

*Львов Д.К., Альховский С.В., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г., Богданова В.С.,
Федякина И.Т., Бурцева Е.И., Щетинин А.М., Самохвалов Е.И., Прошина Е.С.,
Кириллов И.М., Ботиков А.Г.*

**ПРИМЕНЕНИЕ СОВРЕМЕННЫХ МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ
ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ**

ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, Москва

В работе излагаются принципы применения современных молекулярно-биологических технологий для выявления особенностей циркуляции вирусов в интересах биобезопасности государства. Среди примеров, которые не только иллюстрируют эти принципы, но и могут являться моделями для решения задач обеспечения биобезопасности, значительное внимание уделяется результатам эколого-вирусологического мониторинга территории Северной Евразии 1969–1989 гг. (вирусы Хурдун, Раздан, Бханджа, Хасан, Иссык-Куль) в контексте новых молекулярно-генетических методов исследований, анализу распространения вирусов тяжёлого острого респираторного синдрома (ТОРС), ближневосточного респираторного синдрома (БВРС), гриппа А (H5N1) птиц, А (H7N9) птиц и А (H1N1) pdm09.

Ключевые слова: *полногеномное секвенирование, метагеномный анализ, вирус Хурдун, вирус Раздан, вирус Бханджа, вирус Хасан, вирус Иссык-Куль, вирус тяжёлого острого респираторного синдрома, ТОРС, вирус ближневосточного респираторного синдрома, БВРС, птичий грипп, H5N1, H7N9, пандемический грипп, H1N1.*

*Lvov D.K., Alkhovsky S.V., Shchelkanov M.Yu., Deryabin P.G., Bogdanova V.S., Fedyakina I.T.,
Burtseva E.I., Shchetinin A.M., Samokhvalov E.I., Proshina E.S., Kirillov I.M., Botikov A.G.*

**APPLICATION OF MODERN MOLECULAR-BIOLOGICAL TECHNIQUES FOR THE
PROVISION OF BIOLOGICAL SAFETY**

D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Russian Ministry of Public Health, Moscow

Principles of application of modern molecular-biological techniques for the revelation of virus circulation peculiarities in the interests of state biosafety. Among examples, which not only illustrate these principles, but could be the models for the solution of biosafety security problems significant attention devotes to the results of ecologo-virological monitoring of Northern Eurasia (1969–1989) (Khurdun, Razdan, Bhanja, Khasan, Issyk-Kul) in the context of modern molecular-genetic approaches, analysis of distribution of severe acute respiratory syndrome virus (SARS), Middle-East respiratory syndrome virus (MERS), avian influenza A (H5N1) virus, avian influenza A (H7N9) virus, and pandemic influenza A (H1N1) pdm09 virus.

Key words: *full genome sequencing, metagenomic analysis, Khurdun virus, KHURV, Razdan virus, RAZV, Bhanja virus, BHAV, Khasan virus, KHAV, Issyk-Kul virus, ISKV, severe acute respiratory syndrome virus, SARS, Middle-East respiratory syndrome virus, MERS, avian influenza, H5N1, H7N9, pandemic influenza, H1N1.*

Особую угрозу национальной и глобальной безопасности представляют новые и вновь возвращающиеся (emerging-reemerging) инфекции. Они возникают в результате природных катаклизмов или криминальных действий. Эти ситуации возникают в мире всё чаще и становятся всё более грозными. Мы ничтожно мало знаем об огромном потенциале патогенности этих возбудителей. Они ждут своего часа. Мы их называем «дремлющим вулканом» [1]. Этот постулат остаётся неизменным на протяжении последних 10 тыс. лет с периода становления человеческого общества. За это время практически все известные инфекционные болезни людей были интродуцированы из популяций домашних и диких животных. Процесс продолжается и в наше время [1, 2]. Появление ряда вирусов на неэндемичных ранее территориях вызывает тяжелейшие последствия, как это, например, недавно случилось с вирусом африканской чумы свиней (семейство *Asfarviridae*), прорвавшимся на территорию России из Грузии через Кавказский хребет [3]. Другой пример – появление в 2011 г. в Германии тяжёлого заболевания крупного и мелкого рогатого скота, связанного с новым ортобуньявирусом Шмалленберг [4].

Мы в 1969–1989 гг. проводили исследования по выявлению, подобно радиационному, биологического фона. Это были перманентные маневры по прогнозу и снижению последствий чрезвычайных эпидемических ситуаций природного и искусственного происхождения. Проведено зондирование Северной Евразии. Зонды длиной более двух тысяч километров проходили через 5-7 климатических поясов, от Арктики на севере до пустынь на

юге. Обследована территория свыше 15 млн. км². Изолировано около 90 вирусов, из которых, по крайней мере, 24 оказались новыми для науки [5–7].

Зондирование территории Российской Федерации и стран СНГ проводилось в рамках Программы по биобезопасности и изучению биоразнообразия в различных экосистемах Северной Евразии [5–9].

До последнего времени мы не обладали техническими возможностями для полного выяснения их таксономии. Сейчас мы в состоянии на основе метагеномного подхода надёжно и достаточно быстро установить полную молекулярно-генетическую характеристику нового возбудителя и определить тем самым его таксономический статус путём метагеномного анализа [10]. Между тем, при возникновении внештатной эпидемической ситуации необходимо как можно скорее установить этиологию возбудителя. Это чрезвычайно важно для его сравнения с известными возбудителями, определения потенциала патогенности, возможности использования тех или других вирулицидов для лечения человека и животных, создания диагностических тест-систем, вакцин.

Представленный материал является первым, но далеко не последним этапом такого рода исследований.

Метагеномное секвенирование *de novo* проводили на приборе Mi Seq (Illumina). Метод подразумевает секвенирование тотальной ДНК или РНК всех организмов, находящихся в исследуемой пробе с дальнейшим анализом биоинформационными методами. Анализ метагеномных данных проводится путём поиска гомологичных последовательностей среди известных вирусов, депонированных в базе геномных данных. Приведём примеры по изучению ряда изолированных в Северной Евразии новых вирусов (табл. 1).

При проведении мониторинга в Северном Прикаспии был изолирован вирус Хурдун. Прототипный штамм изолирован в урочище Хурдун в дельте Волги. Позднее в Государственную Коллекцию вирусов были депонированы ещё 22 штамма вируса из всех трёх секторов дельты Волги: западного, центрального и восточного [11].

Полногеномное секвенирование вируса Хурдун показало (рис. 1), что полученные последовательности принадлежат ранее неизвестному вирусу, имеющему 25–32 % идентичности с вирусами рода *Orthobunyavirus* (сем. *Bunyaviridae*). Уровень идентичности L-сегмента с другими ортобуньявирусами достигает 62 %. Но M-сегмент значительно короче – на 1 200 нуклеотидов, чем у других ортобуньявирусов. Это очень существенное отличие. Анализ последовательности полипротеина G не выявил на N-конце сигнального пептида. Кроме того, не найдено второго сайта нарезания структурного оболочечного белка нуклеокапсида, что позволило предположить, что этот белок отсутствует. S-сегмент соответствует другим ортобуньявирусам.

Таблица 1. Таксономический статус ранее неклассифицированных вирусов, изолированных на территории Северной Евразии.

