CRFK.

Ключевые слова: метапневмовирус, репродукция, культура клеток

Reproduction of the Metapneumovirus in Different Cell Lines

E. I. Isaeva, I. S. Kozulina, R. Y. Podchernyaeva, and O. M. Grinkevich

Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow, Russia

The reproduction of the metapneumovirus was comparatively studied in 19 human and animal cell lines. The most sensitive transplanted cell lines were found to be human Chang Conjunctiva (clone 1-5C4) and animal cell lines of feline kidney CRFK.

Key words: metapneumovirus, cell lines, reproduction

С момента открытия в 2001 г. метапневмовирус (human metapneumovirus – HMPV) был выделен у людей разных возрастов и идентифицирован на всех континентах [1–3, 5, 9, 11, 15].

Установлено, что HMPV циркулирует на протяжении всех календарных месяцев и имеет выраженное сезонное распространение, перекрывающее цирку-

ляцию респираторно-синцитиального вируса (human respiratory syncytial virus – HRSV) [1–4, 10].

HMPV очень слабо реплицируется в обычных клеточных культурах, используемых для диагностики респираторных вирусов, его выделение возможно в лимитированном ряду клеточных линий и требует добавления трипсина [13]. Это, вероятно, и явилось

Контактная информация:

Исаева Елена Ивановна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр.; e-mail: immunol.lab@mail.ru

одной из причин того, что вирус был обнаружен лишь недавно. Цитопатогенный эффект (ЦПЭ) HMPV наблюдается в некоторых вариантах клеток Vero, A549 или клетках почек обезьян LLC-MK2 [2, 12, 16]. ЦПЭ непостоянен, некоторые штаммы образуют синцитий, другие вызывают округление клеток [4], и ЦПЭ часто наблюдается только в последующих пассажах [2, 6]. Показано также, что HMPV может реплицироваться и в клетках Her-2, несмотря на отсутствие ЦПЭ [2, 8, 10]. В этом случае присутствие HMPV подтверждалось либо исследованием в ОТ-ПЦР супернатантов Her-2-клеточных культур или в последующих пассажах на клетках LLC-MK2 с наблюдавшимся цитопатическим эффектом. Исследование кинетики репликации HMPV в различных клеточных линиях с помощью ОТ-ПЦР показало, что вирус реплицировался более эффективно в клетках LLC-MK2, чем в клетках Vero. Еще менее активно вирус накапливался в культуре Her-2 [2, 7]. Для выделения HMPV описано также использование культуры shell vial с применением коммерческих LLC-MK-2 клеток [14]. Клетки Vero-118 допустимы для экспрессии всех генетических подтипов вируса [17], и в настоящее время эти клеточные линии используются для рутинной изоляции HMPV во многих лабораториях мира.

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение репродукции метапневмовируса в различных клеточных линиях человека и животных и определение наиболее перmissive клеточной модели.

Материалы и методы

Носоглоточные смывы. В качестве клинического материала для исследования использовали носоглоточные смывы, собранные не позднее 4-го дня от начала заболевания. Забор материала осуществляли с помощью стерильного ватного тампона с последующим помещением его в пробирку со средой 199, содержащей антибиотики (пенициллин и стрептомицин). Носоглоточные смывы хранили до исследования при -70°C . Образцы тестировали на присутствие следующих респираторных вирусов: HMPV, human Coronavirus (HCoV), вирусов гриппа А (H1N1, H3N2) и В, парагриппа, HRSV и аденовирусов типов 1, 2, 3 и 4, риновирусов и коронавируса NL-63, OC43, HKU-1, 229E.

Клеточные линии. С целью определения перmissiveности к HMPV исследовано 19 перевиваемых клеточных линий человека и животных, полученных из Коллекции культур тканей НИИ вирусологии (табл. 1).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Для выделения РНК и ДНК вирусов применяли коммерческие тест-системы “Рибо-сорб” производства “АмплиСенс” (Москва) и “Проба-НК” производства “ДНК-Технология” в соответствии с инструкцией производителя.

