

С.В. Альховский, Д.К. Львов, М.Ю. Щелканов, А.М. Щетинин, П.Г. Дерябин, Д.Н. Львов, С.С. Львов,
Е.И. Самохвалов, А.К. Гительман, А.Г. Ботиков, К.Г. Краснослободцев

Генетическая характеристика вируса Баткен (BKNV – Batken virus) (*Orthomyxoviridae*, *Thogotovirus*), изолированного из иксодовых клещей *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 и комаров *Aedes caspius* Pallas, 1771 и *Culex hortensis* Ficalbi, 1889 в Средней Азии

ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, 123098, г. Москва

Методом полногеномного секвенирования (MiSeq, Illumina) определена практически полная нуклеотидная последовательность генома вируса Баткен (BKNV – Batken virus) (ID GenBank KJ396672–4). Прототипный штамм LEIV-K306 BKNV изолирован от иксодовых клещей *Hyalomma marginatum* Koch, 1844, собранных с овец в окрестностях районного центра Баткен в Киргизии в апреле 1970 г. Впоследствии на территории Киргизии BKNV был изолирован из смешанного пула комаров *Aedes caspius* Pallas, 1771 и *Culex hortensis* Ficalbi, 1889. Ранее было установлено, что BKNV чрезвычайно близок к вирусу Дхори (DHOV – Dhori virus) (*Orthomyxoviridae*, *Thogotovirus*), впервые изолированному от иксодовых клещей *Hyalomma dromedarii* Koch, 1844 в Индии. В настоящей работе показано, что структурные и неструктурные белки BKNV обладают высоким уровнем гомологии с DHOV – 98% (PB1) и 96% (PB2, PA, NP, M). Уровень гомологии поверхностного гликопротеина HA у BKNV и DHOV составляет 90%, что объясняет антигенные различия между этими близкородственными вирусами. Поскольку гомология остальных структурных и неструктурных белков BKNV и DHOV составляет 96–98%, можно заключить, что BKNV является топотипным вариантом DHOV, характерным для Средней Азии, Закавказья и Северного Прикаспия. Эволюционное расхождение BKNV и DHOV по поверхностному гликопротеину, вероятно, связано с локальными экологическими особенностями ареала BKNV.

Ключевые слова: *Orthomyxoviridae*; *Thogotovirus*; вирус Баткен, BKNV; вирус Дхори; DHOV; энцефалит; иксодовые клещи; *Ixodidae*; комары; *Culicinae*; зайцы; птицы; пастбищные биоценозы; Средняя Азия; Закавказье; Северный Прикаспий; метагеномный анализ; полногеномное секвенирование.

Genetic characterization of the Batken virus (BKNV) (*Orthomyxoviridae*, *Thogotovirus*) isolated from the Ixodidae ticks *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 and the mosquitoes *Aedes caspius* Pallas, 1771, as well as the *Culex hortensis* Ficalbi, 1889 in the Central Asia

S. V. Alkhovsky, D. K. Lvov, M. Yu. Shchelkanov, A. M. Shchetinin, P. G. Deryabin, D. N. Lvov, S. S. Lvov,
E. I. Samokhvalov, A. K. Gitelman, A. G. Botikov, K. G. Krasnoslobodtsev

D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

The prototype strain LEIV-K306 of the Batken virus (BKNV) was isolated from the Ixodidae ticks *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 collected from sheep near town Batken (Kirgizstan) in the April 1970. Later, the BKNV was isolated in Kirgizstan from the mixed pool of the *Aedes caspius* Pallas, 1771 and *Culex hortensis* Ficalbi, 1889 mosquitoes. From the very beginning, the BKNV was discussed to be very close to the Dhori virus (DHOV) (*Orthomyxoviridae*, *Thogotovirus*) isolated from the Ixodidae ticks *Hyalomma dromedarii* Koch, 1844 in India. In this work, virtually complete genome sequence (MiSeq, Illumina) of the BKNV was determined (ID GenBank KJ396672–4). Structural and non-structural proteins of the BKNV have a high level of homology with DHOV – 98% (PB1) and 96% (PB2, PA, NP, M). Homology of HA protein between the BKNV and DHOV is 90%, which accounts for antigenic difference between these close relative viruses. Since the differences in the other structural and non-structural proteins are about 96–98%, the BKNV could be suggested as the topotypic DHOV strain for Central Asia, Transcaucasia, and Northern Caspian region. The evolution divergence of the BKNV and DHOV for HA could be explained by local ecological peculiarities of the BKNV areal.