Таксономический статус				Тип биоценоза				Регион	
семейство	род	антиген- ный комплекс	вирус	паст- бищ- ный	убе- жищ- ный	гнездовые птиц			
						высо- кие ши- роты	уме- ренные ши- роты		
<i>Bunyaviridae</i>	<i>Orthobunyaviridae</i>	новый	Хурдун (KHURV)	-	-	-	+	юг Русской равнины	
	<i>Phlebovirus</i>	Бханджа	Бханджа (BHAV)	+	-	-	-	-	п-ов Индостан, Африка, Европа
			Раздан (RAZV)	+	-	-	-	-	Закавказье
		Укуниеми	Хасан (KHAV)	+	-	-	-	-	юг Дальнего Вост ока
			Командоры (KOMV)	-	-	+	-	-	север Дальнего Востока
			Залив Терпения (ZTV)	-	-	+	-	-	север Дальнего Востока
			Гиссар (GSSRV)	-	-	-	-	+	Средняя Азия
	<i>Nairovirus</i>	новый	Иссык- Куль (ISKV)	-	+	-	-	-	Средняя Азия
			Гарм (GRMV)	-	-	-	-	+	Средняя Азия
		Сахалин	Сахалин (SAKHV)	-	-	+	-	-	север Дальнего Востока
			Парамушир (PRMSV)	-	-	+	-	-	север Дальнего Востока
			Рукутама (RUKV)	-	-	+	-	-	север Дальнего Востока
		новый	Арташат (ARTSV)	-	+	-	-	-	Закавказье
		новый	Тамды (TAMV)	+	-	-	-	-	Средняя Азия
	<i>Reoviridae</i>	<i>Orbivirus</i>	Кемерово	Охотский (OKHV)	-	-	+	-	север Дальнего Востока
Анива (ANIV)				-	-	+	-	север Дальнего Востока	
Баку (BAKV)				-	-	-	+	Средняя Азия, Закавказье	

			Вад-Медани (WMDV)	+	-	-	-	Средняя Азия, Закавказье
<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	Западного энцефаломиелита лошадей	Кызылагач (KYZV)	-	-	-	+	Закавказье
<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	летучих мышей Энтеббе	Сокулук (SOKV)	-	+	-	-	Средняя Азия
		Тюлений	Тюлений (TYUV)	-	-	+	-	север Дальнего Востока
			Кама (KAMV)	-	+	-	+	север Дальнего Востока, север Европы
		Клещевого энцефалита	Алма-Арасан (AARV)	+	-	-	-	Средняя Азия
<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Thogotovirus</i>	Дхори	Баткен (BKNV)	+	-	-	-	Средняя Азия
	<i>Quarantjavirus</i>	Кваранфил	Тюлөк (TLKV)	-	+	-	-	Средняя Азия
<i>Picornaviridae</i>	<i>Cardiovirus</i>	энцефаломиокардита	Сихотэ-Алинь (SAV)	+	-	-	-	юг Дальнего Востока
			лихорадки долины Сырдарьи (SDVfV)	+	-	-	-	Средняя Азия

Таким образом, филогенетический анализ показал, что вирус формирует обособленную группу рода *Orthobunyavirus*. Вместе с тем, учитывая уникальную структуру М-сегмента и наличие в оболочечном белке Gc участков не имеющих гомологии с другими ортобуньявирусами, нельзя исключить возможности выделения вируса Хурдун в отдельный род в сем. *Bunyaviridae* [12]. Дальнейшие исследования в этом отношении проводятся.

Вирус Раздан выделен при зондировании Закавказья в Разданском районе Армении [13].

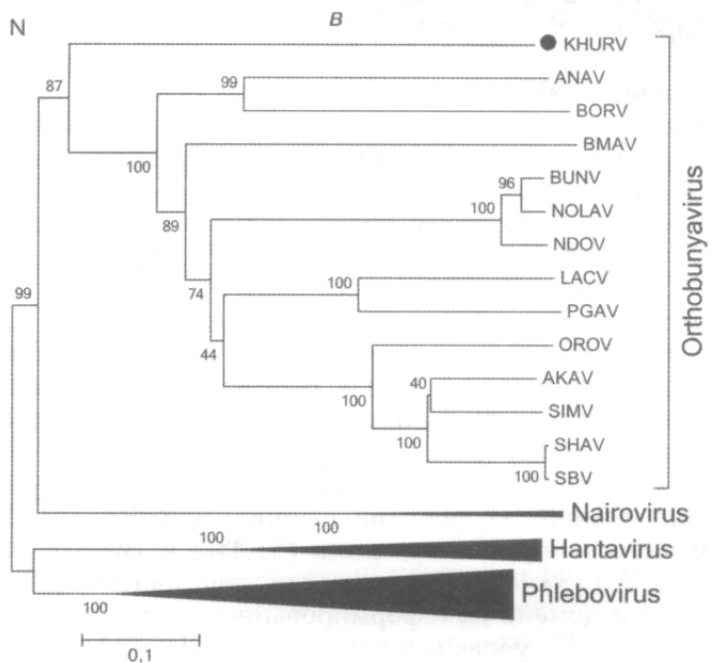
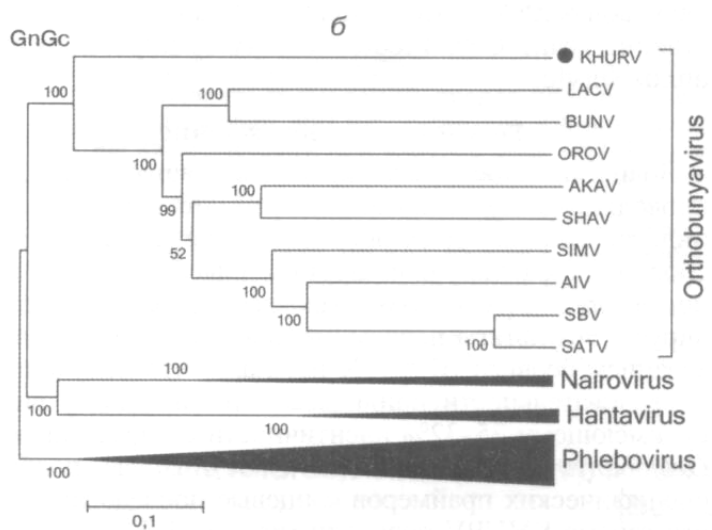
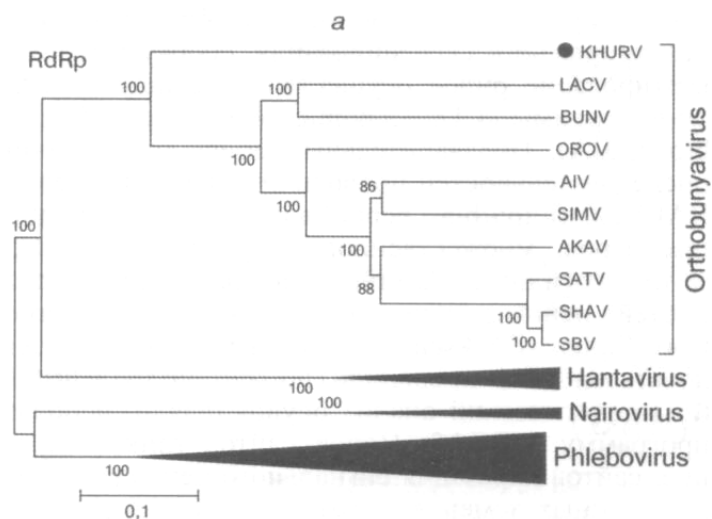


Рисунок 1. Филогенетическое древо для аминокислотных последовательностей белков вируса Хурдун (KHURV) и других представителей *Bunyaviridae*:

а – РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp – RNA-dependent RNA-polymerase), кодируемая L-сегментом вирусного генома;

б – полипротеин-предшественник оболочечных белков, кодируемый М-сегментом;

в – нуклеокапсидный N-белок, кодируемый S-сегментом.

Сокращения названий вирусов из рода *Orthobunyavirus*:

BUNV – Буньямвера (*Bunyamwera virus*);

LACV – Ла-Кросс (*La Cross virus*);

SIMV – Симбу (*Simbu virus*);

AKAV – Акабана (*Akabane virus*);

SHAV – Шамонда (*Shamonda virus*);

PGAV – Понгола (*Pongola virus*);

NDOV – Ньяндо (*Nyando virus*);

OROV – Оропуш (*Oropuche virus*);

ANAV – Анофелес А (*Anopheles A virus*);

BORV – Борацея (*Boraceia virus*);

NOLAV – Нола (*Nola virus*);

BMAV – Батама (*Batama virus*).

