

**РОССИЙСКАЯ
АКАДЕМИЯ
НАУК**

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

ЛР № 010215 от 29.04.97

Почтовый адрес:

115088, Москва,
ул. Новоостاپовская, д. 5, стр. 14,
ОАО «Издательство "Медицина"»

Адрес редакции: 109029, Москва,
ул. Скотопрогонная, дом 29/1,
подъезд 15

Зав. редакцией *Л. В. Кузнецова*
Тел. +7-495-678-63-95

E-mail: vopr.virusol@idm.msk.ru
www.medlit.ru

ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ

Тел./факс +7-495-678-64-84

E-mail: info@idm.msk.ru
www.medlit.ru

**Ответственность за
достоверность информации,
содержащейся
в рекламных материалах,
несут рекламодатели.**

Редактор *Е.П. Мороз*

Художественный редактор
А. В. Минаичев

Технический редактор
Л. В. Зюкина

Корректор *Т. Д. Малышева*

Переводчик *С. К. Чаморовский*

Верстка *Е. М. Архипова*

Сдано в набор 19.01.2016.

Подписано в печать 14.03.2016.

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная.

Печ. л. 6,00.

Усл. печ. л. 5,88.

Уч.-изд. л. 6,36.

Заказ 85.

Отпечатано в типографии ООО

"Подольская Периодика",

142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

ISSN 0507-4088. *Вопр. вирусологии.* 2016.

Т. 61. № 2. 49-96

Все права защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

Свидетельство о регистрации № 1170

от 11 декабря 1990 г.



**МОСКВА
«ИЗДАТЕЛЬСТВО
"МЕДИЦИНА"»**

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

Основан в 1956 г.

2

Том 61 · 2016

Редакционная коллегия

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

Зам. главного редактора: **Дерябин П.Г. (д.м.н., проф.)**

Ответственный секретарь: **Гребенникова Т.В. (д.б.н., проф.)**

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

Члены редколлегии:

Баринский И.Ф. (д.м.н., проф.)

Белоусова Р.В. (д.в.н., проф.)

Галегов Г.А. (д.б.н., проф.)

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

Гурцевич В.Э. (д.м.н., проф.)

Ершов Ф.И. (д.м.н., проф., акад. РАН)

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

Зуев В.А. (д.м.н., проф.)

Иванова О.Е. (д.м.н., доцент)

Карганова Г.Г. (д.б.н., доцент)

Киселев Ф.Л. (д.б.н., проф., член-корр. РАН)

Клименко С.М. (д.м.н., проф., акад. РАН)

Лашкевич В.А. (д.м.н., проф., акад. РАН)

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

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

Щелканов М.Ю. (д.б.н.)

Юминова Н.В. (д.м.н., доцент)

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Акимкин В.Г. (д.м.н., проф., чл.-кор. РАН; Москва, Россия)

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

Ананьев В.Ю. (к.м.н., рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Приморском крае"; Владивосток, Россия)

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

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

Борисевич С.В. (д.м.н., проф.; Сергиев Посад, Россия)

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

Бутаев Т.М. (д.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Республике Сев. Осетия-Алания; Владикавказ, Россия)

Гарбуз Ю.А. (рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Хабаровском крае"; Хабаровск, Россия)

Глинских Н.П. (д.м.н., проф.; Екатеринбург, Россия)

Григорьев С.Н. (рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Магаданской обл."; Магадан, Россия)

Дроздов С.Г. (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

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

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

Иванов А.И. (рук. ФКУЗ "Хабаровская ПЧС"; Хабаровск, Россия)

Киселёв О.И. (д.м.н., проф., акад. РАН; СПб, Россия)

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

Лебедев Г.Б. (зам. рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Чукотском АО"; Анадырь, Россия)

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

Лисицин Е.А. (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Владимирской обл.; Владимир, Россия)

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

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

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

Мукомолов С.Л. (д.м.н., проф.; СПб, Россия)

Нетесов С.В. (д.б.н., проф., чл.-кор. РАН; Новосибирск, Россия)

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

Огарков П.И. (д.м.н., проф.; СПб, Россия)

Покровский В.И. (д.м.н., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

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

Романенко В.В. (д.м.н., зам. рук. ФБУЗ "ЦГЭ в Свердловской обл."; Екатеринбург, Россия)

Сергеев А.Н. (д.м.н., проф.; Новосибирск, Россия)

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

Тутельян А.В. (д.м.н.; Москва, Россия)

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

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

Янович В.А. (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Еврейской АО; Биробиджан, Россия)

Яшкулов К.Б. (к.м.н., рук. Упр. Роспотребнадзора по Республике Калмыкия; Элиста, Россия)

ИНОСТРАННЫЕ ЧЛЕНЫ РЕДАКЦИОННОГО СОВЕТА

Виноград Н.А. (д.м.н., проф.; Львов, Республика Украина)

Владыко А.С. (д.м.н., проф.; Минск, Республика Беларусь)

Горбунов В.А. (к.м.н.; Минск, Республика Беларусь)

Грибкова Н.В. (к.м.н.; Минск, Республика Беларусь)

Петкевич А.С. (к.м.н.; Минск, Республика Беларусь)

Титов А.П. (д.м.н., проф., чл.-кор. НАН Беларуси, акад. РАН; Минск, Республика Беларусь)

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

Berencsi G. (PhD, MD, Prof.; Budapest, Hungary)

Ciampor F. (PhD, MD, DrSc; Bratislava, Slovak Republic)

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

De Paiva T.M. (PhD; San Paulo, Brazil)

Galabov A.S. (Prof., acad. of the Bulgarian Academy of Sciences; Sofia, Bulgaria)

Golovljova I. (PhD; Tallinn, Estonia)

Goujgoulova G. (PhD; Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. (PhD; Hamilton, USA)

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

Klenk H.-D. (PhD, Prof.; Marburg, Germany)

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

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

Maneekarn N. (PhD, D.V.M., Prof.; Chiang Mai, Thailand)

Matrosovich M.N. (PhD; Marburg, Germany)

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

Oxford J. (DSc; London, UK)

Petrenkienė V. (Assoc. Prof.; Kaunas, Lithuania)

Roggendorf M. (MD, Essen, Germany)

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

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

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

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

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

Vainionpää R. (Docent; Turku, Finland)

Webster R. (PhD, DSc, Memphis, USA)

Webby R. (PhD, Memphis, USA)

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

Zeichardt H. (PhD, DSc, Prof.; Berlin, Germany)

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES
VOPROSY VIRUSOLOGII
(PROBLEMS OF VIROLOGY)

Scientific Theoretical Journal Issued once in two months. Published since 1956

Volume 61 • 2 • 2016

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief: LVOV D.K., MD, PhD, DSc, Professor, Academician of RAS

Assistant editors in chief: **Deryabin P.G.**, MD, PhD, DSc, Professor

Executive secretary: **Grebennikova T.V.**, Doctor of Biological Sciences, Professor

Scientific editor: **Zaberezhnyy A.D.**, Doctor of Biological Sciences, Professor

Members of editorial board:

Barinskiy I.F. – MD, PhD, DSc, Prof.; **Belousova R.V.** – Doctor of Veterinary Sciences, Prof.; **Galegov G.A.** – Doctor of Biological Sciences, Prof.; **Gulyukin M.I.** – Doctor of Veterinary Sciences, Prof., Academician of RAS; **Gurtsevich V.E.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Ershov F.I.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Zverev V.V.** – Doctor of Biological Sciences, Prof., Academician of RAS; **Zuev V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof.; **Ivanova O.E.** – MD, PhD, DSc, docent; **Karganova G.G.** – Doctor of Biological Sciences, docent; **Kiselev E.L.** – Doctor of Biological Sciences, Prof., corresponding member RAS; **Klimenko S.M.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Lashkevich V.A.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Onishchenco G.G.** – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS; **Uryvaev L.B.** – MD, PhD, DSc, Prof., corresponding member of RAS; **Shchelkanov M.Yu.** – Sc.D.; **Yuminova N.V.** – MD, PhD, DSc, docent

Editorial council

Akimkin V.G. – MD, PhD, DSc, Prof., corr. member of RAS (Moscow)

Aliper T.I. – Sc.D., Prof. (Moscow)

Anan'ev V.Yu. – MD, PhD (Vladivostok)

Antonov V.A. – MD, PhD, DSc, Prof. (Volgograd)

Baranov A.A. – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow)

Borisevich S.V. – MD, PhD, DSc, Prof. (Sergiev Posad)

Briko N.I. – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow)

Butaev T.M. – MD, PhD, DSc (Vladikavkaz)

Garbuz Yu.A. – MD (Khabarovsk)

Glinskikh N.P. – MD, PhD, DSc, Prof. (Ekaterinburg)

Grigor'ev S.N. – MD (Magadan)

Drozdov S.G. – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow)

Zasedatelev A.S. – Doctor of physical, Prof. (Moscow)

Zlobin V.I. – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Irkutsk)

Ivanov L.I. – MD (Khabarovsk)

Kiselev O.I. – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Saint-Petersburg)

Kutyrev V.V. – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Saratov)

Lebedev G.B. – MD (Anadyr')

Leonova G.N. – MD, PhD, DSc, Prof. (Vladivostok)

Lisitsin E.A. – MD, PhD (Vladimir)

Loktev V.B. – Sc.D., Prof. (Novosibirsk)

Malyshev N.A. – MD, PhD, DSc, Prof. (Moscow)

Mikhaylov M.I. – MD, PhD, DSc, Prof., corr. member of RAS (Moscow)

Mukomolov S.L. – MD, PhD, DSc, Prof. (Saint-Petersburg)

Netesov S.V. – Sc.D., Prof., corr. member of RAS (Novosibirsk)

Nikiforov V.V. – MD, PhD, DSc, Prof. (Moscow)

Ogarkov P.I. – MD, PhD, DSc, Prof. (Saint-Petersburg)

Pokrovskiy V.I. – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow)

Reznik V.I. – MD, PhD (Khabarovsk)

Romanenko V.V. – MD, PhD, DSc (Ekaterinburg)

Sergeev A.N. – MD, PhD, DSc, Prof. (Novosibirsk)

Stepanova T.F. – MD, PhD, DSc, Prof. (Tyumen')

Tutel'yan A.V. – MD, PhD, DSc (Moscow)

Chuchalin A.G. – MD, PhD, DSc, Prof., Academician of RAS (Moscow)

Shestopalov A.M. – Sc.D., Prof. (Novosibirsk)

Yanovich V.A. – MD, PhD (Birobidzhan)

Yashkulov K.B. – MD, PhD (Elista)

Advisory Board

Vinograd N.A. – MD, PhD, DSc, Prof. (Lvov, Ukraina)

Vladyko A.S. – MD, PhD, DSc, Prof. (Minsk, Republic of Belarus)

Gorbunov V.A. – MD, PhD (Minsk, Republic of Belarus)

Gribkova N.V. – MD, PhD (Minsk, Republic of Belarus)

Petkevich A.S. – MD, PhD (Minsk, Republic of Belarus)