Key words: *Orthomyxoviridae*; *Thogotovirus*; Batken virus (BKNV); Dhori virus (DHOV); ticks; *Ixodidae*; mosquitoes; *Culicinae*; hares; birds; pasture biocenosis; Central Asia; Transcaucasia; Northern Caspian region; metagenomic analysis complete genome sequencing.

Прототипный штамм LEIV-K306 вируса Баткен (BKNV – Batken virus) изолирован от иксодовых клещей *Hyalomma marginatum* Koch, 1844, собранных с овец в окрестностях районного центра Баткен в Киргизии в апреле 1970 г. [1, 2]. Впоследствии на территории Киргизии BKNV был изолирован из смешанного пула комаров *Aedes caspius* Pallas, 1771 и *Culex hortensis* Ficalbi,

1889 [3]. Результаты исследований показали [1, 3–5], что BKNV чрезвычайно близок к вирусу Дхори (DHOV – Dhori virus) (*Orthomyxoviridae*, *Thogotovirus*), который впервые изолирован от иксодовых клещей *Hyalomma dromedarii* Koch, 1844, собранных с верблюдов в индийском штате Гуджарат [6, 7]. Гомологичность оболочечных белков DHOV и BKNV достигает 90% [5]. По со-

вокупности признаков BKNV может рассматриваться в качестве регионального варианта DHOV [5, 8–10].

Вместе с DHOV и BKNV в род *Thogotovirus* (*Orthomyxoviridae*) входят вирусы Тогото (THOV – *Thogoto virus*) и Арагуари (ARGV – *Aguary virus*). THOV впервые изолирован в 1960 г. из пула клещей *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus* Koch, 1844 и *Rhipicephalus evertsi* Neumann, 1897, собранных со скота в лесу Тогото в окрестностях г. Найроби (Кения). Позднее THOV был изолирован от людей, коров, верблюдов и клещей в Нигерии, Эфиопии, Кении, Камеруне, ЦАР, Уганде, Египте, Иране, Италии Португалии [11, 12]. ARGV, впервые изолированный в 1969 г. от опоссума (*Philander opossum*) в бразильском штате Амапа, по данным серологического обследования широко распространен у marsupialов (*Didelphis marsupialis*) и проживающих в регионе людей [13].

Тоготовирусы патогенны для человека, они вызывают лихорадочные заболевания, которые в ряде случаев осложняются энцефалитом и могут заканчиваться летально [9, 14, 15]. В частности, DHOV послужил причиной лабораторного, по-видимому, аэрогенного заражения 5 из 10 работавших сотрудников: у больных наблюдались симптомы поражения ЦНС [15].

В настоящей работе с использованием метода полногеномного секвенирования впервые определена практически полная последовательность генома BKNV. На основе полученных данных проведен молекулярный филогенетический анализ, в результате которого показано, что BKNV обладает высокой гомологией с DHOV, но имеет различия по гомологии поверхностного гликопротеина HA.

Материалы и методы

Вирусные штаммы. Использованный в работе BKNV LEIV-306K получен из Государственной коллекции вирусов РФ ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России в виде лиофилизированной мозговой суспензии. Для накопления вируса лиофилизированную суспензию восстановили в 1 мл культуральной среды ДМЕМ (с добавлением антибиотика) и использовали для интрацеребрального заражения новорожденных беспородных белых мышей. После развития симптомов поражения ЦНС (2–3 сут) мышей забивали в соответствии с правилами содержания и использования лабораторных животных. Фрагменты мозга (около 30 мг) помещали в 1 мл реагента TRIzol (Life Technology, США) и гомогенизировали пластиковым пестиком. Все работы, связанные с получением и накоплением вирусного материала, проводили в боксовых помещениях, оборудованных и сертифицированных для работы с микроорганизмами II группы патогенности.

Выделение РНК осуществляли согласно прилагаемой инструкции производителя данного реагента. Конечный осадок суммарной РНК растворяли в 100 мкл DEPC-обработанной воды. Для дополнительной очистки, а также для удаления низкомолекулярных фракций рибосомальной (5S) и транспортной РНК полученный препарат очищали набором «RNeasy mini kit» (QIAGEN, Германия) в режиме clean-up на автоматической станции QIAcube (QIAGEN, Германия) в соответствии с инструкцией. Концентрацию РНК измеряли, используя флуориметр Qubit (Invitrogen, США). Для удаления рибосомальной (18S и 28S) РНК использовали набор «Gen-Read rRNA depletion Kit» (QIAGEN, Германия) в соответствии с инструкцией. Для этого брали не более 3 мкг суммарной РНК. После проведения деплеции количество РНК BKNV и DHOV составляло около 200 нг.