При сравнении геномов вирусов Раздан и Бханджа (рис. 2) было найдено, что уровень идентичности между ними по аминокислотным последовательностям вирусных белков составляет 88–96 %. М-сегмент у вирусов Раздан и Бханджа имеет сходные характеристики. По L-сегменту максимальный уровень идентичности (98,1 %) РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса Раздан имеет с европейским вирусом Пальма. Структура этого белка у вирусов Раздан и Бханджа является характерной для рода *Phlebovirus*, семейства *Bunyaviridae*. Таким образом, неклассифицированный буньявирус Раздан на основании высокой гомологии (более 90 %) генома был отнесён нами к группе Бханджа, формирующую отдельную филогенетическую группу в составе рода *Phlebovirus* [14].

Вирус Хасан при зондировании Дальнего Востока был изолирован в Хасанском районе Приморского края [15].

В результате секвенирования были определены частичные последовательности всех трёх сегментов генома (рис. 3), анализ которых позволил отнести вирус к роду *Phlebovirus*. На дендограмме видно, что вирус группируется с клещевыми флебовирусами группы Укуниими, обладая до 62 % идентичности с вирусами этой группы. Таким образом, на основании филогенетического анализа частичных последовательностей всех трёх сегментов генома, вирус Хасан был отнесён к семейству *Bunyaviridae*, роду *Phlebovirus*, в котором вирус формирует отдельную ветвь, близкую к вирусам группы Укуниими [16].

Зондирование в Средней Азии привело к изоляции свыше 10 новых вирусов, в том числе – вируса Иссык-Куль – этиологического агента Иссык-кульской лихорадки. Вирус впервые был выделен в Киргизии от летучих мышей и их облигатных паразитов – клещей *Argas vespertilionis*, а также от больного человека [17]. Спорадическая заболеваемость и эпидемические вспышки иссык-кульской лихорадки регистрируются в странах Средней Азии. Случаи заболеваемости иссык-кульской лихорадкой, как правило, связаны с обитанием в жилых помещениях летучих мышей, а заражение вирусом может происходить респираторным, алиментарным или трансмиссивным путями. Основным резервуаром и переносчиком вируса являются рукокрылые (*Chiroptera*), а также их облигатные паразиты – аргасовые клещи комплекса *Argas (Carios) vespertilionis* [18].

L-сегмент вируса соответствует найровирусам семейства *Bunyaviridae* (рис. 4) и ближе всего к изолированному во Франции вирусу Эрве, затем – к Крымской-Конго геморрагической лихорадке. Уровень идентичности белка РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса с другими найровирусами составляет в среднем 45 %. Уровень сходства М-сегмента с другими найровирусами составляет от 32 до 37 %, а структурных оболочечных белков – от 40 до 50 %. Наибольшая близость выявлена к вирусам Эрве и ККГЛ. Уровень идентичности S-

сегмента с другими найровирусами, в среднем достигает 35 %, а белка нуклеокапсида N среди описанных найровирусов – от 56 до 63 %.

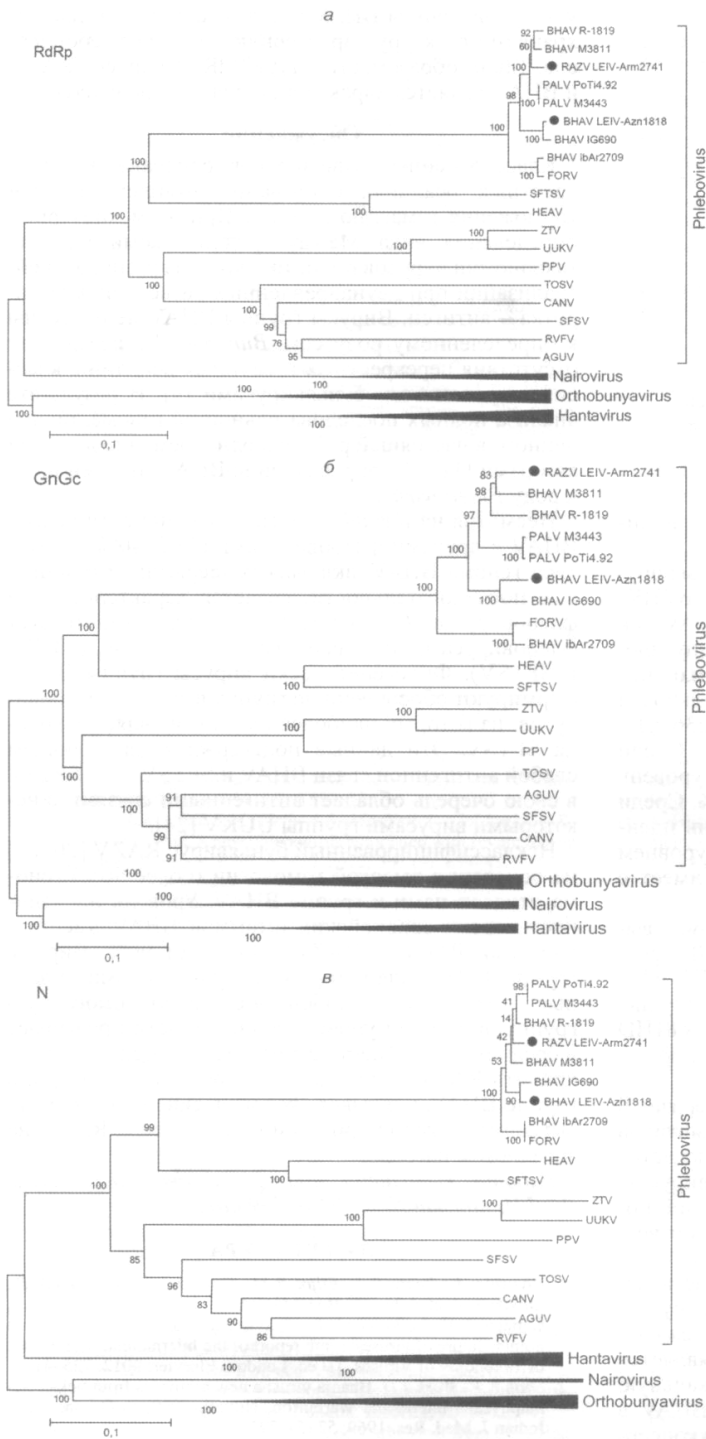


Рисунок 2. Филогенетическое древо для аминокислотных последовательностей белков вируса Бханджа (BHAV), Раздан (RAZV) и других представителей *Bunyaviridae*:

- а – РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp – RNA-dependent RNA-polymerase), кодируемая L-сегментом вирусного генома;
- б – полипротеин-предшественник оболочечных белков, кодируемый М-сегментом;
- в – нуклеокапсидный N-белок, кодируемый S-сегментом.

Сокращения названий вирусов из рода *Phlebovirus*:

- RVFV – Рифт-Валли (Rift Valley fever virus);
- TOSV – Тоскана (Toscana virus);
- UUKV – Укуниими (Uukuniemi virus);
- AGUV – Агуакате (Aguacate virus);
- PPV – Прекариус-Пойнт (Precarios Point virus);
- SFTSV – Хуаянганшан (Huaiyangshan virus – Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus);
- HEAV – Хартлэнд (Heartland virus);
- PALV – Пальма (Palma virus);
- FORV – Форекариах (Forecariah virus);
- GOUV – Гулеако (Gouleako virus);
- SFSV – Сицилианской москитной лихорадки (Sandfly fever Sicilian virus);
- CANV – Кандиру (Candiru virus);
- ZTV – Залив Терпения (Zaliv Terpeniya virus).

На построенных дендрограммах видно, что вирус Иссык-Куль наиболее близко группируется с вирусами рода *Nairovirus*. Структура генома вируса, уровень идентичности белков и результаты филогенетического анализа позволяют отнести вирус Иссык-Куль к семейству *Bunyaviridae*, роду *Nairovirus*. При этом, отметим, что вирус формирует внешнюю по отношению к другим найровирусам ветвь и является наиболее дивергентным из известных найровирусов (рис. 4) [19].