Для выявления методом ПЦР возбудителей ОРВИ в клиническом материале использовали тест-системы “АмплиСенс ОРВИ-скрин-FL”, а также праймеры, лю-

безно предоставленные проф. С. О. Вязовым (Эссен, Германия) из области N-гена. ПЦР проводили в двухраундовом режиме автоматической амплификации на приборе “Терцик” (ЗАО “ДНК-Технология”, Москва). Продукты ПЦР анализировали методом горизонтального электрофореза в 1,7% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, с последующей визуализацией в ультрафиолетовом спектре. Количество продукта анализировали, используя денситометрическую компьютерную программу Image J. 1.36 (NIH, США) на флюоресцентном ПЦР-анализаторе Ала1/4 (“Biosan”).

Выделение HMPV на культуре клеток. Первичное заражение монослоя культур клеток проводили по общепринятой методике Н. W. Davies.

Носоглоточный смыв, положительный на HMPV в ПЦР и отрицательный на другие респираторные вирусы (вирусы гриппа типа А и В, парагриппа, аденовирусов, риновирусов, коронавируса, HRSV и HCoV), был инокулирован на монослой культур клеток в среде, содержащей 5 мкг/мл трипсина (TPCK treated, “Sigma”). Положительный образец вносили в 4 лунки 24-луночного планшета с монослоем культуры.

Планшеты с зараженной культурой инкубировали при 37°C в течение 24 дней. Каждые 2–3 дня наблюдали за динамикой развития ЦПЭ, отбирали пробы по 100 мкл среды клеточной культуры и замораживали при -70°C , к культуре вновь добавляли 100 мкл среды, содержащей трипсин. Инфицированные суперна-

Таблица 1

Клеточные линии, использованные в работе

Клеточная линия	Среда культивирования
Перевиваемые клетки человека	
Диплоидные клетки легкого эмбриона (ЛЭЧ)	Игла MEM и 199 (1:1) + 10% ЭТС; ИП = 2,0
Карцинома легкого (A549)	Игла MEM и 199 (1:1) + 10% ЭТС; ИП = 3,0
Печень (Chang Liver)	Игла MEM и 199 (1:1) + 10% ЭТС; ИП = 3,0
Гепатома (CH5)	DMEM + 10% ЭТС; ИП = 2,5
Гепатома (Lunet)	DMEM + 10% ЭТС; ИП = 2,5
Костный мозг человека с лейкоемией (L41)	Игла MEM + 10% ЭТС; ИП = 4,0
Конъюнктив (Chang Conjunctiva, клон 1-5C4)	Игла MEM + 10% ЭТС; ИП = 3,0
Карцинома кишечника (HT29)	DMEM + 10% ЭТС; ИП = 2,5
Эпителиальная карцинома (Her-2)	Игла MEM и 199 (1:1) + 7% ЭТС; ИП = 4,0
Карцинома (HeLa)	199 + 10% ЭТС; ИП = 5,0
Перевиваемые клетки животных	
Почки собаки (MDCK)	Игла MEM + 10% ЭТС; ИП = 4,0
Почки свиньи (СПЭВ)	199 + 10% СККРС; ИП = 5,0
Почки обезьяны (Vero)	Игла MEM + 10% ЭТС; ИП = 4,0
Почки кошки (CRFK)	DMEM + 7% ЭТС; ИП = 3,0
Фибробласты кошки (CC-81)	199 + 10% СККРС; ИП = 4,0
Фибробласты мыши (L ₉₂₉)	199 + 7% ЭТС; ИП = 5,0
Мозг хорька (Mrp)	DMEM + 10% ЭТС; ИП = 4,0
Почки сирийского хомячка (ВНК-21)	199 + 10% СККРС; ИП = 4,0
Почки эмбрионов макак резусов (LLC-MK2)	Игла MEM + 10% ЭТС; ИП = 3,0

Примечание. СККРС – сыворотка крови крупного рогатого скота; ИП – индекс пролиферации.