Подготовка ДНК-библиотек и секвенирование. Для

получения кДНК около 100 нг деплецированной РНК фрагментировали в 15 мкл реакционной смеси для обратной транскриптазы с гексапраймером при 85°C в течение 5 мин, после чего помещали в лед. К фрагментированной РНК добавляли 200 ед. фермента RevertAid Premium (Thermo Scientific, США) и 20 ед. ингибитора РНаз RNasin (Promega, США). Инкубировали при 25°C 10 мин, далее при 42°C 60 мин. Реакцию останавливали прогреванием при 70°C 10 мин. Синтез второй цепи кДНК проводили с использованием набора «NEBNext® mRNA Second Strand Synthesis Module» (NEB, США) в соответствии с инструкцией. Полученную дцДНК очищали с помощью набора «MinElute PCR Purification Kit» (QIAGEN, Германия) на автоматической станции QIAcube.

Для получения ДНК-библиотек из дцДНК использовали набор «TruSeq DNA Sample Prep Kits v2» (Illumina, США) в соответствии с инструкцией. Для селекции ДНК по размеру использовали реагент «AMPure XP» (Beckman Coulter, США) с расчетом получения ДНК-библиотек длиной более 270 н.о., что соответствует размеру вставки около 150 н.о. Данные требования к размеру ДНК-библиотек связаны с использованием для секвенирования набора, позволяющего секвенировать не более 150 н.о. в одну сторону. Полученные библиотеки визуализировали на станции автоматического электрофореза «QIAxcel Advanced System» (QIAGEN, Германия). Молярность полученных библиотек измеряли методом полимеразно-цепной реакции в реальном времени (2x SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, США), прибор Bio-Rad CFX1000) согласно рекомендациям, изложенным в руководстве «Sequencing Library qPCR Quantification Guide» (Illumina, США).

Секвенирование ДНК-библиотек проводили на приборе MiSeq (Illumina, США) с использованием набора «MiSeq Reagent Kits V2 (300PE)» в соответствии с инструкцией производителя.

Биоинформационный анализ. Обработку данных полногеномного секвенирования, сборку контигов и картирование ридов осуществляли с помощью программы «CLC Genomics Workbench 5.5» (CLC bio, США). Предварительный поиск гомологичных последовательностей проводили, используя сервис BLASTX (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Для анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей использовали пакет программ «Lasergene Suite» (DNASTar, США). Филогенетический анализ и построение дендрограмм проводили, применяя программу MEGA5 по методу ближайшего соседа с 1000-кратным бутстреп-тестированием. Последовательности выравнивали по алгоритму ClustalW.

Результаты и обсуждение

Анализ данных полногеномного секвенирования вирусосодержащего BKNV материала провели двумя способами. В первом случае проводили сборку *de novo*, во втором риды картировали на референсную последовательность генома DHOV, поскольку ранее было показано, что BKNV по структурным белкам обладает высокой гомологией с DHOV. Картирование является более эффективным методом, чем сборка *de novo*, что выражается в получении более длинных контигов с более глубоким покрытием. В результате, сочетая два метода, получили консенсусные последовательности, которые практически полностью перекрывали геном BKNV.

Геном тоготовирусов представлен шестью сегментами РНК отрицательной полярности, которые кодируют семь протеинов (сегмент 6 кодирует две формы матриксного протеина, структура которых у TOGV и DHOV отличается). Наиболее консервативным белком является полимеразный

Уровень (в %) гомологии белков вируса Баткен (BKNV) LEIV-306К с тоготавирусами

Вирус	Вирусный белок					
	PB2 (сегмент 1)	PB1 (сегмент 2)	PA (сегмент 3)	HA (сегмент 4)	NP (сегмент 5)	M (сегмент 6)
Дхори (DHOV)	96,1	98,2	96,1	90	96,6	96,3
Тогото (TOGV)	34,7	65,6	42	36,3	43,7	25,1
Джос (JOSV)	33,8	60,9	37,6	35,1	45,2	27,3
Вирус гриппа А	21,3	31,6	25	–	27,4	–

Примечание. Также представлены данные о гомологии белков BKNV с вирусами гриппа А.