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

Becker J. – PhD, DM, Prof. (Jerusalem, Israel)

Berenci G. – PhD, MD, Prof. (Budapest, Hungary)

Ciampor F. – PhD, MD, Dr.Sc. (Bratislava, Slovak Republic)

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

De Paiva T.M. – PhD (San Paulo, Brazil)

Galabov A.S. – Prof., acad. of the Bulgarian Academy of Sciences (Sofia, Bulgaria)

Golovljova I. – PhD (Tallinn, Estonia)

Goujgoulova G. – PhD (Sofia, Bulgaria)

Hoenen T. – PhD (Hamilton, USA)

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

Klenk H.-D. – PhD, Prof. (Marburg, Germany)

Kuhn J.H. – MD, PhD, PhD, MSc (Frederick, USA)

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

Maneekarn N. – PhD, D.V.M., Prof. (Chiang Mai, Thailand)

Matrosovich M.N. – PhD (Marburg, Germany)

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

Oxford J. – DSc (London, UK)

Petrenkiene V. – Assoc. Prof. (Kaunas, Lithuania)

Roggendorf M. – MD (Essen, Germany)

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

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

Tashiro M. – PhD, MD (Tokyo, Japan)

Turan K. – PhD, Assoc. Prof. (Istanbul, Turkey)

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

Vainionpää R. – Docent (Turku, Finland)

Webster R. – PhD, DSc. (Memphis, USA)

Webby R. – PhD (Memphis, USA)

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

Zeichardt H. – PhD, DSc, Prof. (Berlin, Germany)



Izdatel'stvo Meditsina

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Макаров В.В., Гулюкин М.И., Львов Д.К.** Зоопатогенные ортобуньявирусы (*Orthobunyavirus*, Bunyaviridae) 53
Глотов А.Г., Глотова Т.И., Шуляк А.Ф. Пестивирусы жвачных животных 59

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Евдокимов В.В., Науменко В.А., Тюленев Ю.А., Курило Л.Ф., Ковалык В.П., Сорокина Т.М., Лебедева А.Л., Гомберг М.А., Куц А.А.** Количественная оценка ДНК вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска и герпесвирусов человека у мужчин при нарушении фертильности 63
Замедянская А.С., Титова К.А., Сергеев Ал.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев Ар.А., Галахова Д.О., Нестеров А.Е., Носарева О.В., Шишкина Л.Н., Таранов О.С., Омигов В.В., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Оценка чувствительности человека к вирусу натуральной оспы с использованием первичных культур моноцитов-макрофагов 69
Чешик С.Г., Кистенева Л.Б. Цитомегаловирусная инфекция и спонтанные аборт у женщин в I и II триместрах беременности 74
Титова К.А., Сергеев Ал.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев Ар.А., Галахова Д.О., Шишкина Л.Н., Замедянская А.С., Нестеров А.Е., Глотов А.Г., Таранов О.С., Омигов В.В., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Использование модели мышь ICR – вирус натуральной оспы для оценки эффективности противовирусных препаратов 79
Ильиных А.В., Поленогова О.В. Доказательство вертикальной передачи вируса ядерного полиэдрома в ряду генераций непарного шелкопряда *Lymantria dispar* (L.) 85

ДИСКУССИЯ

- Ковалев С.Ю., Мухачева Т.А.** Унификация молекулярно-эпидемиологических исследований клещевого энцефалита 89

НЕКРОЛОГ

- Памяти Олега Ивановича Киселева** 96
Памяти Федора Львовича Киселева

CONTENTS

REVIEWS

- Makarov V.V., Guliukin M.I., Lvov D.K.** Zoopathogenic orthobunyaviruses (*Orthobunyavirus*, Bunyaviridae) 53
Glotov A.G., Glotova T.I., Shulyak A.F. Pestiviruses in ruminants

ORIGINAL RESEARCH

- Evdokimov V.V., Naumenko V.A., Tulenev Yu.A., Kurilo L.F., Kovalyk V.P., Sorokina T.M., Lebedeva A.L., Gomberg M.A., Kushch A.A.** Quantitative DNA evaluation of the high carcinogenic risk of human papilloma viruses and human herpes viruses in males with fertility disorders 63
Zamedyanskaya A.S., Titova K.A., Sergeev Al.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev Ar.A., Galakhova D.O., Nesterov A.E., Nosareva O.V., Shishkina L.N., Taranov O.S., Omigov V.V., Agafonov A.P., Sergeev A.N. Evaluation of the human sensitivity to smallpox virus by the primary cultures of the monocyte-macrophages 69
Cheshik S.G., Kisteneva L.B. Human cytomegalovirus infection and spontaneous abortion in pregnant women of I and II trimester 74
Titova K.A., Sergeev Al.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev Ar.A., Galakhova D.O., Shishkina L.N., Zamedyanskaya A.S., Nesterov A.E., Glotov A.G., Taranov O.S., Omigov V.V., Agafonov A.P., Sergeev A.N. The use of the model mouse ICR – variola virus for evaluation of antiviral drug efficacy 79
Ilyinykh A.V., Polenogova O.V. The proof of vertical transmission of the nucleopolyhedrovirus in many generations of the gypsy moth *Lymantria dispar* L.

DISCUSSION

- Kovalev S.Y., Mukhacheva T.A.** Unification of the molecular epidemiological research of the tick-borne encephalitis

OBITUARY

- O.I. Kiselev**
F.L. Kiselev

Журнал "Вопросы вирусологии" входит в Перечень ведущих научных журналов и изданий ВАК, в которых должны быть опубликованы значимые результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016
УДК 578.833.11

Макаров В.В.¹, Гулюкин М.И.², Львов Д.К.³

ЗООПАТОГЕННЫЕ ОРТОБУНЬЯВИРУСЫ (*ORTHOBUNYAVIRUS*, *BUNYAVIRIDAE*)

¹ГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», 115419, г. Москва; ²ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко», 109428, г. Москва; ³Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва

В аналитической статье представлены систематика и таксономия ортобуньявирусов, малоизученные опасные и новые вирусы болезней Акабана, Аино, Шмалленберг, долины Кэш, лихорадки Оропуш. Обсуждается значение реассортационного механизма их возникновения и разнообразия.

Ключевые слова: ортобуньявирусы; болезни Акабана, Аино, Шмалленберг, долины Кэши, лихорадка Оропуш; реассортация.

Для цитирования: Макаров В.В., Гулюкин М.И., Львов Д.К. Зоопатогенные ортобуньявирусы (*Orthobunyavirus*, *Bunyaviridae*). *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (2): 53-58.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2- 53-58

Makarov V.V.¹, Guliukin M.I.², Lvov D.K.³

ZOOPATHOGENIC ORTHOBUNYAVIRUSES (*ORTHOBUNYAVIRUS*, *BUNYAVIRIDAE*)

¹'Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 115419, Russian Federation; ²Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary, Moscow, 109428, Russian Federation; ³D.I. Ivanovsky Institute of Virology "Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya", Moscow, 123098, Russian Federation

This work deals with the systematics and taxonomy of orthobunyaviruses, little-studied dangerous and new viruses Akabane, Aino, Schmalleberg, Cache Valley diseases, Oropouche fever. The significance of the reassortment mechanism of their origin and diversification is discussed.

Key words: *orthobunyaviruses; Akabane; Aino; Schmalleberg; Cache Valley diseases; Oropouche fever virus; reassortment.*

For citation: Makarov V.V., Guliukin M.I., Lvov D.K. Zoopathogenic orthobunyaviruses (*Orthobunyavirus*, *Bunyaviridae*). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(2): 53-58. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2 - 53-58

For correspondence: Vladimir V. Makarov, Doctor of Biology, Professor, Head of the Chair of Veterinary Pathology, Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, 115419, Russian Federation, E-mail: vvm-39@mail.ru

Information about authors:

Lvov D.K., <http://orcid.org/0000-0001-8176-6582>

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received 1 October 2015
Accepted 19 November 2015

К настоящему времени категория новых и возвращающихся (emerging – reemerging) инфекций животных и человека является важнейшей проблемой. В основном это зоонозы вирусной природы, возбудители которых эволюционируют в системах хозяин ↔ патоген ↔ среда [1, 2].

Помимо прочего, этому способствуют многоплановые аспекты глобальной человеческой деятельности, такие как драматический рост перемещений людей и коммерческой активности, изменение жизненных стандартов во взаимоотношениях человек ↔ животные (вплоть до социальных аномалий и зоомании), экологические трансформации, безудержная гуманизация природы и урбанизация, увеличение производства продуктов животного

происхождения. Например, особо значимой, безусловно, явится реализация в ближайшее десятилетие глобальных программ типа «Революции в скотоводстве» («Livestock revolutions») путем создания в относительной близости от Российской Федерации и Европейского Союза так называемого Евразийского коридора жвачных (Eurasian ruminant street) от Восточно-Средиземноморского бассейна до Центральной Азии, включая территории Турции, Ирана, Пакистана, Афганистана, Аравийского полуострова. Неизбежное при этом увеличение животного населения будет создавать беспрецедентные условия для инкубации патогенов, опасных как для животных, так и для человека.

Для корреспонденции: Макаров Владимир Владимирович, д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой ветеринарной патологии ГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов», 115419, г. Москва, E-mail: vvm-39@mail.ru

Ортобуньявирусы группы Симбу [1, 4, 5]

Серокомплекс	Вирус	Ареал	Переносчики	Заболевшие позвоночные
Акабане	Акабане (AKAV – Akabane)	Австралия, Азия, Африка	Комары	Домашние животные
	Джагар (JARV – Jagar)	Азия	Комары	Неизвестно
	Дуглас (DOUV – Douglas)	Австралия	Мокрецы	Дикие и домашние животные
	Ирике (IRIV – Iriki)	Азия	Мокрецы	Неизвестно
	Сабо (SABOV – Sabo)	Африка	Мокрецы	Домашние животные
	Сатупери (SATV – Sathuperi)	Африка, Азия	Мокрецы, комары	" "
	Тинару (TINV – Tinaroo)	Австралия	Мокрецы	" "
	Шамонда (SHAV – Shamonda)	Африка	Мокрецы	" "
	Шмалленберг (SCHMV – Schmallenberg)	Европа, Азия	Мокрецы	" "
Манзанилла	Яба (Y7V – Yaba 7)	Африка	Комары	Неизвестно
	Баттонвиллоу (BUTV – Buttonwillow)	Африка	Комары	Дикие, домашние животные, люди (лихорадка)
	Ингвавума (INGV – Ingwavuma)	Африка, Азия	Комары	Птицы, домашние животные
	Инини (INIV – Inini)	Южная Америка	Неизвестно	Домашние животные
	Манзанилла (MANV – Manzanilla)	Южная Америка	"	Птицы
Оропуш	Мермет (MTRV – Mermet)	Северная Америка	Комары	Неизвестно
	Оропуш (OROV – Oropuche)	Южная Америка	Мокрецы, комары	Люди, птицы, дикие животные
	Утинга (UTIV – Utinga)	Южная Америка	Мокрецы	Птицы, летучие мыши, дикие и домашние животные, люди (лихорадка)
Симбу	Симбу (SIMV – Simbu)	Африка	Комары	Люди (лихорадка)
Тимири	Тимири (THIV – Thimiri)	Африка, Азия	Неизвестно	Птицы
Шуни	Аино (AIV – Aino)	Австралия, Азия	Комары, мокрецы	Домашние животные, люди (лихорадка)
	Кайкалур (KAIV – Kaikalur)	Азия	Комары	Неизвестно
	Питон (PEAV – Peaton)	Австралия	Мокрецы	Домашние животные
	Санго (SANV – Sango)	Африка	Комары, мокрецы	" "
	Шуни (SHUV – Shuni)	Африка	Комары	Домашние животные, люди (лихорадка)

Приблизительно 1/3 от общего числа эмерджентных болезней приходится на арбовирусные инфекции, передаваемые членистоногими переносчиками. Впечатляющим примером является масштабная экспансия с 1998 г. типично тропической инфекции жвачных блютанга на эндемичной территории юга и северо-запада Европы с формированием новых типов очагов и возникновением там же неизвестной ранее болезни Шмалленберг [3].