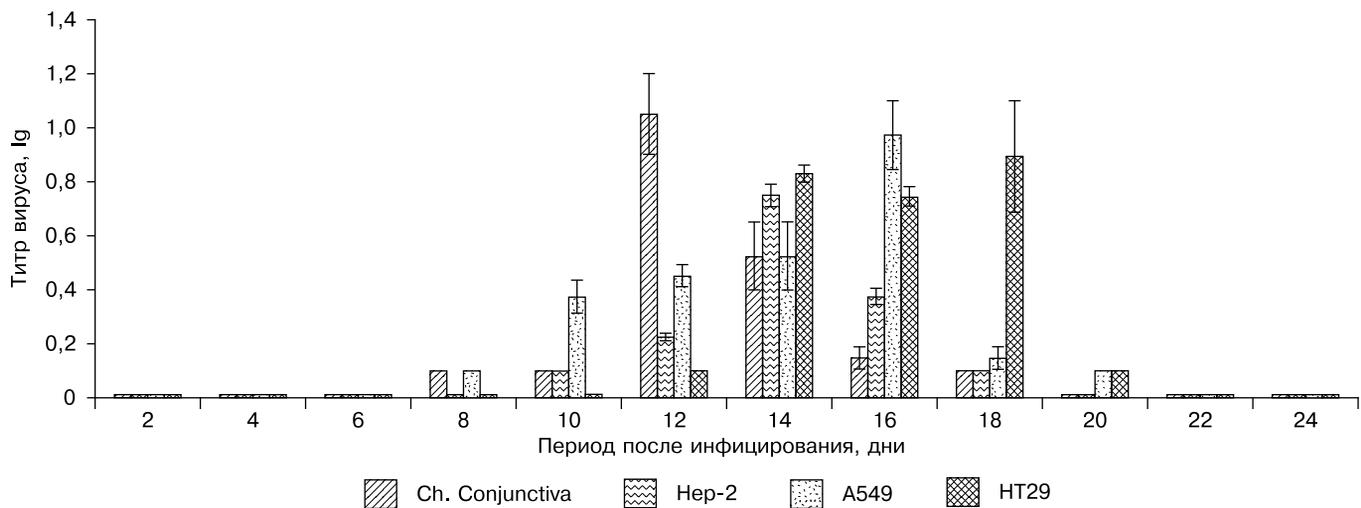


Рис. 1. Репродукция НМРВ в перевиваемых клеточных линиях человека.

танты клеточной среды исследовали на присутствие РНК НМРВ в ПЦР. При отсутствии положительной реакции после первичного заражения проводили 3 последовательных пассажа, после чего пробу считали отрицательной. При невозможности использования первичного монослоя клеток инфицированной супернатант переносили на новый монослой этой же клеточной линии.

Для установления динамики репродукции вируса в культурах пробы отбирали в разные сроки после инфицирования. Вирусную активность определяли с помощью ПЦР на наличие РНК НМРВ в супернатантах инфицированных клеточных линий. За титр вируса принимали то наибольшее разведение супернатанта зараженной культуры, в котором идентифицировалась РНК вируса. Титр выражали обратным значением разведения вируса, в котором определяли РНК (lg/мл).

Инфекционный титр вируса определяли путем нанесения 10-кратных разведений вируса на монослой клеток. Вирус был адсорбирован в течение 1 ч при 37°C, после чего добавляли соответствующую среду, содержащую 2% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и 2 мкг/мл трипсина. Инфицированные клетки инкубировали при 37°C. В надосадочной жидкости клеточной культуры определяли инфекционный титр НМРВ. Расчет инфекционных титров вируса проводили по методу Рида и Менча.