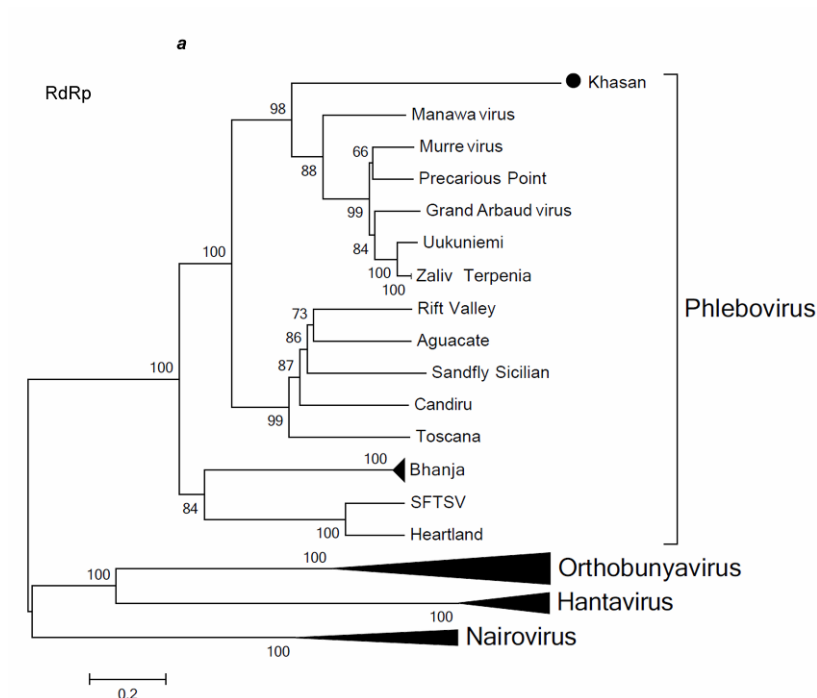
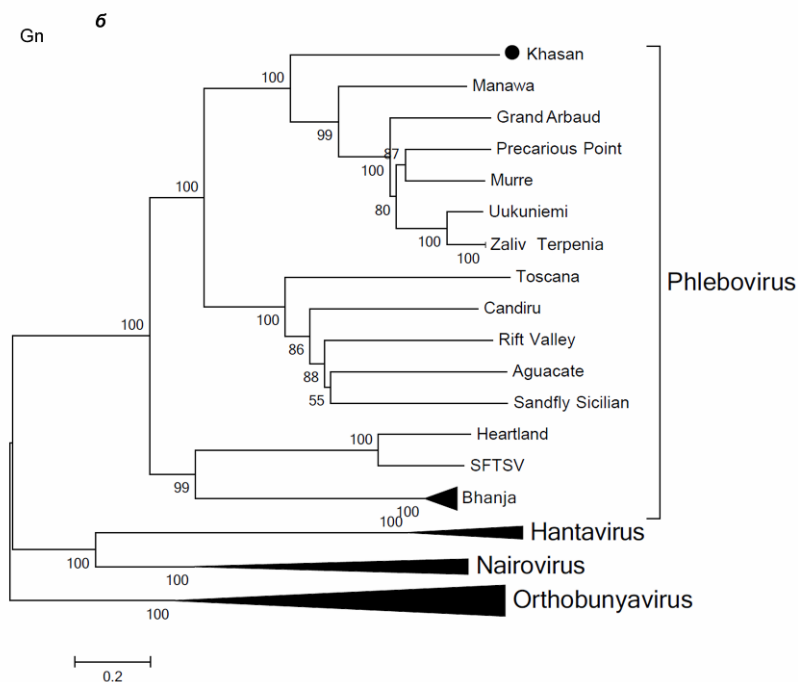


Рисунок 3. Филогенетическое древо для аминокислотных последовательностей белков вируса Хасан (KHAV) и других представителей *Bunyaviridae*:

а – фрагмент (150–337 а.о.) РНК-зависимой РНК-полимеразы (RdRp – RNA-dependent RNA-polymerase), кодируемая L-сегментом вирусного генома;

б – фрагмент (71–356 а.о.) белка Gn, кодируемого М-сегментом.



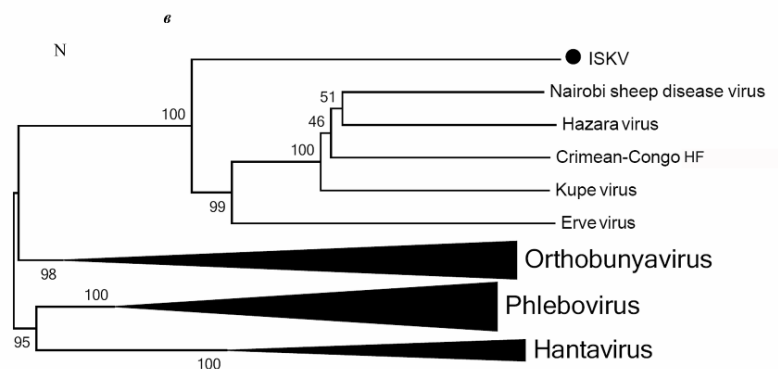
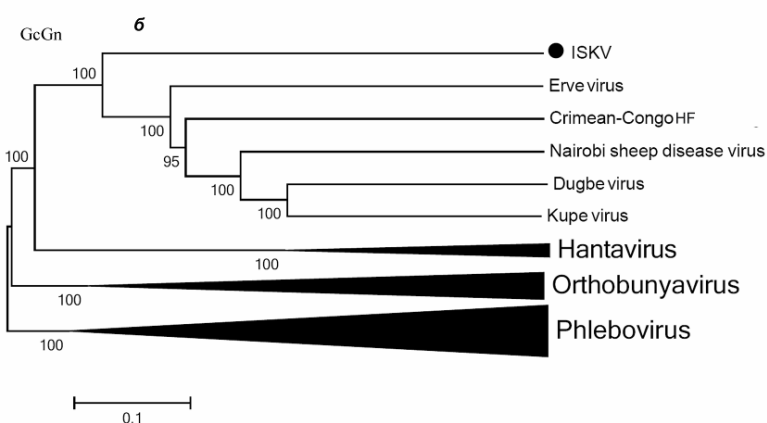
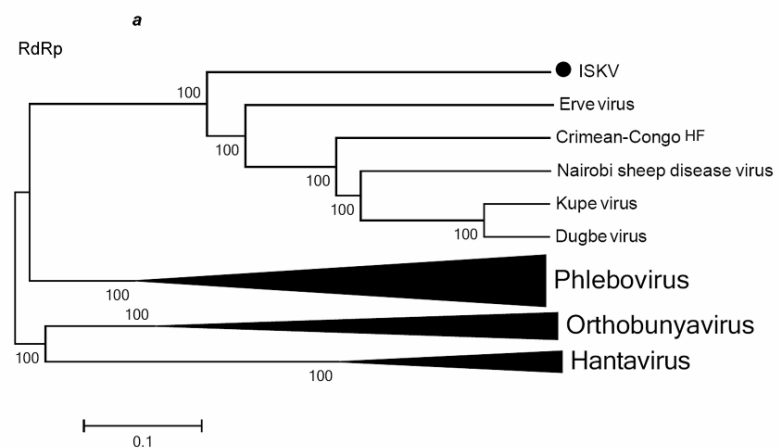


Рисунок 4. Филогенетическое древо для аминокислотных последовательностей белков вируса Иссик-Куль (ISKV) и других представителей *Bunyaviridae*:

а – РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp – RNA-dependent RNA-polymerase), кодируемая L-сегментом вирусного генома;

б – полипротеин-предшественник оболочечных белков, кодируемый M-сегментом;

в – нуклеокапсидный N-белок, кодируемый S-сегментом.

Вирус Иссик-Куль экологически связан с мигрирующими рукокрылыми. Его предполагаемый ареал охватывает обширные территории Африки, Австралии и Океании, где распространены аргасовые клещи комплекса *Argas (Carios) vespertilionis*, являющиеся основными переносчиками и – наряду с летучими мышами – природным резервуаром вируса. Это подтверждается выделением в Малайзии и ЮАР антигенно идентичных вирусов. Полученные данные, помимо решения фундаментальных задач, связанных с описанием генетического разнообразия и таксономии вирусов животных, могут быть использованы для

разработки молекулярно-генетических методов детекции вируса – ПЦР и ПЦР в реальном времени – для мониторинга и диагностики Иссyk-Кульской лихорадки на эндемичных территориях, а также в качестве модели для решения подобных задач с другими неизвестными возбудителями.