В настоящей статье анализируются некоторые вопросы, связанные с особой ролью в контексте обсуждаемой проблемы представителей рода *Orthobunyavirus* (Bunyaviridae).

Ортобуньявирусы – один из пяти родов семейства Bunyaviridae. За исключением хантавирусов, представители семейства являются арбовирусами, передающимися членистоногими (насекомыми и клещами). Семейство включает около 500 представителей, многие из которых имеют весьма серьезное значение в инфекционной патологии животных и человека, вызывая вспышки, эпидемии, эпизоотии, создавая эмерджентные ситуации, в том числе на эндемичных территориях, сопровождающиеся разнообразными патологическими процессами.

Эти сферические, имеющие липидную оболочку вирусы диаметром 80 – 120 нм содержат сегментирован-

ный геном – 3 односпиральных молекулы (-) РНК. Три сегмента генома длиной 1, 4,5 и 6,5 кД обозначены по размеру как S, M и L (малый, средний и большой). Концевые последовательности сегментов консервативны и родоспецифичны [4]. Как и другие вирусы с сегментированным геномом, буньявирусы имеют возможность реассортации с образованием новых вариантов при одновременной коинфекции одной клетки [4].

Род *Orthobunyavirus* насчитывает более 220 вирусов, сгруппированных в 18 серогрупп. Сиквенс-информация имеется для групп Bunyamwera, Bwamba, California encephalitis, Gamboa C, Maputta, Nyando, Simbu, Anopheles A, Capim, Guama, Koongol, Tete, Turlock и двух негруппированных вирусов – Tataguine и Witwatersrand [5]. К ортобуньявирусам примыкают недавно описанные вирусы Khurdun [6], Herbert, Kibale, Tai [7].

Существенный интерес в контексте ветеринарного и медицинского значения представляет серогруппа Симбу, включающая не менее 24 представителей, а также серогруппы Буньямвера из 22 вирусов и Калифорнийского энцефалита – 13 вирусов (табл. 1).

Ортобуньявирусы распространены в тропическом поясе преимущественно в экваториальных тропических лесах на всех континентах. Большинство вирусов пере-

Таблица 2

Природные реассортанты ортобуньявирусов, имеющие эпидемиологическое и эпизоотологическое значение [10, 12, 15–17]

Реассортант	Сегмент генома			Ареал	Литературный источник
	S	M	L		
Tinaroo	Akabane	ни	Akabane	Австралия	[10]
Jatobal	Oropuche	ни	ни	Бразилия	[16]
Ikitos	Oropuche	ни	Oropuche	Перу	[16]
Ngary	Bunyamvera	Batai	Bunyamvera	Кения, Сомали	[17]
Schmallenberg	Shamonda	Sathuperi	Shamonda	Северо-запад Европы	[12]

Примечание. ни – неизвестный ортобуньявирус.

дается комарами и мокрецами, поражает преимущественно крупный и мелкий рогатый скот, а также людей. В числе зоопатогенных из группы Симбу эпизоотически значимые вирусы болезней Акабанае, Айно, Шмалленберг, потенциально патогенные вирусы Дуглас, Питон, Сатупери, Симбу, Тинару, Шамонда, Шуни и другие, участвующие в образовании вирулентных реассортантов (табл. 2), а также вирус долины Кэш из группы Буньямвера.

Вирус болезни Акабанае (АКАВ)

АКАВ инфицирует широкий спектр животных, включающий крупный рогатый скот, овец, коз, буйволов, верблюдов, лошадей. Среди ортобуньявирусов он является наиболее изученным и важным патогеном жвачных: инapparантно протекающая у интактных животных болезнь Акабанае у беременных особей сопровождается тяжелыми конгенитальными эффектами.

Вирус впервые изолирован в 1959 г. в Японии. По данным вирусологической, серологической и клинической регистрации, АКАВ распространен в двух географических кластерах: первый включает Юго-Восточную Азию (Япония, Корея, Тайвань) и Австралию, второй – Ближний Восток (Турция, Израиль, Кипр, Саудовская Аравия, Йемен) и Центральную Африку (Судан, Кения), где выявляется у многих индигенных животных. Вероятно, инфекция присутствует в Южной Америке. Переносчиками являются преимущественно *Culicoides imicola*, а также другие мокрецы тропического пояса, что указывает на возможность перизэкваториального распространения инфекции в пределах ареала *Culicoides*.

Только в Австралии и Японии болезнь Акабанае проявляется в виде регулярных эпизоотий среди крупного рогатого скота и овец. Заболеваемость коров в стадах в среднем составляет 50%, овец – до 80%. Благоприятствующими условиями служат высокая плотность восприимчивых жвачных в ранней стадии беременности и увеличение популяции векторов, особенно после отсутствия инфекции в течение 4–6 предшествующих лет и иммунологической ревергинизации животной популяции.

В условиях эндемии восприимчивые небеременные животные в ответ на естественную субклиническую инфекцию после 3–4-дневной вирусемии вырабатывают нейтрализующие антитела, которые впоследствии защищают материнский организм и плод от конгенитального заражения. В отсутствие этого АКАВ вызывает продол-

жительную инфекцию трофобластов плаценты, проникает через плацентарный барьер и при определенном уровне эмбрионального развития инфицирует ткани плода (30–70 дней беременности у овец, 80–150 – у коров). Вирус поражает активно делящиеся клетки формирующихся головного, спинного мозга, мышц и за счет невоспалительного некроза интерферирует с органогенезом. Такой процесс, стереотипный для ортобуньявирусной патологии, сопровождается мальформацией – развитием артрогрипоза/гидранэнцефалии, кифоза, сколиоза позвоночного столба, микро- и порэнцефалии, а также мертворождаемостью, абортами [8–10].

Вирус болезни Айно (АИВ)

АИВ – тератогенный ортобуньявирус, серологически регистрируемый в Западно-Тихоокеанском регионе от Японии до Австралии у крупного рогатого скота (КРС), буйволов, овец и коз, верблюдов, оленей, а также у человека. Впервые изолирован в 1968 г. в Австралии из пула мокрецов *C. brevitarsis*. Принципиально сходен с АКАВ в отношении трансмиссии *Culicoides* местных видов, клинических признаков болезни и патогенеза с аналогичным поражением плодов КРС и овец. После первичной бессимптомной инфекции инкубационный период развития тератогенных эффектов у коров составлял около 5 мес. Клинические формы болезни Айно зарегистрированы только в Австралии и Японии. Эпизоотическое проявление значительно меньше, чем болезни Акабанае [11].

Вирус долины Кэш (ССВ)

ССВ – один из североамериканских ортобуньявирусов группы Буньямвера, патогенный для овец. Изолирован из пула комаров в 1956 г. на западе США. Первая эпизоотия возникла в 1987 г. в Техасе среди овец с признаками неонатальной гибели, мальформации ягнят и спонтанными абортами. Вирус также выделен от лошадей и клинически здоровых коров (в последнем случае с серопревалентностью до 30%).

Последующий серологический надзор показал широкое распространение ССВ среди домашних, диких жвачных животных и лошадей без клинической манифестации, зарегистрированы случаи инфицирования людей. Была очевидной его трансмиссивность в естественных условиях, когда переносчиками явились мокрецы *Culicoides* spp. и комары *Aedes*, *Anopheles*, *Coquillettidia* и *Culiseta*. Выявлена особая роль оленей как наиболее активных амплификаторов инфекции с высокой серопревалентностью и острой вирусемией, обеспечивающими эффективную векторную способность переносчиков.

У взрослых овец инфекция протекала субклинически с краткосрочной лихорадочной реакцией без определяемой вирусемии. У беременных животных заражение сопровождалось различными тератогенными эффектами в зависимости от возраста плода. Мальформация на 30 – 35-й день беременности заключалась в дефектах мышечно-скелетной, центральной нервной систем и наибольшей эмбриональной смертностью, далее (40-й день) только в мышечно-скелетной деформации, после 50 дней поражения уже не наблюдались, после 75 дней плоды были иммунокомпетентны и защищены образующимися антителами. Тем не менее ССВ, как и большин-

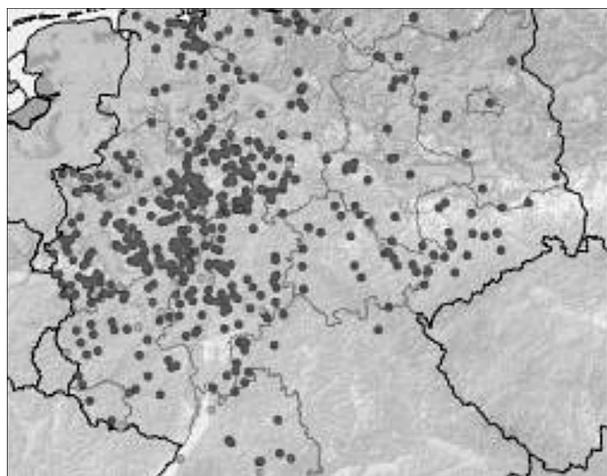


Рис. 1. Распространение болезни Шмалленберг на северо-западе Германии в начале 2012 г. (по WAHID Interface; EFSA, 2012).

ство ортобуньявирусов, обладал фетотропизмом на любом этапе беременности.

Характерные патологические изменения плодов при этом включали артрогрипоз, тортиколлис, сколиоз, мышечную гипоплазию, со стороны ЦНС – гидран-, гидро-, пор-, микроэнцефалию, гипоплазию мозга, микромиелию. Зафиксированы смерть эмбрионов, мертворождаемость или мумификация без признаков мальформации [8].

Вирус болезни Шмалленберг (SCHMV)

SCHMV – возбудитель эмерджентной эпизоотии новой, неизвестной ранее инфекционной болезни КРС, овец и коз на северо-западе Европы, которая сопровождалась врожденными пороками развития плодов и мертворождаемостью. Изолирован от клинически больных животных в 2011 г. Инфекция получила топонимическое название по месту первичной регистрации. В первом квартале 2012 г. заболеваемость регистрирова-

лась уже на большой территории 8 западноевропейских стран (рис. 1) [3].