Результаты

На перmissивность к НМРВ исследовали 7 онкогенных и 3 нормальные (ЛЭЧ, Chang Conjunctiva, Chang Liver) перевиваемые клеточные линии человека (см. табл. 1). При микроскопическом исследовании монослоя в течение 22 дней после инфицирования РНК-положительными смывами мы не наблюдали ЦПЭ ни в одной из клеточных культур человека. Вместе с тем исследование инфицированных супернатантов в ПЦР показало присутствие РНК НМРВ в 4 клеточных линиях: Chang Conjunctiva, A549, Hep-2 и HT29. В культуре Chang Conjunctiva РНК НМРВ выявлялась с 8-го по 18-й день после заражения, пик репликации вируса определялся на 12-й день. В клеточной линии Hep-2 репродукция НМРВ выявлялась с 8-го по 20-й день с наибольшим уровнем вирусной нагрузки на 16-е сутки. В клетках A549 РНК определялась с 10-

по 18-й день, пик вирусной активности приходился на 14-й день. В культуре клеток HT29 репродукция вируса происходила наиболее медленно – с 12-го по 20-й день после инфицирования, достигая максимума лишь к 18-му дню (рис. 1).

При дальнейшем пассировании оказалось, что для клеточных линий человека Hep-2 и A549 требуется более длительный срок развития НМРВ-инфекции, клетки гибнут раньше, чем вирус реплицируется в достаточном для выявления РНК количестве, что лимитирует возможность получения хороших урожаев вируса.

Изучение вирусной активности НМРВ в двукратных разведениях надосадочной жидкости клеточных культур показало, что наиболее чувствительными к изучаемому вирусу являются линии клеток Chang Conjunctiva и Hep-2, а менее чувствительными – HT29 и A549 (табл. 2).

Следует отметить, что первичная изоляция вируса из носоглоточных смывов требовала нескольких слепых пассажей. При этом из 4 выбранных нами РНК-положительных смывов только 2 реплицировались в кле-

Таблица 2

Клеточные линии человека и животных, чувствительные к НМРВ

Линии клеток человека и животных	День максимальной вирусной активности	Ig*
Конъюнктивит (Chang Conjunctiva, клон 1-5C4)	12-й	1,05 ± 0,15
Карцинома легкого (A549)	14-й	0,75 ± 0,04
Эпителиальная карцинома (Hep-2)	16-й	0,98 ± 0,13
Карцинома кишечника (HT29)	18-й	0,90 ± 0,21
Почки кошки (CRFK)	10-й	1,2 ± 0,2
Почки эмбрионов макаков резусов (LLC-MK2)	18-й	1,05 ± 0,15
Почки обезьяны (Vero)	20-й	0,98 ± 0,13
Почки свиньи (СПЭВ)	16-й	0,68 ± 0,03
Почки сирийского хомячка (ВНК-21)	16-й	0,3 ± 0,12

Примечание. * – разведение супернатанта клеточной культуры, содержащее вирусный материал.