Эпизод с вызывающим 50 %-ую летальность коронавирусом ближневосточным респираторным синдромом (сокращённо БВРС, по-английски – MERS-CoV) является ещё одним, не последним примером в этом отношении. Природным резервуаром этого коронавируса, как показали результаты молекулярно-генетического изучения, как и у вируса Иссyk-Куль, являются летучие мыши [20]. Эти животные служат природным резервуаром и других опасных вирусов – бешенства (*Rhabdoviridae*, *Lyssavirus*) [21], Хендра и Нипах из семейства *Reoviridae* [22], Эбола и Марбург из семейства *Filoviridae* [23] и ряда других.

Летучие мыши оказались и первичным природным резервуаром возбудителя коронавирусного тяжёлого острого респираторного синдрома SARS-CoV, который, подчас, неправильно называют «атипичной пневмонией» (название, заметим, бессмысленное). По-русски, это название звучит как «коронавирус ТОРС» [20]. От летучих мышей в природе заражаются циветты – разновидность мангуст, которых жители Юго-Восточной Азии держат в качестве домашних животных и часто употребляют в пищу. От них – промежуточных хозяев вируса – и происходит заражение людей, а затем уже при тесном контакте вирус способен к передаче от человека к человеку [20, 24].

Так же, вероятно, заражаются люди и при БВРС, хотя промежуточный хозяин – источник заражения людей – пока не выявлен. Нельзя исключать возможность прямой передачи инфекции людям через продукты жизнедеятельности летучих мышей, днёвки которых могут находиться на чердаках жилых строений. Необходимо помнить, что обитающие у нас виды летучих мышей, подобно птицам, осуществляют сезонные миграции, зимую на эндемичной по БВРС территории. Таким образом, этот вирус может быть занесён к нам – помимо инфицированных людей – также и летучими мышами.

Первые случаи заболевания БВРС у людей появились в Саудовской Аравии в сентябре 2012 г.. Основная заболеваемость наблюдается в восточной части Саудовской Аравии. Завозные случаи заболевания выявлены в других странах Ближнего Востока (в Иордании, Катаре, ОАЭ), северной Африке (в Тунисе), а в Европе – во Франции, Германии, Великобритании и Италии. На 01.08.2013 лабораторно подтверждены 94 случая заболевания, из которых 46 (49 %) оказались летальными [25]. Установлена возможность передачи вируса от человека к человеку при тесном контакте (в том числе – и медицинским работникам) [26]. Показано, что в процесс циркуляции БВРС вовлечены верблюды [27].

ВОЗ не даёт специальных рекомендаций по контролю в пунктах въезда в страну равно как по ограничению посещения стран, где выявлена заболеваемость. Однако настоятельно рекомендует мониторинг ситуации [28]. Маловероятно, что коронавирус БВРС может в обозримом будущем серьёзно обострить эпидемическую ситуацию у нас и в мире за счёт эволюции возбудителя с приобретением способности к более активной передаче респираторным путём. А вот с гриппом ситуация представляется значительно более тревожной.

Во-первых, продолжает циркулировать высоковирулентный птичий грипп А (H5N1), убивая 60 % заразившихся им людей. В России установлена циркуляция двух генотипов этого вируса: 2.2 – на западе, 2.3.2.1 – на востоке страны (рис. 5) [29, 30]. Высокая летальность людей от первичной вирусной пневмонии объясняется аффинностью вируса к $\alpha 2$ -3-рецепторам, выявленным на поверхности бронхиолярных и альвеолярных клеток с убыванием вверх по респираторному тракту. Поэтому вирус гриппа А (H5N1), вызывая летальную инфекцию, не способен к респираторной передаче (рис. 6) [31].

Во-вторых, появившийся в 2009 г. пандемический вирус гриппа А (H1N1) свиного происхождения с самого начала обладал большей вирулентностью по сравнению с сезонным гриппом за счёт двойной рецепторной специфичности $\alpha 2$ -6 и $\alpha 2$ -3 [32–34]. Возрастание вирулентности этого вируса, в частности, связано с мутациями в 222-й и 223-й позициях в пределах рецептор-связывающего сайта первой субъединицы гемагглютинина. Вирус при этом, меняет рецепторную специфичность с $\alpha 2$ -6 на $\alpha 2$ -3 и приобретает способность к поражению нижних отделов респираторного тракта с развитием летальной вирусной пневмонии. Процесс формирования мутантов обычно происходит при отсутствии этиотропной терапии в первые 2-3 дня заболевания [35, 36].

Мы разработали метод количественной оценки соотношения рецепторной специфичности $\alpha 2$ -3 и $\alpha 2$ -6 у выделенных штаммов (рис. 7). Была проведена огромная комплексная работа по изучению свыше 100 штаммов, выделенных от больных и секционного материала за 2 эпидсезона. По своей аффинности штаммы пандемического гриппа занимают нишу между сезонным и птичьим гриппом А (H5N1). Тёмные линии на рис. 7 – летальные случаи; все они группируются в верхней части диаграммы, где индекс $W_{3/6}$ выше единицы. В работе принимали участие клиницисты, вирусологи, генетики и специалисты по вирусным рецепторам. Показано, что, как и при птичьем гриппе А (H5N1), мутантные штаммы А (H1N1) вызывают летальность 60 %, но пока, к счастью, они не приобрели способности к респираторной передаче (но это зависит лишь от одной аминокислотной замены) [37].