С помощью метагеномного анализа установлено, что возбудителем болезни Шмалленберг является эмерджентный и новый для науки патогенный вирус. SCHMV отнесен к роду ортобуньявирусов; это реассортант, геном которого представлен S- и L-сегментами вируса Шамонда и М – вируса Сагупери серогруппы Симбу [12].

Возникновение и распространение болезни Шмалленберг эпизоотологически абсолютно совпали с признаками экспансии северо-запада Европы вирусом блютанга 8-го серотипа (нозогеография, восприимчивые животные, вектор, сезонность) пятью годами раньше. Практически несомненна трансмиссия новой инфекции с участием аналогичного вектора – мокрецов рода *Culicoides*. С учетом установленных сроков, динамики развития конгенитальной инфекции и тератогенеза по аналогии с блютангом у овец, болезнью Акабане у крупного и мелкого рогатого скота первичное заражение животных также могло быть отнесено на конец лета и осень 2011 г. В этот период наивысшей активности мокрецов там же отмечено массовое острое переболевание дойных коров с угнетением, отказом от корма, повышенной температурой (более 40° С), снижением продуктивности, иногда диареей, без вовлечения овец, завершившееся в октябре. В пораженных стадах заболеваемость составила 20–70% в течение нескольких недель. К ноябрю проявилась полная клиническая картина патологии воспроизводства преимущественно среди овец – спонтанные аборт, преждевременные роды, рождение мертвого и нежизнеспособного потомства, тератогенные эффекты мальформации (трясущая шея, аномальная кривизна спины, контрактура конечностей – артрогрипоз, гидроцефалия, гипоплазия головного мозга, тортиколлис, деформация челюстей, атаксия, асциты грудной и брюшной полостей, параличи, слепота, отеки подкожной клетчатки). В различных случаях количество врожденных уродств варьировало от 20 до 50% (рис. 2) [9, 13].

Таким образом, вероятный инфекционный цикл был аналогичен таковому при других подобных заболеваниях с тератогенным компонентом и включал первич-



Рис. 2. Врожденные уродства при болезни Шмалленберг (по WAHID Interface; EFSA, 2012).

ное заражение интактных беременных животных, их первичное острое переболевание, затем в виде отложенного эффекта поражение потомства. Соактанты-хозяева в паразитарной системе нового заболевания не выяснены.

В дальнейшем SCHMV оказался широко распространенным во многих странах Европы во все стороны от зоны первичного неблагополучия. Серопозитивность выявлена у КРС, овец, коз, диких жвачных, инфекция идентифицирована у потомства собак с неврологическими расстройствами. Преобладающая серопозитивность отмечена у КРС повсеместно (в частности, более 70% в Нидерландах, 90% в Бельгии). Из этого следует, что КРС в числе прочих наиболее восприимчив, именно эти животные в эпизоотическом процессе имеют статистическое преимущество и являются первыми “претендентами” на роль основного хозяина в паразитарной эпистематической болезни Шмалленберг [9].

Однако впоследствии в 2013 г. SCHMV обнаружен на западе и юго-востоке Турции при репрезентативном анализе сывороток буйволов, мелких жвачных, КРС с тем же преобладанием последнего, подтверждающим гипотезу о его паразитохозяйинной роли (25–40% по сравнению с серопозитивностью животных остальных видов на уровне 1,5–2,8%). В этих исследованиях при отсутствии клинических проявлений показана позитивность сывороток КРС, полученных в Турции в 2006 г., что ретроспективно указывает на существование болезни Шмалленберг по крайней мере за 5 лет до ее появления в Европе в 2011 г. [14].

Вирус лихорадки Оропуш (OROV)

Лихорадка Оропуш – одна из наиболее важных тропических арбовирусных инфекций в Южной Америке. OROV изолирован в 1955 г. при возникновении лихорадочного заболевания, сходного с лихорадкой денге, среди лесорубов в Тринидаде (Вега де Оропуш). За обозримый период зарегистрировано более 30 эпидемий с многими тысячами клинических случаев в Амазонии (только в Бразилии до полумиллиона, по данным серологического надзора), в Карибском бассейне, Панаме и других странах региона. Общие симптомы болезни включали лихорадку, озноб, головную боль, артралгию, миалгию, анорексию, рвоту, фотофобию, головокружение, менингит. В полевых условиях вирус выделен от обезьян и ленивцев, комаров *Culex quinquefasciatus* и мокрецов *Culicoides paraensis*. Последние проявляют высокую векторную способность заражения людей (более 80%) и являются основным переносчиком OROV [15].

В 1995 г. в Перу (Икитос) во время эпидемической вспышки лихорадочного заболевания среди людей, клинически сходного с лихорадкой Оропуш, от больных был получен иммунологически отличающийся изолят OROV-подобного вируса. В 1999 г. этот вирус, получивший топонимическое название, обозначен как новый эмерджентный ортобуниявирус серогруппы Симбу. Впоследствии в 2005 и 2006 гг. вирус выделен там же во время вспышек заболевания, принятого за “лихорадку Оропуш”. Вирус оказался реассортантом: его геном состоял из S- и L-сегментов OROV и M-сегмента неизвестного вируса серогруппы Симбу. По данным серомониторинга, новый вирус циркулировал одновременно с OROV с близкой серопревалентностью (14,9 и 15,4% соответственно) [16].

Реассортация

Способность к реассортации сегментов генома, очевидная для ортобуниявирусов особенно серогруппы Симбу, реализуется как механизм естественного возникновения новых, близкородственных в пределах серогрупп штаммов, изолятов и их прогрессивного разнообразия. Несмотря на недостаточность генетических данных, известные примеры свидетельствуют о генетическом обмене в условиях естественной циркуляции вирусов с формированием эмерджентных вспышек, эпизоотий и эпидемий (см. табл. 2).

Помимо описанных выше вирусов SCHMV и OROV-подобного, реассортантное происхождение имел вирус Нгари, ассоциировавшийся с недавними вспышками геморрагической лихорадки в Кении и Сомали: его комбинированный геном представлен S- и L-сегментами РНК вируса Буньямвера и M-сегментом вируса Батаи (оба принадлежат к серогруппе Буньямвера). Геном вируса Жатобал (Бразилия) – комбинация S-сегмента вируса Оропуш, M- и L-сегментов неизвестного вируса серогруппы Симбу [16, 17].

Сравнительный антигенный и генетический анализ вирусов Акабана и Тинару показал, что последний является реассортантом S- и L-сегментов РНК вируса Акабана и M-сегмента также неизвестного вируса серогруппы Симбу. Филогенетическое изучение M- и S-геномных сегментов вирусов Акабана, Айно и Питон свидетельствовало о реассортантном механизме обособления этих вирусов внутри рода [10, 17].

Реассортация ортобуниявирусов в пределах серогрупповой принадлежности теоретически безгранична. Основным условием ее реализации в природе должна быть социркуляция во времени и пространстве участников генетического обмена (микстинфекция de facto установлена в ряде исследований). География центров возникновения известных вирулентных реассортантов, проявивших нозогенность в качестве индикаторов процесса (см. табл. 2), позволяет предполагать его глобальный потенциал и распространение.

Видимо, неслучайно процесс затрагивает главным образом M-сегмент вирусного генома, кодирующий мутабельные оболочечные гликопротеины. Именно эти антигены обуславливают сегрегацию видов, штаммов, изолятов ортобуниявирусов, ответственны за иммунитет, и по этим компонентам идет их направленный естественный отбор и изменчивость в эпизоотиях под давлением такого селекционирующего фактора, как популяционный иммунитет, что в принципе аналогично эволюции вирусов гриппа.

В этом плане интригующий интерес представляет происхождение болезни Шмалленберг в Европе: ее этиологические прародители – вирусы Сатупери и Шамонда – циркулируют на территории Японии, Турции, Индии и Нигерии, ранее на территории Европы не регистрировались, как и все вирусы группы Симбу [15, 17].

Изложенные материалы свидетельствуют о том, что ортобуниявирусные инфекции представляют активно эволюционирующую ветвь семейства Bunyaviridae. На это указывает эпизоотическая и эпидемическая обстановка, делающая реальной угрозой экспансии опасных вирусов на эндемичные территории. Этому способствуют глобальное распространение и популяционная плотность переносчиков, в основном мокрецов рода *Culicoides*, временная и территориальная динамика их

векторной компетентности и способности (на примере блютанга в Северо-Западной Европе в 2006 – 2012 гг. [3, 9]), растущее количество ортобуньявирусов, в том числе наиболее опасной серогруппы Симбу.

Ортобуньявирусные инфекции отличает двухфазный патогенез: острое, обычно субклиническое течение с выздоровлением и приобретенным иммунитетом у всех небеременных животных, а в случае беременности по прошествии определенного инкубационного периода – последующий тератогенез как весьма тяжелое и необратимое осложнение. Трансплацентарное проникновение вирусов сопровождается поражением самых активно размножающихся клеток в зараженном организме (канон вирусного патогенеза) – формирующегося плода. Условия, благоприятствующие всплескам тератогенных инфекций, – достаточная плотность популяций восприимчивых жвачных животных в состоянии ранней беременности и векторная способность переносчиков. Роль основного хозяина при этих инфекциях, вероятнее всего, принадлежит КРС, если исходить из субклинической неконтагиозной персистенции с нанесением ему минимального вреда и преимущественной серопревалентности.

Большинство ортобуньявирусов патогенны в естественных условиях для рогатого скота и представляют опасность для человека. Различные ортобуньявирусы серогруппы Симбу обнаруживаются у многих домашних и диких жвачных животных, свиней, однокопытных, ассоциируются со случаями абортос, мертворождаемости, врожденной мальформации плодов жвачных (синдром артрогриппоза – гидранэнцефалии (АГ/ГЭ-синдром)).

До последнего времени наиболее серьезным (и наиболее описанным) в этом отношении был вирус болезни Акабана. Болезнь Шмалленберг – первый прецедент возникновения и широкого эпизоотического распространения нового представителя этой группы вирусов в пределах умеренного климатического пояса.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2, 4, 5, 7–17
см. REFERENCES)

1. Львов Д.К., ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013.
3. Макаров В.В. Трансмиссивные экзотические инфекции животных на эндемичных территориях. *Пест-менеджмент*. 2012; 2: 17–30.
6. Альховский С.В., Щетинин А.М., Львов Д.К., Щелканов И.Ю., Дрябин П.Г., Львов Д.Н. и др. Вирус Хурдун (KHURV): новый

вирус рода Orthobunyavirus (Bunyaviridae). *Вопросы вирусологии*. 2013; 4: 10–3.