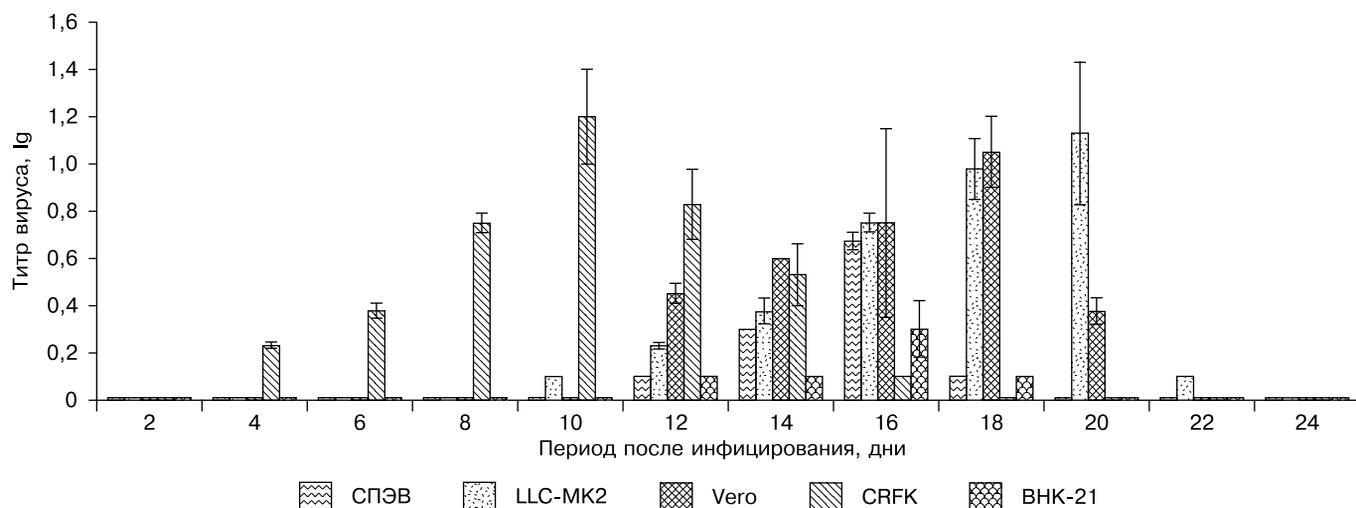


Рис. 2. Репродукция HMPV в перевиваемых клеточных линиях животных.

точных линиях человека и животных, причем второй образец – лишь в клетках Her-2 с наибольшей активностью $0,23 \pm 0,012$ после второго слепого пассажа.

Из 9 исследованных клеточных линий животных (см. табл. 1) способными поддерживать репродукцию HMPV оказались 5 различных почечных линий (CRFK, LLC-MK2, Vero, СПЭВ и ВНК-21). Фибробластные клетки кошки CC-81 и мыши L_{929} , культура мозга хорька Mrf и почек собаки MDCK к HMPV оказались нечувствительны. Изучаемый вирус способен вызывать ЦПЭ в клетках LLC-MK2, Vero и CRFK. В клеточной линии LLC-MK2 ЦПЭ вируса характеризовался округлением клеток и образованием небольших кластеров. В культуре клеток Vero и CRFK ЦПЭ HMPV проявлялся изменениями клеток, характерными для ЦПЭ других вирусов: клетки округлялись и погибали. Следовательно, единственным способом установить причину ЦПЭ являлось исследование инфицированных супернатантов клеточных культур на присутствие РНК- и ДНК-содержащих вирусов в ПЦР. Важно отметить, что в клеточных линиях СПЭВ и ВНК-21 ЦПЭ нами не выявлен, несмотря на репродукцию HMPV.

Наиболее чувствительной к HMPV оказалась культура клеток CRFK, в меньшей степени репродукция вируса проходила в культурах клеток LLC-MK2 и Vero, существенно слабее – в линиях СПЭВ и ВНК-21. На рис. 2 видно, что в клетках СПЭВ и ВНК-21 вирус

реплицировался медленно и достигал пика вирусной активности к 16-му дню. В клетках Vero РНК HMPV выявлялась с 10-го по 22-й день, и пик репродукции определялся лишь к 20-м суткам. В культуре клеток LLC-MK2 репродукция HMPV обнаруживалась с 12-го по 20-й день с наиболее высоким уровнем вирусной нагрузки на 18-е сутки. При этом логарифмические показатели двукратных разведений супернатантов данной клеточной линии несколько превышали таковые в культуре клеток Vero и были значительно выше в клетках ВНК-21 и СПЭВ (см. табл. 2).

Наиболее активно HMPV накапливался в клеточной линии CRFK. Детекция РНК вируса показала, что репродукция HMPV в этой культуре клеток начинается значительно раньше, чем в других клеточных линиях человека и животных – с 4-го дня после инфицирования. Пик вирусной активности в надосадочной жидкости после заражения клеток CRFK был выше ($\geq 1,0$ Ig) и определялся раньше – на 10-е сутки, чем в других культурах клеток животных.

Таким образом, более короткий срок начала репликации и высокий уровень вирусной нагрузки HMPV, а также более широкие возможности получения значительных количеств вируса в клеточных линиях животных LLC-MK2 и CRFK вызвали интерес к их дальнейшему изучению.

Для того чтобы установить, какая из указанных 2 культур клеток более чувствительна к HMPV, мы провели последующее пассирование вируса. В клеточной линии CRFK репродукция HMPV начиналась значительно раньше – со 2-го дня после инфицирования, пик активности наблюдался к 5-м суткам при 2-м пассаже и к 4-м суткам при 4-м пассаже, тогда как в клетках LLC-MK2 РНК HMPV определялась лишь с 5-го дня с момента заражения, а пик вирусной нагрузки приходился на 10-е и 8-е сутки после 2 и 4 пассажей соответственно. Логарифмические показатели активности HMPV в супернатанте культуры CRFK значительно превышали таковые в культуре клеток LLC-MK2 (табл. 3).