белок PB1, кодируемый сегментом 2. PB1 имеет структуру (включая полимеразные мотивы рге-А, А, В, С, D, Е), характерную для всех вирусов с сегментированным РНК-геномом отрицательной полярности. Уровень гомологии PB1 у ортомиксовирусов разных родов (например, *Thogotovirus* и *Influenza virus A*) достигает 30%. Между тоготавирусами гомология PB1 составляет от 60% (между TOGV и DHOV) до 74% (между TOGV и вирусом Джос (JOSV)). Два других белка репликативного комплекса PB2 и PA более дивергентны – их гомология между DHOV и TOGV составляет около 40%, а с вирусами рода *Influenza virus A* – около 25%. Белки полимеразного комплекса BKNV обладают высоким уровнем гомологии с DHOV – 98 и 96% для PB1 и PA/PB2 соответственно (см. таблицу).

Из структурных белков наиболее консервативным является белок нуклеокапсида (NP), кодируемый сегментом 5. Его гомология между DHOV и TOGV составляет около 45%. При этом уровень гомологии NP между TOGV и JOSV выше – 64%. Гомология NP BKNV с DHOV составляет 96% (см. таблицу). Белок NP является единственным структурным белком тоготавирусов, который обладает определенной гомологией с ортомиксовирусами других родов. Так, NP DHOV обладает около 27% идентичности с NP вируса гриппа А (см. таблицу).

Наиболее дивергентным белком можно считать матриксный белок М (сегмент 6), уровень гомологии которого у DHOV с TOGV и JOSV примерно одинаков – около 25%. При этом между TOGV и JOSV данное значение достигает 54%. Данный сегмент у TOGV и DHOV отличается и по схеме альтернативного сплайсинга, который приводит к продукции у TOGV второй формы (удлиненной) белка М. Тогда как у DHOV найдена дополнительная рамка считывания, кодирующая небольшой (12 кДа) белок с неизвестной функцией. Структура сегмента 6 генома BKNV соответствует DHOV и обладает с ним 96% гомологии.

Поверхностный гликопротеин HA (гемагглютинин) кодируется сегментом 4 и также является дивергентным белком. Это поверхностный гликопротеин, обладающий рецепторными функциями и несущий основные антигенные детерминанты ортомиксовирусов. Уровень гомологии DHOV с TOGV и JOSV по HA составляет 35%. При этом между TOGV и JOSV гомология HA достигает только 44%, что является наименьшим значением для всех белков между данными вирусами. Гомология HA BKNV с DHOV также составляет минимальное из всех белков значение – 90%. Дивергенция HA при высоком уровне гомологии других белков у BKNV и DHOV объясняет антигенные различия между этими близкородственными вирусами. Поскольку гомология остальных структурных и неструктурных белков BKNV и DHOV составляет 96–98%, можно заключить, что BKNV является топотипным, характерным для Средней Азии и Закавказья вариантом DHOV. Эволюционное расхождение BKNV и DHOV по поверхностному гликопротеину, вероятно, связано с локальными экологическими особенностями, хотя их ареалы перекрываются. Необходимо отметить, что BKNV

значительно чаще, чем DHOV, изолировали от комаров, что также может быть связано с различиями в структуре HA данных вирусов. Для анализа в качестве референс-последовательности генома DHOV использовали прототипный штамм DHOV 1313/61 (ID GenBank M65866), изолированный в Индии в 1973 г.

Все представители рода *Thogotovirus* тесно связаны с иксодовыми клещами – ранее этот род даже назывался *Orthoacarivirus*, с тем чтобы подчеркнуть экологическую связь с иксодовыми клещами (*Acari: Parasitiformes, Ixodidae* Koch, 1844) [9, 14].

Тесная экологическая связь DHOV/BKNV с клещами рода *Hyalomma*, в частности *H. marginatum*, определяет выявленный ареал, практически совпадающий с ареалом вируса ККГЛ [9, 10, 16–18]. DHOV выделен в Индии [6], Египте [11], южной части Португалии [11]; на территории бывшего СССР, BKNV – в Киргизии [1, 3] и Армении [19]; DHOV – в Астраханской области [19–22] и Азербайджане [19]. DHOV выделен от клещей *H. dromedarii* в Индии и Египте [6, 11, 12]; *H. marginatum* – в Португалии [11], Азербайджане и в Астраханской области [1, 19, 20–22]; *Ornithodoros lahorensis* – в Азербайджане; *Dermacentor marginatus* – в Армении, от комаров *Anopheles hyrcanus* – в Астраханской области [20]; BKNV из смешанного пула комаров *Aedes caspius* и *Culex hortensis* – в Киргизии [3].