REFERENCES

1. L'vov D.K., ed. *Guide Virology. Viruses and Viral Infections of Humans and Animals [Rukovodstvo po virusologii. Virusy i virusnye infektsii cheloveka i zhivotnykh]*. Moscow: MIA; 2013. (in Russian)
2. Lvov D.K., Shchelkanov M.Yu., Alkhovsky S.V., Derabin P.G. *Zoonotic Viruses of Northern Eurasia. Taxonomy and Ecology*. Elsevier Ac. Press.; 2015.
3. Makarov V.V. Transmissible exotic animal infections in endemic areas. *Pest-menedzhment*. 2012; 2: 17–30. (in Russian)
4. Plyusnin A., Beaty B., Elliott R. et al. Bunyaviridae. In: *Virus taxonomy: ninth report of the ICTV*. Elsevier AP, London; 2012: 725–41.
5. Shchetinin A.M., Lvov D.K., Derabin P.G., Botikov A.G., Gitelman A.K., Kuhn J.H. et al. Genetic and phylogenetic characterization of Tatuquine and Witwatersland viruses and other orthobunyaviruses of the Anopheles A, Capim, Guama, Koongol, Tete, Turlock serogroups. *Viruses*. 7: 5987–6008.
6. Al'khovskiy S.V., Shchetinin A.M., L'vov D.K., Shchelkanov I.Yu., Deryabin P.G., L'vov D.N. et al. Virus Hurdun (KHURV): a new virus genus Orthobunyavirus (Bunyaviridae). *Voprosy virusologii*. 2013; 4: 10–3. (in Russian)
7. Marklewitz M., Zirkel F., Kurth A., Drosfeh C., Junghe S. Evolutionary and phenotypic analysis of live virus isolates suggested arthropod origin of a pathogenic RNA virus family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 112 (24): 7536–41.
8. Bunyaviral diseases of animal. In: *OIE Terrestrial Manual*. 2008: 1165–76.
9. EFSA. “Schmallenberg” virus: Analysis of the epidemiological data and impact assessment. *EFSA J*. 2012, 10 (6): 2768.
10. Kobayashi T., Yanase T., Yamakawa M., Kato T., Yoshida K., Tsuda T. Genetic diversity and reassortments among Akabane virus field isolates. *Virus Res*. 2007; 130: 162–71.
11. Aino Disease. Animal Disease Factsheets. The Center for FSPH, ISU, USA; 2006.
12. Yanase T., Kato T., Aizawa M., Shuto Y., Shirafuji H., Yamakawa M. et al. Genetic reassortment between Sathuperi and Shamonda virus of the genus Orthobunyavirus in nature: implications for their genetic relationship to Schmallenberg virus. *Arch. Virol*. 2012; 157 (8): 1611–6.
13. Varela M., Schnettler E., Caporale M., Murgia C., Barry G., McFarlane M. et al. Schmallenberg Virus Pathogenesis, Tropism and Interaction with the Innate Immune System of the Host. *PLoS Pathog*. 2013; 9 (1): e1003133.
14. Azkur A., Albayrak H., Risvanli A., Pestil Z., Ozan E., Yilmaz O. et al. Antibodies to Schmallenberg virus in domestic livestock in Turkey. *Trop. Anim. Health Prod*. 2013; 45 (8): 1825–8.
15. Vasconcelos H., Nunes M., Casseb L., Carvalho V.L., Pinto da Silva E.V., Silva M. et al. Molecular epidemiology of Oropouche virus, Brazil. *Emerg. Infect. Dis*. 2011; 17 (5): 800–6.
16. Aguilar P.V., Barrett A.D., Saeed M.F. Watts D.M., Russell K., Guevara C. et al. Iquitos Virus: A Novel Reassortant Orthobunyavirus Associated with Human Illness in Peru. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2011; 5 (9): e1315.
17. Briese T., Calisher C.H., Higgs S. Viruses of the family Bunyaviridae: are all available isolates reassortants? *Virology*. 2013; 446 (1–2): 207–16.

Поступила 01.10.15

Принята в печать 19.11.15

Глотов А.Г.¹, Глотова Т.И.¹, Шуляк А.Ф.²

ПЕСТИВИРУСЫ ЖВАЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

¹ФГБНУ «Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока», 630501, г. Краснообск, Новосибирская область;
²ФГБНУ «Всероссийский НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко», 109428, г. Москва

Род *Pestivirus* объединяет 4 вида: вирус диареи – болезни слизистых оболочек 1-го типа (ВД – БС 1), ВД – БС 2-го типа крупного рогатого скота (КРС), чумы свиней и пограничной болезни овец. Пестивирусы инфицируют значительное количество видов как домашних, так и диких животных. Прототипным представителем пестивирусов жвачных животных является вирус ВД – БС КРС. В последнее время появились новые кандидаты для включения в этот род: от диких жвачных животных выделены 2 официально еще не классифицированных вируса, а также HoBi-подобный вирус, впервые обнаруженный в фетальной сыворотке КРС. Циркуляция пестивирусов среди домашних и диких животных, их присутствие в биологических продуктах актуализирует изучение резервуаров инфекции и их влияния на эффективность противозоо-зоотических мероприятий.

Ключевые слова: пестивирусы; вирусная диарея-болезнь слизистых оболочек; генетическое разнообразие; вирус жирафа; вирус вилорога; HoBi-подобные вирусы; программы контроля.

Для цитирования: Глотов А.Г., Глотова Т.И., Шуляк А.Ф. Пестивирусы жвачных животных. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (2): 59-62.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2- 59-62

Glotov A.G.¹, Glotova T.I.¹, Shulyak A.F.² PESTIVIRUSES IN RUMINANTS

¹Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501, Russian Federation; ²Kovalenko All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary, Moscow, 109428, Russian Federation

The genus *Pestivirus* includes four species: bovine viral diarrhea virus 1, bovine viral diarrhea virus 2, classical swine fever disease virus, and ovine border disease virus. Pestiviruses infect many species of domestic and wild animals. Bovine viral diarrhea virus is a prototypical representative of the pestiviruses of ruminant animals. Recently, new candidates appeared for including in this genus: two viruses of the wild ruminant animals that have not been officially classified and one HoBi-like virus discovered for the first time in the bovine fetal serum. The circulation of the ruminant animal pestiviruses within population of domestic and wild animals, the presence of these viruses in bioproducts stimulates studies of the infection reservoirs and their influence on the effect of the bovine viral diarrhea control programs.

Key words: pestiviruses; BVDV; genetic diversity; giraffe virus; pronghorn virus; HoBi-like viruses; control programs.

For citation: Glotov A.G., Glotova T.I., Shulyak A.F. Pestiviruses in ruminants. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(2): 59-62. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2-59-62

For correspondence: Alexandr G. Glotov, Doctor of Veterinary, Professor, Head of Department, Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501, Russian Federation, E-mail: glotov_vet@mail.ru

Information about authors:

Glotov A.G., [http:// orcid.org/0000-0002-2006-0196](http://orcid.org/0000-0002-2006-0196)

Glotova T.I., [http:// orcid.org/0000-0003-3538-8749](http://orcid.org/0000-0003-3538-8749)

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received 25 September 2014

Accepted 22 January 2015

Пестивирусы относятся к семейству Flaviviridae. Ранее род пестивирусов объединял 3 вируса: вирусной диареи (ВД) – болезни слизистых оболочек (БС) крупного рогатого скота (КРС), чумы свиней и пограничной болезни овец [<http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>].

Классификация изменилась после открытия в США нецитопатогенных (НЦП) штаммов вируса ВД 2-го типа, вызывающих у КРС геморрагический синдром, тромбоцитопению с высокой заболеваемостью и летальностью. Этот вирус стал четвертым представителем рода *Pestivirus*.

В последнее время было обнаружено несколько новых видов: вирус жирафа H138, выделенный от жирафа в Кении; вирус вилорога (Pronghorn virus), выделенный от слепой вилорогой антилопы в США; вирус Bungowanah, выделенный в Австралии от свиней при вспышке мертворождаемости, и HoBi-подобный вирус, первоначально выделенный из фетальной сыворотки КРС [1–7].

Вирус ВД КРС. ВД КРС распространена во всем мире. Инфицированность КРС составляет 60–85% и зави-

Для корреспонденции: Глотов Александр Гаврилович, д-р вет. наук, профессор, заведующий отделом ФГБНУ «Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока», 630501, г. Краснообск, Новосибирская область, E-mail: glotov_vet@mail.ru

сит от региональных особенностей [8–10]. Присутствие персистентно инфицированных (ПИ) животных в стаде повышает этот показатель до 90% и более [8, 11]. Вирус вызывает иммуносупрессию, диарею, БС и другую патологию, но наиболее значимыми последствиями этой инфекции являются репродуктивные проблемы и болезни респираторного тракта. К инфицированию в большей степени чувствительны серонегативные телки случайного возраста и телята до 6 мес [9, 12]. Экономический ущерб оценивается в 88 дол. на 1 животное [10].

Геном вируса представлен однонитевой положительно заряженной РНК размером 12,3 тыс. нуклеотидов. Он имеет 1 открытую рамку считывания длиной около 4000 кодонов, кодирующую 12 структурных и неструктурных белков (Npro-C-Erns-E1-E2-p7-NS2/NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B), фланкированную с 5'- и 3'-концов нетранслируемыми областями (5' UTR и 3' UTR).

Вирус подвержен мутациям, вызванным ошибками РНК-зависимой РНК-полимеразы и рекомбинациями [13]. Из-за частых мутаций при репликации РНК вирус существует в виде различающихся, но близкородственных мутантов (квазитипов), подвергающихся непрерывному отбору. В связи с этим патогенность штаммов заметно варьирует [14–15].

Для видовой дифференциации вируса самым надежным критерием является нуклеотидный сиквенс геномной РНК. Чаще всего исследуют 5'-нетранслируемый регион (5'-UTR), являющийся высококонсервативной областью, подходящей для амплификации. В то же время межвидовые различия не ограничиваются только одним участком генома. Для филогенетического анализа дополнительно исследуют участок гена E2 (наиболее вариабельный участок) и участки генов E^{ns} и N^{pro}. Необходимость исследования нескольких фрагментов связана с рекомбинациями. В геноме штамма одного генотипа могут встречаться фрагменты генов вируса других субтипов, а также фрагменты клеток организма животного, в котором он реплицировался [13–16].

Заболевание у КРС вызывают 2 вируса – ВД КРС 1 и ВД КРС 2. В настоящее время выделяют как минимум 16 субтипов вируса ВД КРС 1 (от 1a до 1o) и по меньшей мере 5 субтипов ВД КРС 2 (от 2a до 2e) [13, 15, 16]. Штаммы вируса ВД КРС 2 встречаются реже, чем штаммы вируса ВД КРС 1, но обладают более высокой вирулентностью [14, 16, 17]. Оба вируса представлены цитопатогенным (ЦП) и НЦП биотипами, из которых преобладающим является НЦП [14].

Для понимания особенностей ВД важно различать две категории инфицированных животных: ПИ и транзитно инфицированных (ТИ).

Персистентная инфекция развивается только в случае заражения плода НЦП биотипом вируса в период с 45-го по 125-й день внутриутробного развития, когда его иммунная система еще не сформирована. Родившиеся ПИ телята являются постоянным источником возбудителя для неиммунных животных. Концентрация вируса в крови таких особей высокая, и они выделяют его в течение всей жизни с секретами и экскретами, включая сперму. Образование специфических антител при этом практически не происходит [11, 12].