При исследовании репродукции HMPV в клеточной линии Chang Conjunctiva при последующем инфицировании клеточной культуры детекция РНК HMPV начиналась с 7-го дня после 3-го пассажа и с 4-го дня после 5-го пассажа. Пик вирусной активности соот-

Таблица 3

Сравнительная характеристика репродукции HMPV в клеточных линиях CRFK и LLC-MK2

День наблюдения	Инфекционный титр вируса в клеточных линиях, Ig TCID ₅₀			
	LLC-MK2		CRFK	
	2-й пассаж	4-й пассаж	2-й пассаж	4-й пассаж
2-й	0	0	$0,38 \pm 0,04$	$0,38 \pm 0,06$
4-й	0	0	$0,45 \pm 0,038$	$1,2 \pm 0$
5-й	$0,015 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,03$	$1,125 \pm 0,3$	$0,83 \pm 0,3$
6-й	$0,15 \pm 0,04$	$0,68 \pm 0,12$	$0,38 \pm 0,062$	$0,45 \pm 0,03$
8-й	$0,53 \pm 0,13$	$1,05 \pm 0,15$	$0,15 \pm 0,04$	$0,1 \pm 0,02$
10-й	$0,75 \pm 0,04$	$0,83 \pm 0,3$	0	0
12-й	0	0	0	0

ответственно определяли на 9-й день после 3-го пассажа и на 6-й день после 5-го пассажа вируса.

Результаты экспериментов показали, что культивирование HMPV возможно в перевиваемых клеточных линиях человека и животных. Однако первичная изоляция вируса из носоглоточных смывов нередко требует проведения нескольких слепых пассажей. Репликация HMPV в большинстве перmissive тканей культур происходит длительно – 2 нед и более – и сопровождается ЦПЭ лишь в клетках LLC-MK2, Vero и CRFK. При этом ЦПЭ не имеет характерных для данного вируса особенностей, и как следствие единственным способом установить его природу является исследование инфицированных супернатантов клеточных культур на присутствие РНК- и ДНК-содержащих вирусов в ПЦР.

Обсуждение

Если учесть важную роль HMPV в этиологии респираторной заболеваемости детей в нашей стране, представляется необходимым создание экспериментальной модели *in vitro* для изучения патогенеза и лекарственной терапии вызываемой вирусом инфекции. Первым шагом к достижению поставленной задачи и было исследование спектра клеточных линий человека и животных на чувствительность к HMPV.

По данным зарубежной литературы, HMPV слабо реплицируется в традиционно используемых для выделения респираторных вирусов клеточных линиях. Явный ЦПЭ проявляется лишь в третичных клетках почек обезьян LLC-MK2 и некоторых вариантах клеток Vero, QT-35 и A549 [12, 13]. Рост вируса в этих тканевых культурах происходит медленно и часто требует более 2 нед для максимальной репродукции. HMPV способен реплицироваться и в клетках Her-2, несмотря на отсутствие ЦПЭ [17]. Результаты нашего исследования подтверждают эти данные. Однако проведенное изучение широкого спектра клеточных культур различного видового и тканевого происхождения показало более высокую чувствительность к HMPV культур клеток конъюнктивы человека Chang Conjunctiva, клон 1-5C4, и почек кошки CRFK. Эти клеточные линии впервые исследовались на способность поддерживать репродукцию HMPV.

При сравнении с культурами клеток Vero и LLC-MK2, применяющимися для рутинной изоляции HMPV за рубежом, нами установлено, что в клетках CRFK отмечены более раннее начало и пик репликации, более высокий уровень вирусной нагрузки и как следствие большая возможность получения хороших урожаев вируса. Вместе с тем ЦПЭ HMPV в культуре CRFK не имеет характерных особенностей, следовательно, присутствие вируса необходимо подтверждать исследованием супернатантов культуры в ОТ-ПЦР. Исследование кинетики репродукции HMPV показало, что в клеточной линии Chang Conjunctiva вирус накапливается приблизительно в тех же титрах, что и в клетках LLC-MK2 и Vero, но начало репликации и пик активности определяются значительно раньше.