При серологическом мониторинге в Киргизии антитела (АТ) к BKNV были обнаружены у людей (0,3%), овец (1%), крупного рогатого скота (КРС) (1,3%) [3]. Вируснейтрализующие АТ к DHOV выявлены в индийских штатах Гуджарат и Заурастра у 100% верблюдов, 19% лошадей, 2% коз и не отмечены у КРС, овец, собак и свиней. Иммунная прослойка среди домашних животных не обнаружена в штате Кашмир [6, 14].

Данные о природном резервуаре тоготавирусов среди диких позвоночных долгое время отсутствовали до выделения в Астраханской области DHOV от зайца-русака (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) [22]. DHOV был также изолирован из внутренних органов молодого баклана, добытого в 1-й декаде июля 2006 г. на острове Жемчужный, расположенном в северо-западной части Каспийского моря (45°00' с. ш., 48°18' з. д.), примерно в 100 км к югу от нижнего пояса дельты Волги (Среднеазиатская физико-географическая страна). Вируснейтрализующие АТ к DHOV на острове Жемчужный обнаружены у 10% больших бакланов (*Phalacrocorax carbo* Linnaeus, 1758), у 16,7% серебристых чаек (*Larus argentatus* Pontoppidan, 1763). У птицы, от которой выделен штамм DHOV, наблюдались клинические признаки заболевания: дыхательная недостаточность, неспособность к полету, потеря координации [23]. Именуются данные о чувствительности птиц водно-околоводного комплекса к заражению тоготавирусами [5, 8]. Стойкий очаг арбовируса при отсутствии кровососущих переносчиков (комары, иксодовые и аргасовые клещи) определяет уникальность экологической ситуации на острове Жемчужный. Это дает основание для предположений об иных механизмах

передачи вируса – через зараженный планктон и аэрозольным путем [23].

Зондирование территорий Средней Азии, Закавказья и Русской равнины проводили в рамках Программы по биобезопасности и изучению биоразнообразия в экосистемах Северной Евразии, а также для пополнения базы данных Государственной коллекции вирусов РФ [10, 16, 17, 19, 24].

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, проект № 13-04-01749 а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lvov D.K., Karas F.R., Tsyarkin G.M., Vargina S.G., Timofeev E.M., Osipova N.Z. et al. Batken virus, a new arbovirus isolated from ticks and mosquitoes in Kirghis SSR. Arch. Ges. Virusforschung. 1974; 44 (1): 70–3.
2. Batken (BKNV). In: Karabatsos N., ed. International Catalogue of arboviruses and some other viruses of vertebrates. San Antonio (Texas): Am. Soc. Trop. Med. Hyg.; 1985: 223–4.
3. Карась Ф.З. Арбовирусы Киргизии. В кн.: Гайдамович С.Я., ред. Арбовирусы. М.; 1978; вып. 3: 40–4.
4. Frese M., Weeber M., Weeber F., Speth V., Haller O. MX1 sensitivity of Batken viruses – an Orthomyxovirus. J. Gen. Virol. 1997; 78 (10): 2453–8.
5. Kawaoka Y., Cox N.J., Haller O., Hongo S., Kaverin N., Klenk H.D. et al. Family Orthomyxoviridae. In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A., eds. Virus taxonomy. 8th Report of the International committee on taxonomy of viruses. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2005: 681–93.
6. Anderson C.R. Recent advances in arthropod-borne virus research in India. Bull. Inst. Sci. India. 1963; 24: 205–16.
7. Dhori (DHOV). In: Karabatsos N., ed. International Catalogue of arboviruses and some other viruses of vertebrates. San Antonio (Texas): Am. Soc. Trop. Med. Hyg.; 1985: 371–2.
8. McCauley J.W., Hongo S., Kaverin N.V., Kochs G., Lamb R.A., Matrosovich M.N. et al. Orthomyxoviridae. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., ed. Virus taxonomy. 9th ed. London: Elsevier Academic Press; 2012: 749–61.
9. Львов Д.Н., Львов С.С. Тогоотовирусные энцефалиты. В кн.: Львов Д.К., ред. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. М.: МИА; 2013: 786–9.
10. Львов Д.К. Экология вирусов. В кн.: Львов Д.К., ред. Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. М.: МИА; 2013: 66–86.
11. Jupp P.G. Arboviral zoonoses in Africa. In: Beran G.W., Steel J.H., eds. Handbook of zoonoses. Section B: Viral. Boca Raton: CRC Press; 1994: 262–73.
12. Williams R.E., Hoogstraal H., Casals J., Kaiser M.N., Moussa M.I. Isolation on Wanowrie, Thogoto, and Dhori viruses from Hyalomma ticks infecting camels in Egypt. J. Med. Entomol. 1973; 10 (2): 143–6.
13. Da Silva E.V., Da Rosa A.P., Nunes M.R., Diniz J.A., Tesh R.B., Cruz A.C. et al. Araguari virus, a new member of the family Orthomyxoviridae: serologic, ultrastructural, and molecular characterization. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2005; 73 (6): 1050–8.
14. Moore D.L., Causey O.R., Carey D.E., Reddy S., Cooke A.R., Akinkugbe F.M. et al. Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964–1970. Ann. Trop. Med. Parasitol. 1975; 69 (1): 49–64.
15. Бутенко А.М., Леушинская Е.В., Семашко И.В., Донец М.А., Мартынова Л.И. Вирус Дхори – возбудитель заболевания человека, пять случаев лабораторной инфекции. Вопросы вирусологии. 1987; 32 (6): 724–9.
16. Львов Д.К., Дерябин П.Г., Аристова В.А., Бутенко А.М., Галкина И.В., Громашевский В.Л. и др. Атлас распространения возбудителей природно-очаговых вирусных инфекций на территории Российской Федерации. М.: МЗ РФ; 2001.
17. 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: 22–5.
18. Аристова В.А., Колобухина Л.В., Щелканов М.Ю., Львов Д.К. Экология вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки и особенности клиники на территории России и сопредельных стран. Вопросы вирусологии. 2001; 4: 7–15.
19. Lvov D.K. Arboviral zoonoses on Northern Eurasia (Easter Europe and the Commonwealth of Independent States). In: Beran G.W., Steel J.H., eds. Handbook of zoonoses. Section B: Viral. Boca Raton: CRC Press; 1994: 237–60.
20. Смирнова С.Я., Скворцова Т.М., Седова А.Г., Зимина Ю.В., Львов Д.К.