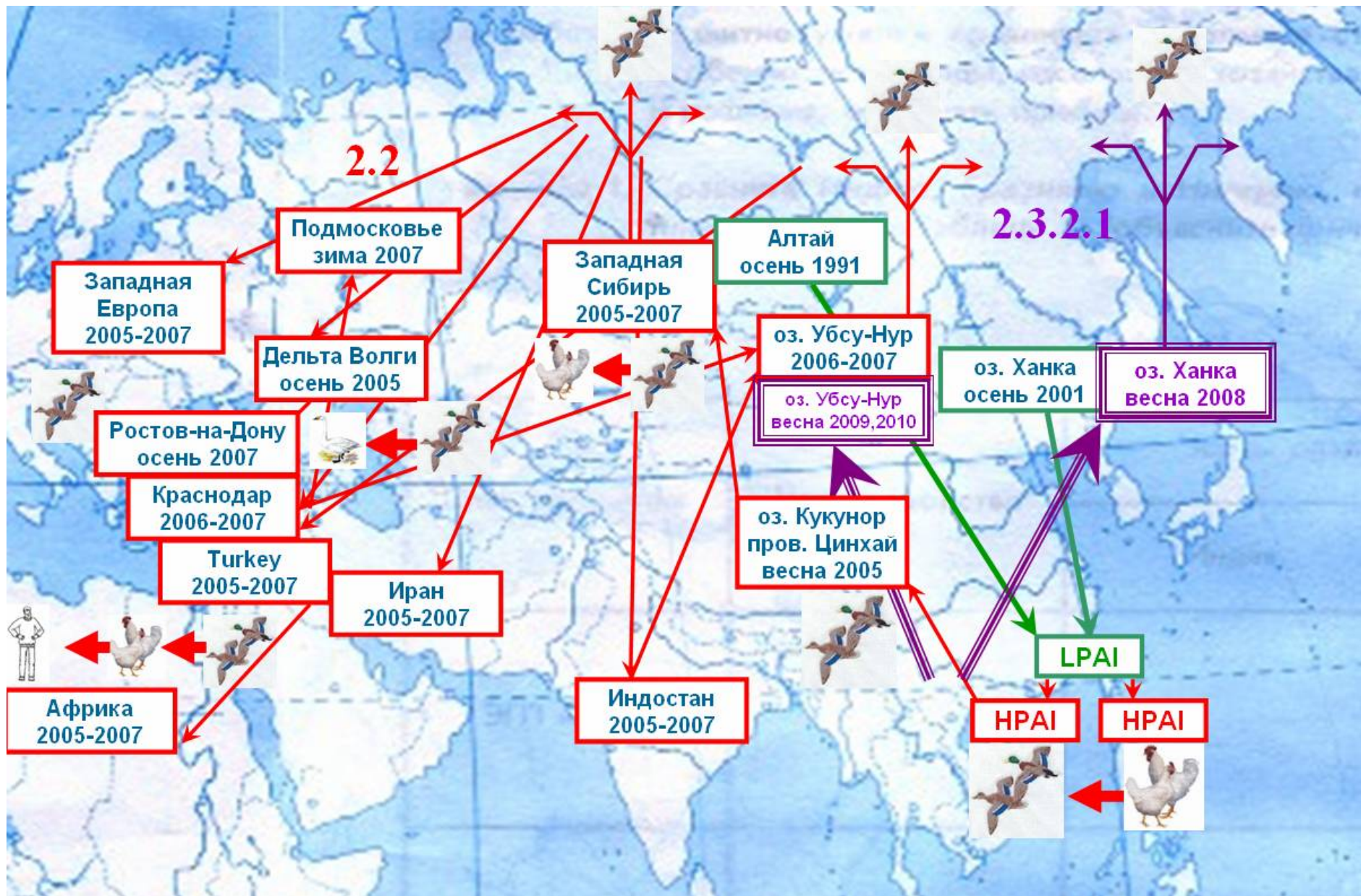


Рисунок 5. Последствия проникновения высоковирулентного вируса гриппа А (H5N1) птиц в Северную Евразию весной 2005 г..

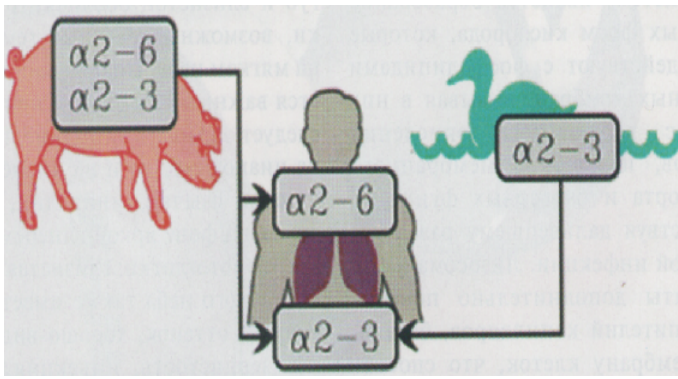


Рисунок 6. Рецепторная специфичность вирусов гриппа А, адаптированных к различным хозяевам.

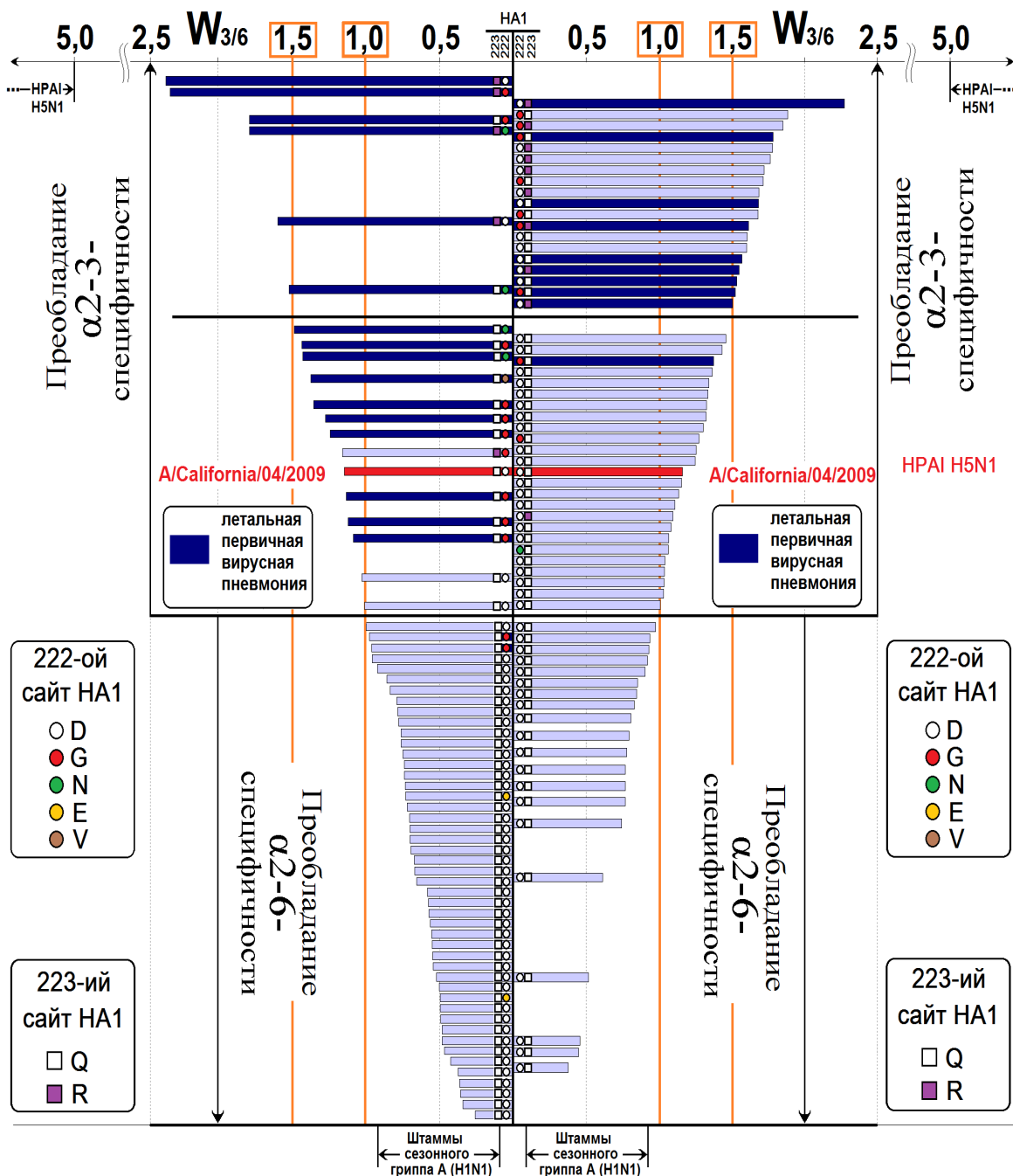


Рисунок 7. Рецепторная специфичность к $\alpha 2-3$ / $\alpha 2-6$ -сиалозидам ($W_{3/6}$) и аминокислотные замены в позициях 222 и 223 рецептор-связывающего сайта HA1 у штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09, изолированных от пациентов с благоприятным и летальным исходами в эпидсезонах 2009–2010 гг. (левая сторона диаграммы) и 2010–2011 гг. (правая сторона диаграммы).

В-третьих, начиная с февраля этого года, то есть в начале сезона весенней миграции птиц, в Китае выявлена спорадическая заболеваемость людей, этиологически связанная с вирусом птичьего гриппа А (H7N9). По состоянию на 12.08.2013 лабораторно подтверждены 135 случаев заражения людей с 33 %-ой летальностью. Случаи заболевания сначала возникли в районе Шанхая, затем распространились на провинции Цзянсу и Чжэцзян, а позднее – ещё на 10 восточных провинций, включая Тайвань. Источником подавляющего большинства выявленных случаев заболевания людей гриппом А (H7N9) были инфицированные домашние птицы, которые переносят инфекцию инapparантно. Случаи массовой гибели птиц не отмечены. Выявлены несколько семейных очагов заболевания, но все члены семей могли иметь контакт с птицами. Под наблюдением специалистов находились около 2 000 человек, имевших контакты с заболевшими, в результате чего показана ограниченная способность вируса гриппа А (H7N9) передаваться воздушно-капельным путём от человека к человеку. Повышенный тропизм этого вируса к α 2-6-сиалозидам также определяет такую возможность [38].