Таким образом, результаты проведенных экспериментов позволяют считать оптимальными для последующих исследований две перевиваемые клеточные линии – конъюнктивы человека Chang Conjunctiva, клон 1-5C4, и почки кошек CRFK. Более раннее начало репликации HMPV и высокая вирусная нагрузка в этих культурах клеток дают возможность изучения в дальнейшем молекулярной биологии вируса, патогенеза вызываемой им инфекции и проведения скрининга противовирусных препаратов *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Евсеева Е. Л. Клинико-эпидемиологические особенности, диагностика метапневмовирусной инфекции у детей: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2009.
2. Козулина И. С. Новые инфекционные агенты – метапневмовирус и бокавирус человека: Дис. ... канд. мед. наук. – М., 2010.
3. Мажуль Л. А., Шилдген О., Исаева Е. И., Вязов С. О. Метапневмовирус как частая причина болезней дыхательных путей // Вопр. вирусол. – 2007. – № 3. – С. 4–8.
4. Boivin G., Abed Y., Pelletier G. et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups // J. Infect. Dis. – 2002. – Vol. 186, N 9. – P. 1330–1334.
5. Broor S., Bharaj P., Chahar H. S. Human metapneumovirus: a new respiratory pathogen // J. Biosci. – 2008. – Vol. 33, N 4. – P. 483–493.
6. Crow E. J. Human metapneumovirus as a major cause of human respiratory tract disease // Pediatr. Infect. Dis. J. – 2004. – Vol. 23. – P. S215–S221.
7. Deffrasnes C., Cote S., Boivin G. Analysis of replication of the human metapneumovirus in different cell lines by real-time PCR // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43. – P. 488–490.
8. Deffrasnes C., Cavanagh M. H., Goyette N. et al. Inhibition of human metapneumovirus replication by small interfering RNA // Antiviral Ther. – 2008. – Vol. 13, N 6. – P. 821–832.
9. Guido M., Quattrossi M., Campa F. et al. Human metapneumovirus and human bocavirus associated with respiratory infection in Apulian population // Virology. – 2011. – Vol. 417, N 1. – P. 64–70.
10. Hamelin M. E., Abed Y., Boivin G. Human metapneumovirus: a new player among respiratory viruses // Clin. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 38, N 7. – P. 983–990.
11. Kim S., Sung H., Im H. J. et al. Molecular epidemiological investigation of a nosocomial outbreak of human metapneumovirus infection in a pediatric hemato-oncology patient population // J. Clin. Microbiol. – 2009. – Vol. 47, N 4. – P. 1221–1224.
12. Landry M. L., Ferguson D., Cohen S. et al. Detection of human metapneumovirus in clinical samples by immunofluorescence staining of shell vial centrifugation cultures prepared from three different cell lines // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43. – P. 1950–1952.
13. Maranich A., Rajnik M., Nissen M. D., Sloots T. P. Human metapneumovirus. URL: [http://emedscape.com/article/237691-overview\(2009\)](http://emedscape.com/article/237691-overview(2009))
14. Reina J., Ferrer F., Alcoceba E. et al. Comparison of different cell lines and incubation times in the isolation by the shell vial culture of human metapneumovirus from pediatric respiratory samples // J. Clin. Virol. – 2007. – Vol. 40, N 1. – P. 46–49.
15. Ruohola A., Waris M., Allander T. et al. Viral etiology of common cold in children, Finland // Emerg. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 15, N 2. – P. 344–346.
16. Van den Hoogen B. G. de Jong J. C., Groen J. et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease // Nat. Med. – 2001. – Vol. 7. – P. 719–724.
17. Van den Hoogen B. G., Herfst S., Sprong L. et al. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses // Emerg. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 10. – P. 658–666.

Поступила 29.09.11