ВД КРС у диких жвачных животных. Традиционно изоляты пестивирусов обозначали согласно названию вида животного, от которого они были выделены, и большинство штаммов вируса ВД, классической чумы свиней и пограничной болезни овец были изолированы от КРС, сви-

ней и овец соответственно. В настоящее время серологическое подтверждение инфекции, вызванной вирусом ВД, получено в отношении более 50 видов, 7 из 10 семейств млекопитающих отряда Artiodactyla [3, 6, 7, 18–25].

Восприимчивыми к заражению вирусом ВД являются КРС, свиньи, овцы, козы, бизоны, яки [26], домашние и дикие олени, ламы Старого и Нового Света, включая альпак. В России антитела к вирусу ВД выявлены у северных оленей Ямала, Таймыра и Якутии [18, 19, 22], маралов Горно-Алтайской Республики [19], коз, лосей, изюбрей, косуль и дзеренов [20], а также верблюдов [21], выпасавшихся совместно с КРС. Предполагается существование межвидовой передачи вируса от жвачных мозолоногим животным.

В связи с изложенным было предложено разделить штаммы на 3 группы в соответствии с основными хозяевами: домашними жвачными, верблюдовыми и оленями, однако о передаче вируса между этими кластерами в настоящее время неизвестно.

В эпизоотологическом плане важным вопросом является идентификация не относящиеся к семейству *Bovidae* ПИ хозяина, который может служить резервуаром вируса в дикой природе. К настоящему времени персистентная форма инфекции зарегистрирована у овец, оленей и коз [3, 6–7, 23, 25].

Симптомы ВД у белохвостых оленей включают расщипывание или мумификацию плода, аборт, рождение мертвых телят. Острая форма болезни сопровождается выделением вируса с назальными секретами и фекалиями. Однако до сих пор не обнаружено передачи вируса от оленей КРС, и наоборот [7, 25].

Серологическое и вирусологическое подтверждение инфекции у диких животных позволяет предположить, что вирус переживает в популяции свободно живущих животных, которые могут передавать его КРС и овцам. Если такой феномен существует в природе, он ставит под угрозу эффективность реализации программ ликвидации болезни в странах Европы и США. Однако до сих пор не получено доказательств подобной передачи.

Антропозоонозный потенциал вируса ВД. Характерная для вируса ВД «пластичность» дает основание предположить, что он способен преодолевать межвидовые барьеры. Вирус ВД не относится к патогенам человека. В то же время он реплицируется в культурах клеток человеческого происхождения, обладает сходными с вирусом гепатита С человека свойствами. Вирус выделен от двух клинически здоровых людей, от пациентов с болезнью Крона, из фекалий детей до 2 лет с признаками гастроэнтерита. Эти факты создают некоторые предпосылки для изучения его антропозоонозного потенциала [7].

Вирус жирафа. Цитопатогенный штамм Giraffe, или H138, является единственным представителем пестивирусов этого вида животных. Он был выделен от жирафа, павшего с признаками болезни слизистых оболочек в 1967 г. в Наньюки, Кения. Вирус репродуцировался в первично-трипсинизированных культурах клеток тестикулов бычков, почек телят и нейтрализовался антисывороткой к штамму Oregon вируса ВД 1. Филогенетический анализ, основанный на генах E2 и N^{pro}, показал его отличие от других пестивирусов. При секвенировании по 5'-UTR в сравнительном аспекте с другими пестивирусами КРС, овец, коз и свиней установили его принадлежность к новому таксону. Значение этого вируса для программ контроля ВД пока неизвестно.

Вирус вилорога. В 2005 г. в США из тканей века слепой вилорогой антилопы выделен вирус, проявляющий антигенное родство с другими пестивирусами [1]. Он нейтрализовался моноклональными антителами к штаммам вирусов ВД 1, ВД 2 и пограничной болезни 1, но слабо размножался в культурах клеток овец и КРС.

Организация генома соответствовала представителям рода, однако синквенс генов N^{pro} , E^{ns} и 5'-UTR значительно отличался от всех идентифицированных к настоящему времени пестивирусов. На основании этого предположили, что данный вирус представляет новый вид рода *Pestivirus*. Вирус представлен одним штаммом и является единственным пестивирусом, выделенным в дикой природе Америки.

Перечисленные «новые» пестивирусы были выделены от ограниченного числа диких животных в отдельных регионах и имеют скорее научный интерес [8].

НоВи-подобные вирусы (атипичные пестивирусы). Первый изолят вируса НоВи (D32/00_НоВи) был выделен в Швейцарии из фетальной сыворотки КРС, импортированной из Бразилии. После этого было получено еще несколько изолятов: 2 из фетальной сыворотки из Южной Америки, 1 (CH-Kaho/cont) из культуры клеток, 1 (Brz buf) от буйвола и 2 от абортированных плодов в Бразилии, 1 (Th/04_Khonkaen) из сыворотки крови телят в Таиланде. В Италии вирус выделили от телят во время вспышки респираторной болезни в 2010 г. На основе синквенса 5'-нетранслируемого региона изоляты были разделены на 2 подгруппы: бразильскую и тайландскую.

Предположительно НоВи-подобные вирусы классифицируются как вирус ВД 3 КРС или как пятый вид рода *Pestivirus* [5]. Они представлены двумя биотипами.

Спонтанная и экспериментальная инфекция КРС имеет большое сходство с ВД и проявляется в виде диареи, абортов и респираторного синдрома [2].

Более 30% партий фетальной сыворотки КРС, поставляемых в Европу из Южной Америки, контаминированы вирусом НоВи. Он был также обнаружен в фетальной сыворотке из Австралии, Канады, Мексики и США. Повышение спроса на фетальную сыворотку КРС способствует проникновению вируса в различные регионы.

В естественных условиях инфекция диагностирована в Южной Америке, Юго-Восточной Азии и Италии. Сообщения о выделении вируса этой группы в других странах Европы, Северной Америки, России, Индии и Австралии отсутствуют.

Происхождение НоВи-подобных вирусов неизвестно. Одна из гипотез предполагает, что вирусы появились в Южной Америке и были завезены в другие страны и континенты с биологическими продуктами, такими как фетальная сыворотка и вакцины. Другая гипотеза объясняет возникновение НоВи-подобных вирусов в результате многократных межвидовых передач от буйволов к КРС, что подтверждается циркуляцией вируса в регионах со значительным поголовьем буйволов, таких как Бразилия и Таиланд. Существует также гипотеза, что возникновение этих вирусов в Южной Америке и последующее их распространение в другие регионы представляют собой сравнительно недавние с точки зрения эволюции события.

Открытие этой группы вирусов требует критической оценки имеющихся диагностических средств и вакцин. Коммерческие наборы для иммуноферментного анализа (ИФА) для диагностики ВД – БС КРС не полностью

выявляют антитела к НоВи-подобным вирусам. Анализ 5'-нетранслируемого региона подтвердил отличие выделенных штаммов от вирусов ВД 1-го и 2-го типов. В связи с этим для контроля НоВи-вирусных инфекций необходима разработка новых специфических диагностических тестов и вакцин.

При сравнительном изучении штаммов вирусов ВД 1, ВД 2 и НоВи при помощи коммерческого набора для ИФА и перекрестной реакции нейтрализации с иммунными сыворотками установили более высокую степень перекрестных реакций между эпитопами протеинов E_{ns} и NS2/3 в сравнении с гликопротеином E2. Эти результаты дают основание полагать, что диагностические тесты для выявления всех трех вирусов следует разрабатывать на основе эпитопов E_{ns} и NS2/3, а вариабельность E2 использовать для их дифференциации.

Таким образом, поскольку диагностика НоВи-вирусной инфекции в большинстве стран не проводится, а доступные диагностические тесты недостаточно специфичны, эти вирусы могут оставаться незамеченными и предположительно существовать и в других странах. Ситуация усугубляется тем, что они, подобно возбудителю ВД, способны индуцировать персистентную инфекцию и формирование стационарно неблагополучных очагов.

В стадах Бразилии, Италии и Таиланда, где эти вирусы, возможно, уже распространены, они могут быть причиной экономических потерь, связанных с клиническим проявлением инфекции, снижением продуктивности и, возможно, иммунитета независимо от циркуляции вируса ВД. НоВи-положительный статус стран также может стать проблемой в международной торговле животными и продуктами их происхождения со странами, которые считают себя свободными от НоВи-подобных вирусов.

НоВи-вирусы были изолированы на нескольких континентах от многих видов животных и имеют тенденцию к глобальному распространению.

Меры профилактики и борьбы. Программы контроля или ликвидации ВД КРС, реализующиеся в ряде стран, основаны на трех принципах: выявлении и удалении ПИ животных из стада; предупреждении ввода инфицированных животных в стадо и мониторинг; вакцинации, применение которой зависит от степени распространения болезни в конкретном регионе [9, 12, 14, 27]. Для успешной реализации таких программ и поддержания свободного от ВД статуса стада необходимо использование надежных диагностических тестов, способных дифференцировать ПИ и ТИ животных и выявлять весь спектр квазитипов вируса. Открытым остается вопрос о роли диких животных в эпизоотическом процессе и целесообразности вакцинации диких животных. Возможно, в будущем такие программы начнут разрабатываться для стад одомашненных животных, как это практикуется для альпак в США [5].

Выделение вируса является наиболее точным диагностическим методом, но более чувствительны ИФА и ПЦР; сочетание этих методов дает наибольший эффект при ВД. Для выявления антител обычно используют реакцию нейтрализации и ИФА.

Факт существования НоВи-подобных вирусов требует особого внимания. Если учесть, что они были выделены из коммерческих пулов сыворотки крови, используемой для культур клеток и производства биопрепаратов, становится очевидным, что вирусы этой группы представляют опасность из-за возможного распространения в новых регионах, снижения эффективности вакцин и

диагностикумов и как следствие программ ликвидации ВД. Угрозу могут представлять и животные, предназначенные для продажи.