О вновь выделенных штаммах вируса Баткен. Вопросы вирусологии. 1988; 33 (3): 360–2.

21. Бутенко А.М., Чумаков М.П. Выделение нового для СССР арбовируса «Астра» из клещей *H. plumbeum* и комаров *An. hyrcanus* в Астраханской области. В кн.: Вопросы медицинской вирусологии. 1971; ч. 2: 11–2.
22. Львов Д.Н., Джаркенов А.Ф., Аристова В.А., Ковтунов А.И., Громашевский В.Л., Вышемирский О.И. и др. Изоляция вирусов Дхори (Orthomyxoviridae, Thogotovirus) и Крымской-Конго геморрагической лихорадки (Bunyaviridae, Nairovirus) от зайца (*Lepus euroaeus*) и собранных с него клещей *Hyalomma marginatus* в средней зоне дельты Волги, Астраханская область, 2001 г. Вопросы вирусологии. 2002; 47 (4): 32–6.
23. Яшуков К.Б., Щелканов М.Ю., Львов С.С., Джамбинов С.Д., Галкина И.В., Федякина И.Т. и др. Изоляция вирусов гриппа А (Orthomyxoviridae, Influenza A virus), Дхори (Orthomyxoviridae, Thogotovirus) и болезни Ньюкасла (Paramyxoviridae, Avulavirus) на о. Малый Жемчужный в северо-западной части акватории Каспийского моря. Вопросы вирусологии. 2008; 53 (3): 34–8.
24. 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. Иванова РАМН; 1993.