Результаты анализа генома штаммов вируса гриппа А (H7N9) показали, что этот вирус появился в результате реассортации: сегменты гемагглютинина (H7) и NA (N9) получены от вирусов гриппа А диких птиц водно-околоводного комплекса, а сегменты PB2, PB1, PA, NP, M и NS – от вируса гриппа А птиц подтипа H9N2 [39]. Вероятнее всего, реассортация произошла во время весенней миграции, когда происходит чрезвычайно интенсивные популяционные взаимодействия диких птиц водно-околоводного комплекса. По нашим оценкам, местом возникновения реассортанта могло стать оз. Тайху на границе провинций Чжэцзян, Цзянсу и Шанхай, которое представляет собой один из крупнейших хабов миграционных потоков диких птиц. Сохраняется вероятность заноса вируса гриппа А (H7N9) на территорию России дикими птицами вдоль Дальневосточно-Притихоокеанского миграционного русла (на Дальний Восток) и вдоль Джунгарского миграционного русла (в Западную Сибирь).

Данные анализа генома штаммов вируса гриппа А (H7N9), представленные в международной базе данных GenBank, позволяют сделать следующие выводы: 1. сайт протеолитического нарезания гемагглютинина соответствует слабовирулентным штаммам вируса гриппа А (что согласуется с отсутствием массовой гибели птиц); 2. структура рецептор-связывающего сайта указывает на повышенный тропизм к α 2-6-сиалозидам (что объясняет контагиозность вируса для человека и предполагает возможность передачи от человека к человеку воздушно-капельным путём); 3. в субъединице PB2 полимеразного комплекса имеется замена в 627-м сайте глутаминовой кислоты на лизин, а молекула NA имеет делецию (длиной 5 аминокислотных остатков, что является маркёром повышенного тропизма к клеткам млекопитающих); 4. в молекуле каналобразующего белка M2 имеется замена в 31-м сайте

серина на аспарагин, которая определяет резистентность вируса к химиопрепаратам адамантанового ряда – в частности, римантадину и амантадину; 5. NA некоторых штаммов (например, A/Shanghai/1/2013 (H7N9)) содержит мутацию R294K, которая известна как маркер устойчивости к ингибиторам NA – осельтамивиру и занамивиру – для N2 и N9; однако штаммы с такими мутациями сохраняли чувствительность к осельтамивиру [38, 39], что, по-видимому, объясняется наличием смеси вирусных вариантов в составе штамма [39].

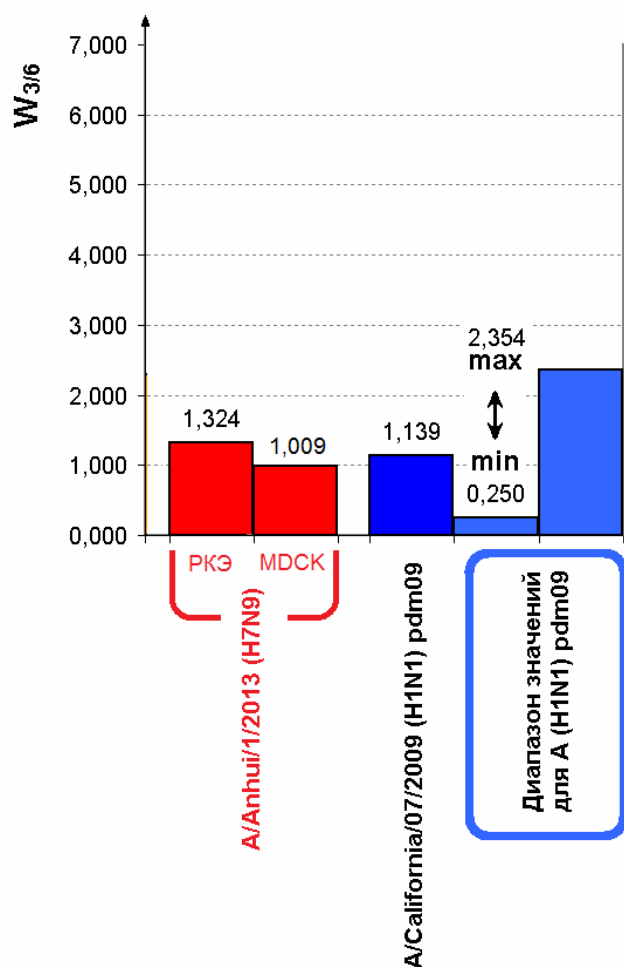


Рисунок 8. Рецепторная специфичность штамма A/Anhui/1/2013 (H7N9) в сравнении со штаммами пандемического гриппа А (H1N1) pdm09.

Результаты прямых экспериментах *in vitro*, проведённых в Центре экологии и эпидемиологии гриппа при ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России с использованием штамма A/Anhui/1/2013 (H7N9) показали, что новый вирус гриппа А (H7N9) резистентен к римантадину и чувствителен к осельтамивиру, рибавирину (вирозолу), ингавирину и арбидолу. Установлено, что для этого варианта гриппа А (H7N9) $W_{3/6} = 1.324$ (рис. 8), что сближает его с пандемическими штаммами и указывает на его высокий эпидемический потенциал в отличие от других штаммов вируса гриппа А (H7).

«Предупреждён – значит вооружён». Это в полной мере относится к новым возбудителям вирусных инфекций. Необходимо постоянно помнить, что «дремлющие вулканы», порой, просыпаются.

Литература

1. *Львов Д.К., Зверев В.В., Гинцбург А.Л., Маренникова С.С., Пальцев М.А.* Натуральная оспа – дремлющий вулкан. Вопросы вирусологии. 2008; 53 (4) : 4–8.
2. *Львов Д.К.* Экология вирусов. В кн.: *Львов Д.К.* (ред.) Вирусы и вирусные инфекции. М.: МИА; 2013 : 68–86.
3. *Забережный А.Д., Алипер Т.И., Гребенникова Т.В., Верховский О.А., Sanchez-Vizcaino J.M.,* и др. Африканская чума свиней. Вопросы вирусологии. 2012. 57 (5) : 4–10.
4. *Орлянкин Б.Т., Алипер Т.И., Непоклонов Е.А., Львов Д.К.* Болезнь Шмалленберг. В кн.: *Львов Д.К.* (ред.) Вирусы и вирусные инфекции. М.: МИА; 2013 : 877–878.
5. *Львов Д.К., Дерябин П.Г., Аристова В.А., Бутенко А.М., Галкина И.В.,* и др. Атлас распространения возбудителей природно-очаговых вирусных инфекций на территории Российской Федерации. М.: МЗ РФ; 2001.
6. *Lvov D.K.* Arboviral zoonoses of Northern Eurasia (Eastern Europe and the Commonwealth of Independent States). In: *Beran G.W.* (ed.) Handbook of zoonoses. Section B: Viral. Boca Raton–London–Tokyo: CRC Press; 1994 : 237–260.
7. *Щелканов М.Ю., Громашевский В.Л., Львов Д.К.* Роль эколого-вирусологического районирования в прогнозировании влияния климатических изменений на ареалы арбовирусов. Вестник РАМН. 2006; (2) : 22–25.
8. *Львов Д.К.* (ред.) Организация эколого-эпидемиологического мониторинга территории Российской Федерации с целью противоэпидемической защиты населения и войск. Методические рекомендации. М.: МЗ РФ, Федеральное Управление медико-биологических и экстремальных проблем, НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН; 1993.
9. *Lvov D.K.* Ecological sounding of the USSR territory for natural foci of arboviruses. In: *Sov. Med. Rev. Ser. E: Virology Reviews.* USA: Harwood Ac. Publ. GmbH; 1993; 5 : 1–47.
10. *Альховский С.В.* Метагеномный подход – полногеномное секвенирование. В кн.: *Львов Д.К.* (ред.) Вирусы и вирусные инфекции. М.: МИА; 2013 : 476–479.