Таким образом, эти новые, до конца не охарактеризованные пестивирuses могут отрицательно влиять на эффективность программ контроля и эрадикации ВД КРС и представлять опасность как эмергентные возбудители для КРС во всем мире. Присутствие НоВи-подобных и других пестивирuses у жвачных животных в продуктах животного происхождения и биологических препаратах необходимо учитывать и контролировать.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1–8, 10, 12–16, 23–27
см. REFERENCES)

9. Гулюкин М.И., Юров К.П., Глотов А.Г., Донченко Н.А. Стратегия борьбы с вирусной диареей – болезнью слизистых крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах российской федерации. *Вопросы вирусологии*. 2013; 6: 13–8.
11. Нefeldchenko A.B., Глотов А.Г., Глотова Т.И., Кунгурцева О.В. Выявление животных, персистентно инфицированных вирусом ВД-БС крупного рогатого скота, методом ПЦР. *Ветеринария*. 2011; 12: 21–5.
17. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Южаков А.Г., Забережный А.Д., Алипер Т.И. Выделение на территории Российской Федерации нецитопатогенного изолята 2-го генотипа вируса диареи – болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота. *Вопросы вирусологии*. 2009; 6: 43–7.
18. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Нefeldchenko A.B., Лайшев К.А. К вопросу о вирусных инфекциях у одомашненных северных оленей на Таймыре. В кн.: *Актуальные проблемы природопользования на Крайнем Севере: Сборник научных трудов*. Новосибирск; 2004: 83–4.
19. Кунгурцева О.В., Глотова Т.И. Экологические аспекты распространения вируса вирусной диареи-болезни слизистых крупного рогатого скота. В кн.: *Инновационные подходы в ветеринарии, биологии и экологии: Сборник научных трудов*. Троицк; 2010: 151–4.
20. Мищенко В.А., Черных О.Ю., Мищенко А.В., Якубенко Е.В., Думова В.В. Превалентность антител к вирусу вирусной диареи крупного рогатого скота в сыворотке крови жвачных животных. *Ветеринария Кубани*. 2012; 5: 19–20.
21. Мищенко А.В., Мищенко В.А., Думова В.В., Жбанова Т.В. Проблема вирусных инфекций у верблюдов. *Труды Кубанского государственного аграрного университета*. 2013; 1 (43): 255–7.
22. Шуляк А.Ф., Юров К.П., Неустров М.П., Касьянов И.А. Антитела к вирусам инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи-болезни слизистых оболочек у северных оленей. В кн.: *Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных*. М.; 2006: 423.

REFERENCES

1. Vilcek S., Ridpath J.F., Van Campen H., Cavender J.L., Warg J. Characterization of a novel pestivirus originating from a pronghorn antelope. *Virus Res*. 2005; 108 (1–2): 187–93.
2. Bauermann F.V., Ridpath J.F., Weiblen R., Flores E.F. HoBi-like viruses: an emerging group of pestiviruses. *J. Vet. Diagn. Invest*. 2013; 25 (1): 6–15.
3. Passler T., Riddell K.P., Edmondson M.A., Chamorro M.F., Neill J.D., Brodersen B.W. et al. Experimental infection of pregnant goats with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1 or 2. *Vet. Res*. 2014; 45: 38.
4. Kirkland P.D., Frost M.J., Finlaison D.S., King K.R., Ridpath J.F., Gu X. Identification of a novel virus in pigs—Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. *Virus Res*. 2007; 129: 26–34.
5. Toppliff C.L., Smith D.R., Clowser S.L., Steffen D.J., Henningson J.N., Brodersen B.W. et al. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus infections in alpacas in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc*. 2009; 234 (4): 519–29.
6. Vilcek S., Nettleton P.F. Pestiviruses in wild animals. *Vet. Microbiol*. 2006; 116 (1–3): 1–12.
7. Walz P.H., Grooms D.L., Passler T., Ridpath J.F., Tremblay R., Step

- D.L. et al. Control of bovine viral diarrhoea virus in ruminants. *J. Vet. Intern. Med*. 2010; 24 (3): 476–86.
8. König M., Cedillo Rosales S., Becher P., Thiel H.J. Heterogeneity of ruminant pestiviruses: academic interest or important basis for the development of vaccines and diagnostics? *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr*. 2003; 116 (5–6): 216–21.
9. Gulyukin M.I., Yurov K.P., Glotov A.G., Donchenko N.A. Bovine viral diarrhoea control in Russian Federation. *Voprosy virusologii*. 2013; 6: 13–8. (in Russian)
10. Ridpath J.F., Bendfeldt S., Neill J.D., Liebler-Tenorio E. Lymphocytopenic activity in vitro correlates with high virulence in vivo for BVDV type 2 strains: Criteria for a third biotype of BVDV. *Virus Res*. 2006; 118 (1–2): 62–9.
11. Nefeldchenko A.V., Glotov A.G., Glotova T.I., Kungurtseva O.V. Detection of animals persistently infected with BVDV by PCR. *Veterinariya*. 2011; 12: 21–5. (in Russian)
12. Lindberg A.L. Bovine viral diarrhoea virus infections and its control. A review. *Vet. Q*. 2003; 25 (1): 1–16.
13. Giangaspero M., Harasawa R. Characterization of genotypes among bovine viral diarrhoea virus type 1 strains according to palindromic nucleotide substitutions in the genomic 51–untranslated region. *J. Virol. Methods*. 2014; 195: 34–53.
14. Ridpath J.F. Bovine viral diarrhoea virus: global status. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract*. 2010; 26 (1): 105–21.
15. Vilček Š., Đurković B., Kolesárová M., Greiser-Wilke I., Paton D. Genetic diversity of international bovine viral diarrhoea virus (BVDV) isolates: Identification of a new BVDV-1 genetic group. *Vet. Res*. 2004; 35 (5): 609–15.
16. Giangaspero M., Apicellab C., Harasawa R. Numerical taxonomy of the genus Pestivirus: New software for genotyping based on the palindromic nucleotide substitutions method. *J. Virol. Methods*. 2013; 192 (1–2): 59–67.
17. Glotov A.G., Glotova T.I., Yuzhakov A.G., Zaberezhnyy A.D., Ali-per T.I. Isolation of noncytopathogenic genotype 2 bovine viral diarrhoea virus from the cattle mucosa in the Russian Federation. *Voprosy virusologii*. 2009; 6: 43–7. (in Russian)
18. Glotov A.G., Glotova T.I., Nefeldchenko A.V., Layshev K.A. To the question of viral infections in domesticated reindeer on Taimyr. In: *Actual Problems of Nature in the Far North: Collection of Scientific Works [Aktual'nye problemy prirodopol'zovaniya na Kraynem Severe: Sbornik nauchnykh trudov]*. Novosibirsk; 2004: 83–4. (in Russian)
19. Kungurtseva O.V., Glotova T.I. Environmental aspects of the distribution of the bovine diarrhoea virus. In: *Innovative Approaches in Veterinary Biology and Ecology: Collection of Scientific Works [Innovatsionnye podkhody v veterinarii, biologii i ekologii: Sbornik nauchnykh trudov]*. Troitsk; 2010: 151–4. (in Russian)
20. Mishchenko V.A., Chernykh O.Yu., Mishchenko A.V., Yakubenko E.V., Dumova V.V. The prevalence of antibodies to bovine diarrhoea virus in ruminants. *Veterinariya Kubani*. 2012; 5: 19–20. (in Russian)
21. Mishchenko A.V., Mishchenko V.A., Dumova V.V., Zhanova T.V. The problem of viral infections in camels. *Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2013; 1 (43): 255–7. (in Russian)
22. Shulyak A.F., Yurov K.P., Neustrov M.P., Kas'yanov I.A. Antibodies to infectious bovine rhinotracheitis virus and bovine viral diarrhoea-mucosal disease in Northern deers. In: *Actual Problems of Infectious Pathology and Immunology of Animals [Aktual'nye problemy infektsionnoy patologii i immunologii zhivotnykh]*. Moscow; 2006: 423. (in Russian)
23. De Mia G.M., Greiser-Wilke I., Feliziani F., Giammarioli M., De Giuseppe A. Genetic characterization of a caprine pestivirus as the first member of a putative novel pestivirus subgroup. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*. 2005; 52 (5): 206–10.
24. Evermann J.F. Pestiviral infection of llamas and alpacas. *Small Rumin. Res*. 2006; 61 (2–3): 201–6.
25. Pogranichniy R.M., Raizman E., Thacker H.L., Stevenson G.W. Prevalence and characterization of bovine viral diarrhoea virus in the white-tailed deer population in Indiana. *J. Vet. Diagn. Invest*. 2008; 20 (1): 71–4.
26. Gong X., Liu L., Zheng F., Chen Q., Li Z., Cao X., Yin H. et al. Molecular investigation of bovine viral diarrhoea virus infection in yaks (*Bos grunniens*) from Qinghai, China. *Virus Res*. 2014; 11: 29. Available at: <http://www.virologyj.com/content/11/1/29>.
27. Ridpath J.F. Preventive strategy for BVDV infection in North America. *Jpn. J. Vet. Res*. 2012; 60 Suppl: S41–9.

Поступила 25.09.14

Принята в печать 22.01.15

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 616.697-022:578.825.11+578.827.11-078

*Евдокимов В.В.^{1,4}, Науменко В.А.¹, Тюленев Ю.А.¹, Курило Л.Ф.², Ковалык В.П.³, Сорокина Т.М.²,
Лебедева А.Л.², Гомберг М.А.⁴, Куш А.А.¹*

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ДНК ВИРУСОВ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ВЫСОКОГО КАНЦЕРОГЕННОГО РИСКА И ГЕРПЕСВИРУСОВ ЧЕЛОВЕКА У МУЖЧИН ПРИ НАРУШЕНИИ ФЕРТИЛЬНОСТИ

¹ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва; ²ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, г. Москва; ³ФГБУ «Клинико-диагностический центр Федерального клинического центра высоких медицинских технологий» Федеральное медико-биологическое агентство России, 109147, г. Москва; ⁴ГБУЗ «Московский научно-практический центр дерматовенерологии и косметологии» Департамента здравоохранения г. Москвы, 127473, г. Москва

Бесплодие является актуальной медицинской и социальной проблемой, у 50% пар оно связано с мужским фактором, и в половине случаев этиология его остается неизвестной. Цель работы состояла в изучении распространения и количественном анализе герпесвирусов человека (ГВЧ) и папилломавирусов высокого канцерогенного риска (ВПЧ ВКР) у мужчин с бесплодием, а также в оценке влияния этих инфекций на показатели спермы. Исследовали образцы эякулятов 196 мужчин, разделенных на 3 группы. В 1-ю группу вошли мужчины с бесплодием неясной этиологии ($n = 112$), во 2-ю группу – пациенты, у жен которых были в анамнезе зафиксированы случаи самопроизвольного прерывания беременности ($n = 63$), в 3-ю группу (контрольную) – здоровые мужчины, обратившиеся для профилактического обследования ($n = 21$). Количественный анализ ДНК ГВЧ (цитомегаловирус, вирус Эпштейна–Барр и вирус герпеса человека 6) и ВПЧ ВКР 12 типов, относящихся к кластерам А5/6, А7 и А9, проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени, спермиологическое исследование осуществляли согласно рекомендациям ВОЗ. ДНК ГВЧ и ВПЧ ВКР в эякуляте обнаружены суммарно у 42/196 (21,4%) мужчин: у 31 и 11 пациентов в 1-й и 2-й группе соответственно ($p > 0,05$). Ни у одного из здоровых мужчин вирусная ДНК в эякуляте не была обнаружена. ГВЧ выявили у 24/42, ВПЧ ВКР – у 18/42 мужчин ($p > 0,05$) без значимых различий между группами. Среди ВПЧ ВКР в эякулятах чаще встречались генотипы кластера А9 (14/18; $p = 0,04$). Сравнительный анализ спермограмм показал, что у инфицированных пациентов были значительно снижены подвижность, а также количество морфологически нормальных сперматозоидов по сравнению со здоровыми мужчинами. При количественном определении вирусных ДНК обнаружено, что в эякулятах 31% мужчин вирусная нагрузка была $> 3 \text{ Ig}10$ на 100 тыс. клеток. Обнаружение ГВЧ и ВПЧ ВКР в эякулятах ассоциируется с мужским бесплодием, и количественное определение вирусных ДНК в эякулятах является полезным индикатором для мониторинга вирусных инфекций при бесплодии и своевременного принятия решения о начале терапии.