REFERENCES

1. Lvov D.K., Karas F.R., Tsyarkin G.M., Vargina S.G., Timofeev E.M., Osipova N.Z. et al. Batken virus, a new arbovirus isolated from ticks and mosquitoes in Kirghis SSR. Arch. Ges. Virusforschung. 1974; 44 (1): 70–3.
2. Batken (BKNV). In: Karabatsos N., ed. International Catalogue of arboviruses and some other viruses of vertebrates. San Antonio (Texas): Am. Soc. Trop. Med. Hyg.; 1985: 223–4.
3. Karas F.R. Arboviruses in Kirgizia. In: Gaydamovich S.Ya., ed. Arboviruses. Moscow; 1978; 3: 40–4 (in Russian).
4. Frese M., Weeber M., Weeber F., Speth V., Haller O. MX1 sensitivity of Batken viruses – an Orthomyxovirus. J. Gen. Virol. 1997; 78 (10): 2453–8.
5. Kawaoka Y., Cox N.J., Haller O., Hongo S., Kaverin N., Klenk H.D. et al. Family Orthomyxoviridae. In: Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A., eds. Virus taxonomy. 8th Report of the International committee on taxonomy of viruses. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2005: 681–93.
6. Anderson C.R. Recent advances in arthropod-borne virus research in India. Bull. Inst. Sci. India. 1963; 24: 205–16.
7. Dhori (DHOV). In: Karabatsos N., ed. International Catalogue of arboviruses and some other viruses of vertebrates. San Antonio (Texas): Am. Soc. Trop. Med. Hyg.; 1985: 371–2.
8. McCauley J.W., Hongo S., Kaverin N.V., Kochs G., Lamb R.A., Matrosovich M.N. et al. Orthomyxoviridae. In: King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., ed. Virus taxonomy. 9th ed. London: Elsevier Academic Press; 2012: 749–61.
9. Lvov D.N., Lvov S.S. Thogotoviral encephalitis. In: Lvov D.K., ed. Viruses and viral infection. Moscow: MIA; 2013: 786–9 (in Russian).
10. Lvov D.K. Ecology of the viruses. In: Lvov D.K., ed. Manual on Virology. Viruses and viral infections of humans and animals. Moscow: MIA; 2013: 68–86 (in Russian).
11. Jupp P.G. Arboviral zoonoses in Africa. In: Beran G.W., Steel J.H., eds. Handbook of zoonoses. Section B: Viral. Boca Raton: CRC Press; 1994: 262–73.
12. Williams R.E., Hoogstraal H., Casals J., Kaiser M.N., Moussa M.I. Isolation on Wanowrie, Thogoto, and Dhori viruses from Hyalomma ticks infecting camels in Egypt. J. Med. Entomol. 1973; 10 (2): 143–6.
13. Da Silva E.V., Da Rosa A.P., Nunes M.R., Diniz J.A., Tesh R.B., Cruz A.C. et al. Araguari virus, a new member of the family Orthomyxoviridae: serologic, ultrastructural, and molecular characterization. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2005; 73 (6): 1050–8.
14. Moore D.L., Causey O.R., Carey D.E., Reddy S., Cooke A.R., Akinkugbe F.M. et al. Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964–1970. Ann. Trop. Med. Parasitol. 1975; 69 (1): 49–64.
15. Butenko A.M., Leshchinskaya E.V., Semashko I.V., Donets M.A., Martyanova L.I. Voprosy virusologii. 1987; 32 (6): 724–9 (in Russian).
16. Lvov D.K., Deryabin P.G., Aristova V.A., Butenko A.M., Galkina I.V., Gromashevsky V.L. et al. Atlas of distribution of natural-focal viruses infection on the territory of Russian Federation. Moscow: Minzdrav RF; 2001 (in Russian).

17. Schelkanov M.Yu., Gromashevsky V.L., Lvov D. K. The role of ecovirological zoning in prediction of the influence of climatic changes on arbovirus habitats. Vestnik Ross. Acad. Med. Nauk. 2006; 2: 22–5 (in Russian).
18. Aristova V.A., Kolobukhina L.V., Shchelkanov M.Yu., Lvov D.K. Ecology of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever virus and clinical picture of the disease in Russia and its neighboring countries. Voprosy virusologii. 2001; 4: 7–15 (in Russian).
19. Lvov D.K. Arboviral zoonoses on Northern Eurasia (Easter Europe and the Commonwealth of Independent States). In: Beran G.W., Steel J.H., eds. Handbook of zoonoses. Section B: Viral. Boca Raton: CRC Press; 1994: 237–60.
20. Smirnova S.E., Skvortsova T.M., Sedova A.G., Zimina I.V., Lvov D.K. Newly isolated strains of the Batken virus. Voprosy virusologii. 1988; 33 (3): 360–2 (in Russian).
21. Butenko A.M., Chumakov M.P. Isolation of a new for USSR arbovirus "Astra" from ticks *H. plumbeum* and mosquitos *An. hyrcanus* in Astrakhan district. In: Voprosy Meditsinskoj virusologuu. 1971; ch. 2: 11–2 (in Russian).
22. Lvov D.N., Dzharhenov A.F., Aristova V.A., Kovtunov A.I., Gromashevskii V.L., Vyshemirskii O.I. et al. The isolation of Dhori viruses (Orthomyxoviridae, Thogotovirus) and Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (Bunyaviridae, Nairovirus) from the hare (*Lepus europaeus*) and its ticks *Hyalomma marginatum* in the middle zone of the Volga delta, Astrakhan region, 2001. Voprosy virusologii. 2002; 47 (4): 32–6 (in Russian).
23. Yashkulov K.B., Shchelkanov M.Yu., Lvov S.S., Dzhambinov S.D., Galkina I.V., Fediakina I.T. et al. Isolation of influenza virus A (Orthomyxoviridae, Influenza A virus), Dhori virus (Orthomyxoviridae, Thogotovirus), and Newcastle's disease virus (Paromyxoviridae, Avulavirus) on the Malyi Zhemchuzhnyi Island in the north-western area of the Caspian. Voprosy virusologii. 2008; 53 (3): 34–8 (in Russian).
24. Lvov D.K., ed. Organization of ecological-epidemiological monitoring in Russian Federation for anti-epidemic defense of the civilians and army. Moscow: Minzdrav RF, The Federal Office of Biomedical and Extreme Problems, The D.I. Ivanovsky Institute of Virology; 1993 (in Russian).