11. Галкина И.В., Львов Д.Н., Громашевский В.Л., Москвина Т.М. Вирус Хурдун (Khurdun), предположительно новый РНК-содержащий вирус, связанный с лысухами (*Fulica atra*), изолированный в дельте Волги. Вопросы вирусологии. 2005; 50 (4) : 29–31.
12. Альховский С.В., Щетинин А.М., Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Дерябин П.Г., Львов Д.Н. и др. Вирус Хурдун (KHURV): новый вирус рода *Orthobunyaviridae* (*Bunyaviridae*). Вопросы вирусологии. 2013; 58 (4) : 10–13.
13. Lvov D.K., Gromashevsky V.L., Zakaryan V.A., Skvortsova T.M., Berezina L.K., et al. Razdan virus, a new ungrouped bunyavirus isolated from *Dermacentor marginatus* ticks in Armenia. *Acta Virol.* 1978; 22 (6) : 506–508.
14. Альховский С.В., Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Щетинин А.М., Краснослободцев К.Г. и др. Молекулярно-генетическая характеристика вирусов Бханджа (BHAV) и Раздан (RAZV) (*Bunyaviridae*, *Phlebovirus*), изолированных от иксодовых клещей *Rhipicephalus bursa* Canestrini et Fanzago, 1878 и *Dermacentor marginatus* Sulzer, 1776 в Закавказье. Вопросы вирусологии. 2013; 58 (4) : 14–19.
15. Lvov D.K., Leonova G.N., Gromashevsky V.L., Skvortsova T.M., Shestakov V.I., et al. Khasan virus, a new ungrouped bunyavirus isolated from *Haemaphysalis longicornis* ticks in the Primorie region. *Acta Virol.* 1978; 22 (3) : 249–252.
16. Альховский С.В., Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Щетинин А.М., Дерябин П.Г., и др. Таксономия вируса Хасан (Khasan, KHAV) – нового вируса рода *Phlebovirus* (сем. *Bunyaviridae*), изолированного из клещей *Haemaphysalis longicornis* Neumann, 1901 в Приморском крае, Россия. Вопросы вирусологии. 2013; 58 (5) : 15–18.
17. Lvov D.K., Karas F.R., Timofeev E.M., Tsyarkin Y.M., Vargina S.G., et al. "Issyk-Kul" virus, a new arbovirus isolated from bats and *Argas (Carios) vespertilionis* (Latr., 1802) in the Kirghiz S.S.R. Brief report. *Arch. Gesamte Virusforsch.* 1973; 42 (2) : 207–209.
18. Lvov D.K. Issyk-Kul virus disease. In: *Monath T.P.* (ed.) *The Arboviruses: ecology and epidemiology.* Boca Raton: CRS press; 1988 : 53–62.
19. Альховский С.В., Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Щетинин А.М., Дерябин П.Г., и др. Таксономия вируса Иссук-Куль (Issyk-Kul, ISKV; *Bunyaviridae*, *Nairovirus*), возбудителя Иссук-Кульской лихорадки, изолированного от летучих мышей (*Vespertilionidae*) и клещей *Argas (Carios) vespertilionis* Latreille, 1796. Вопросы вирусологии. 2013; 58 (5) : 11–15.

20. *Львов Д.К., Щелканов М.Ю.* Коронавирусы (Coronaviridae). В кн.: *Львов Д.К.* (ред.) Вирусы и вирусные инфекции. М.: МИА; 2013 : 211–218.
21. *Грибенча С.В., Львов Д.К., Щелканов М.Ю.* Рабдовирусы (Rhabdoviridae). В кн.: *Львов Д.К.* (ред.) Вирусы и вирусные инфекции. М.: МИА; 2013 : 197–202.
22. *Львов Д.К., Альховский С.В., Урываев Л.В., Щелканов М.Ю.* Реовирусы (Reoviridae). В кн.: *Львов Д.К.* (ред.) Вирусы и вирусные инфекции. М.: МИА; 2013 : 315–324.
23. *Львов Д.К., Щелканов М.Ю.* Филовирусы (Filoviridae). В кн.: *Львов Д.К.* (ред.) Вирусы и вирусные инфекции. М.: МИА; 2013 : 202–205.
24. *Bolles M., Donaldson E., Baric R.* SARS-CoV and emergent coronaviruses: viral determinants of interspecies transmission. *Curr. Opin. Virol.* 2011; 1 (6) : 624–634.
25. WHO. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) – update 01 August 2013. http://www.who.int/csr/don/2013_08_01/en/index.html.
26. *Lim P.L., Lee T.H., Rowe E.K.* Middle East Respiratory Syndrome coronavirus (MERS CoV): Update 2013. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 2013; 15 (4) : 295–298.
27. *Reusken C.B., Haagmans B.L., Müller M.A., Gutierrez C., Godeke G.J., et al.* Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study. *Lancet Infect. Dis.* 2013; doi:pii: S1473-3099(13)70164-6. 10.1016/S1473-3099(13)70164-6.
28. WHO guidelines for investigation of cases of human infection with Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) (July 2013). http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/MERS_CoV_investigation_guideline_Jul13.pdf.
29. *Львов Д.К.* Грипп и другие новые и возвращающиеся инфекции Северной Евразии. Глобальные последствия. В кн.: *Федеральный справочник. Здравоохранения России.* 2010; (11) : 209–220.
30. *Lvov D.K., Shchelkanov M.Yu., Prilipov A.G., Vlasov N.A., Fedyakina I.T., et al.* Evolution of HPAI H5N1 virus in Natural ecosystems of Northern Eurasia (2005–2008). *Avian Dis.* 2010. 54 : 483–495.
31. *Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Львов Д.К.* Грипп: история, клиника, патогенез. *Лечащий врач.* 2011; (10) : 33–38.

32. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г., Базарова М.В., Колобухина Л.В. и др. Изоляция 24.05.2009 и депонирование в Государственную коллекцию вирусов (ГКВ N 2452 от 24.05.2009) первого штамма A/Moscow/01/2009 (H1N1) swl, подобного свиному вирусу А (H1N1) от первого выявленного 21.05.2009 больного в г. Москве. Вопросы вирусологии. 2009; 54 (6) : 10–14.
33. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Щелканов М.Ю., Прилипов А.Г., Колобухина Л.В. и др. Распространение нового пандемического вируса гриппа А (H1N1) v в России. Вопросы вирусологии. 2010; 55 (3) : 4–9.
34. Щелканов М.Ю., Львов Д.Н., Федякина И.Т., Баранов Н.И., Гореликов В.Н. и др. Динамика распространения пандемического гриппа А / H1N1 swl на Дальнем Востоке в 2009 г.. Вопросы вирусологии. 2010; 55 (3) : 10–15.
35. Львов Д.К., Яшкулов К.Б., Прилипов А.Г., Бурцева Е.И., Шляпникова О.В. и др. Обнаружение аминокислотных замен аспарагиновой кислоты на глицин и глутаминовую кислоту в рецептор-связывающем сайте гемагглютинаина в штамме пандемического вируса гриппа H1N1 от больных с летальным исходом и со средне-тяжёлой формой заболевания. Вопросы вирусологии. 2010; 55 (3) : 15–18.
36. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г., Богданова В.С., Щелканов М.Ю. и др. Возможная связь летальной пневмонии с мутациями пандемического вируса гриппа А / H1N1 swl в рецептор-связывающем сайте субъединицы HA1 гемагглютинаина. Вопросы вирусологии. 2010; 55 (4) : 4–9.
37. Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Бовин Н.В., Малышев Н.А., Чучалин А.Г. и др. Корреляция между рецепторной специфичностью штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09, изолированных в 2009-2011 гг., структурой рецептор-связывающего сайта и вероятностью развития летальной первичной вирусной пневмонии. Вопросы вирусологии. 2012; 57 (1) : 14–20.
38. WHO. Overview of the emergence and characteristics of the avian influenza A(H7N9) virus. http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/WHO_H7N9_review_31May13.pdf.
39. Watanabe T., Kiso M., Fukuyama S., Nakajima N., Imai M. et al. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans. Nature. 2013; doi: 10.1038/nature12392.