Поступила 25.11.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 615.281.8.03:616.24-002-022:578.832.1].076.9

М.Ю. Щелканов, В.А. Шибнев, М.П. Финогенова, И.Т. Федякина, Т.М. Гараев, Н.В. Маркова, И.М. Кириллов

Противовирусная активность производных адамантана в отношении вируса гриппа А(H1N1)pdm09 на модели *in vivo*

ФГБУ «НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского» Минздрава России, 123098, г. Москва

Впервые *in vivo* на модели вирусной пневмонии мышей исследована противовирусная активность в отношении вируса гриппа А(H1N1)pdm09 синтетических производных адамантанового ряда, включающих остатки аминокислот и липоевую кислоту. Установлено, что производные адамантана с остатками гистидина, серина и липоевой кислоты способны ингибировать резистентный к ремантадину штамм вируса гриппа А(H1N1)pdm09. В результате продолжительность жизни мышей, зараженных вирусом, увеличилась в 1,6 раза относительно таковой в группе вирусного контроля. Таким образом, показана возможность реанимации противовирусных свойств ремантадина как *in vitro*, так и *in vivo* путем введения в его молекулярную структуру новых функционально активных групп.

Ключевые слова: производные адамантана; аминокислоты; адамантанкарбоновые кислоты; ремантадин; грипп А; резистентность.

The antiviral activity of the adamantane derivatives against the influenza virus A (H1N1) pdm2009 model *in vivo*

M. Yu. Shchelkanov, V. A. Shibnev, M. P. Finogenova, I. T. Fedjakina, T. M. Garaev, N. V. Markova, I. M. Kirillov

D.I. Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russia

For the first time *in vivo*, the model of the viral pneumonia in mice was used to study the antiviral activity against influenza A virus (H1N1) pdm09 synthetic derivatives of adamantane series including the amino acid residues and lipid acid. It was found that the adamantane derivatives with histidine, serine, and lipid acid could inhibit the rimantadine-resistant strain of the influenza A (H1N1) pdm09. As a result, the lifespan of the mice infected with the virus has increased by 1.6 times with respect to viral control. Thus, the possibility of restoration of antiviral properties of rimantadine both *in vitro* and *in vivo* by introducing into its molecular structure new functionally active groups was tested.

Key words: adamantane derivatives; amino acid; adamantanecarbonic acid; rimantadine; influenza A; resistance.

Проблема гриппа – по-прежнему одна из актуальнейших в области науки, что обусловлено высоким уровнем заболеваемости – на долю гриппа и гриппоподобных заболеваний приходится до 90% всех инфекций. Вирусы гриппа активно циркулируют в природе.

В настоящее время известен ряд лекарственных препаратов, направленных на подавление репликации вируса гриппа. Это ингибиторы нейраминидазы – озельтамивир (тамифлю) и занамивир (реленза), а также ингибиторы функций канала М2 – ремантадин и амантадин.

Известно, что ремантадин используют с начала 1980-х годов для лечения и профилактики гриппозной инфекции. Биологическая активность ремантадина связана с угнетением функции белка М2 в белковой оболочке вируса гриппа А, который регулирует транспорт протонов через оболочку вируса внутрь вириона [1]. Данные кристаллографических исследований показывают, что белок М2 содержит четыре одинаковые субъединицы, образующие тетрамер, который расположен в мембране вируса. Эти субъединицы частично спирализованы в левозакру-

Для корреспонденции:

Гараев Тимур Мансурович, gtim@fmradio.ru