Ключевые слова: мужское бесплодие; эякулят; герпесвирусы; вирусы папилломы человека высокого канцерогенного риска; полимеразная цепная реакция в реальном времени; показатели спермы.

Для цитирования: Евдокимов В.В., Науменко В.А., Тюленев Ю.А., Курило Л.Ф., Ковалык В.П., Сорокина Т.М., Лебедева А.Л., Гомберг М.А., Куш А.А. Количественная оценка ДНК вирусов папилломы человека высокого канцерогенного риска и герпесвирусов человека у мужчин при нарушении фертильности. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (2): 63-68.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2- 63-68

*Evdokimov V.V.^{1,4}, Naumenko V.A.¹, Tulenev Yu.A.¹, Kurilo L.F.², Kovalyk V.P.³, Sorokina T.M.²,
Lebedeva A.L.², Gomberg M.A.⁴, Kushch A.A.¹*

QUANTITATIVE DNA EVALUATION OF THE HIGH CARCINOGENIC RISK OF HUMAN PAPILLOMA VIRUSES AND HUMAN HERPES VIRUSES IN MALES WITH FERTILITY DISORDERS

¹Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation; ²Research Centre for Medical Genetics, Moscow, 115478, Russian Federation;

³Clinical and Diagnostic Center, Federal Clinical Center of High Medical Technologies, Moscow, 109147, Russian Federation; ⁴Moscow Scientific and Practical Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Moscow, 127473, Russian Federation

Infertility is an actual medical and social problem. In 50% of couples it is associated with the male factor and in more than 50% of cases the etiology of the infertility remains insufficiently understood. The goal of this work was to study the prevalence and to perform quantitative analysis of the human herpes viruses (HHV) and high carcinogenic risk papilloma viruses (HR HPV) in males with infertility, as well as to assess the impact of these infections on sperm parameters.

Для корреспонденции: Евдокимов Владимир Вадимович, аспирант лаб. клеточной инженерии ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, E-mail: vladimir.evdokimov@gmail.com

Ejaculate samples obtained from 196 males fall into 3 groups. Group 1 included men with the infertility of unknown etiology ($n = 112$); group 2, patients who had female partners with the history of spontaneous abortion ($n = 63$); group 3 (control), healthy men ($n = 21$).

HHV and HR HPV DNA in the ejaculates were detected in a total of 42/196 (21.4%) males: in 31 and 11 patients in groups 1 and 2, respectively ($p > 0.05$) and in none of healthy males. HHV were detected in 24/42; HR HPV, in 18/42 males ($p > 0.05$) without significant difference between the groups. Among HR HPV genotypes of the clade A9 in ejaculate were more frequent (14/18, $p = 0.04$). Comparative analysis of the sperm parameters showed that in the ejaculates of the infected patients sperm motility as well as the number of morphologically normal cells were significantly reduced compared with the healthy men. The quantification of the viral DNA revealed that in 31% of the male ejaculates the viral load was high: $>3 \lg_{10}/100000$ cells.

Conclusion. The detection of HHV and HR HPV in the ejaculate is associated with male infertility. Quantification of the viral DNA in the ejaculate is a useful indicator for monitoring viral infections in infertility and for decision to start therapy.

Key words: male infertility; ejaculate; herpes viruses; high carcinogenic risk human papilloma viruses; real-time PCR; parameters of sperm.

For citation: Evdokimov V.V., Naumenko V.A., Tulenev Yu.A., Kurilo L.F., Kovalyk V.P., Sorokina T.M., Lebedeva A.L., Gomberg M.A., Kushch A.A. Quantitative DNA evaluation of the high carcinogenic risk of human papilloma viruses and human herpes viruses in males with fertility disorders. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(2):63-68. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2-63-68

For correspondence: Vladimir V. Evdokimov, Postgraduate student, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation, E-mail: vladimir.evdokimov@gmail.com

Information about authors:

Evdokimov V.V., <http://orcid.org/0000-0003-3910-2488>

Naumenko V.A., <http://orcid.org/0000-0002-4107-8109>

Tulenev Yu.A., <http://orcid.org/0000-0003-3995-4533>

Kurilo L.F., <http://orcid.org/0000-0003-3603-4838>

Kovalyk V.P., <http://orcid.org/0000-0002-7050-2642>

Sorokina T.M., <http://orcid.org/0000-0002-1709-423X>

Lebedeva A.L., <http://orcid.org/0000-0001-7536-6486>

Gomberg M.A., <http://orcid.org/0000-0002-1950-7982>

Kushch A.A., <http://orcid.org/0000-0002-3396-5533>

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received 11 May 2015

Accepted 29 May 2015

Введение

Бесплодие наблюдается у 12–15% пар репродуктивного возраста и является актуальной медицинской и социальной проблемой, несмотря на успехи репродуктивных технологий [1]. Почти в 50% случаев причина бесплодия связана с мужским фактором [2], более чем в 50% случаев мужского бесплодия его этиология остается неизвестной. Идиопатическое бесплодие представляет собой особенно трудную проблему, так как эмпирическое лечение в подобных случаях не приводит к успеху. С тех пор как в сперме впервые была обнаружена ДНК вируса простого герпеса (ВПГ) [3], изучению роли вирусов в качестве этиологического фактора мужского бесплодия были посвящены работы нескольких исследовательских групп [4–7]. Присутствие маркеров ВПГ и цитомегаловируса (ЦМВ) в органах и тканях мужской репродуктивной системы, а также данные о повышенной частоте обнаружения этих вирусов в эякуляте бесплодных мужчин [8–10] указывают на возможную связь герпесвирусной инфекции с нарушением фертильности. В сперме мужчин из бесплодных пар обнаруживают также другие герпесвирусы человека (ГВЧ) – вирус герпеса человека 6-го типа (ВГЧ-6), вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) [11, 12]. Однако мнения исследователей относительно роли герпесвирусов в этиологии мужского бесплодия расходятся от полного отрицания их влияния на процесс созревания мужских половых клеток [13] до установления прямой корреляции между вирусным инфицированием эякулята и мужским бесплодием [4, 14].

Вирусы папилломы человека (ВПЧ), как и герпесвирусы, широко распространены в человеческой популяции [15]. Данные различных авторов об обнаружении ВПЧ среди мужчин значительно варьируют от 1,3 до 72,9%, при этом частота выявления ДНК ВПЧ в сперме также различается от 0 до 100% [16].

На основании данных эпидемиологических и молекулярно-биологических исследований типы ВПЧ разделяют на кланды и относят к кландам низкого, промежуточного или высокого онкогенного риска [17]. Типы высокого канцерогенного риска (ВКР) составляют кланды А9 (типы 16, 31, 33, 35, 52, 58, 67), А7 (типы 18, 39, 45, 59, 68, 70, 85), А5 (типы 26, 51, 69, 82), А6 (типы 30, 53, 56, 66) и А11 (типы 34, 73). Разделение на кланды важно для динамического наблюдения за вирусной инфекцией и более точного прогнозирования ее развития, так как разные типы ВПЧ обладают неодинаковым онкогенным потенциалом, а также способностью к персистенции [18]. В то же время общепринятые критерии, позволяющие оценивать риск прогрессирования папилломавирусной инфекции (ПВИ) у мужчин, пока не разработаны.

Помимо онкогенного аспекта, в настоящее время активно изучаются роль ВПЧ в формировании мужского бесплодия и его влияние на течение беременности. Так, согласно данным метаанализа 9 исследований, включивших более 2 тыс. беременных и новорожденных, был сделан вывод о возможности вертикального пути передачи ВПЧ [19], показано негативное влияние на течение беременности в I триместре, результатом которого мо-

гут явиться неразвивающаяся беременность и самопроизвольный выкидыш [20].

Цель настоящего исследования состояла в изучении распространения и количественном анализе ГВЧ и ВПЧ ВКР у мужчин с идиопатическим бесплодием и пациентов, у постоянных партнеров которых были случаи самопроизвольного прерывания беременности, а также в оценке влияния вирусных инфекций на показатели спермы.

Материал и методы

Пациенты. Обследованы 196 мужчин, поступивших в медицинские учреждения Москвы: ФГБНУ МГНЦ и ФГБУЗ КБ №84. Пациенты были включены в одну из 3 групп.

В 1-ю группу (средний возраст $32,8 \pm 6,8$ года; $n = 112$) вошли мужчины с бесплодием неясной этиологии. Диагноз с использованием стандартных процедур устанавливали исключением урогенитальных нарушений и злокачественных опухолей, инфекций урогенитального тракта, варикоцеле, эндокринных нарушений и иммунологических факторов как возможных причин бесплодия [21]. У пациентов регистрировали бесплодие, если после 12 мес регулярной половой жизни без контрацепции у женщины не наступала беременность. У большинства обследованных лиц в этой группе (57%) показатели спермы соответствовали нормативам ВОЗ, у части (43%) было отмечено бесплодие с патозооспермией неясного генеза.

Во 2-ю группу (средний возраст $36,1 \pm 8,1$ года; $n = 63$) вошли пациенты, у партнеров которых в анамнезе были 1 случай или более самопроизвольного прерывания беременности неясной этиологии в I триместре (далее – невынашивание беременности).

3-ю группу (сравнения) (средний возраст $32,5 \pm 9,3$ года; $n = 21$) составили практически здоровые мужчины, обратившиеся с целью профилактического обследования.

До исследования от каждого пациента получено информированное согласие на выполнение обследования. Процедуры исследования проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией и одобрены местным комитетом по биомедицинской этике в ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи».

Клинический материал. Исследовали образцы эякулятов, полученные пациентами путем мастурбации после 3-дневного полового воздержания. Объем спермы составлял от 1,5 до 3 мл. Образцы сразу были разделены на 2 равные части: первую использовали для спермиоло-

гического анализа, вторую – для экстракции ДНК с последующим выявлением вирусных ДНК.

Спермиологическое обследование проводили согласно Руководству ВОЗ [22]. Оценивали основные параметры спермограммы: объем спермы, концентрацию и степень подвижности сперматозоидов, а также количество морфологически нормальных форм половых клеток.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). ДНК ВПЧ в клиническом материале определяли методом ПЦР с помощью реагентов фирмы «ИнтерЛабСервис» (Москва): комплект реагентов для экстракции ДНК «АмплиСенс ДНК-сорб-В» и набор реагентов для выявления ДНК ВПЧ 12 типов ВКР: типы 16, 31, 33, 35, 52, 58 (клайд А9); 18, 39, 45, 59 (клайд А7); 51 (клайд А5); 56 (клайд А6). Использовали набор для ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией АмплиСенс® ВПЧ ВКР скрин-FL. Амплификацию проводили с помощью Rotor-Gene 6000 («Corbett Research», Австралия). При интерпретации количественных данных руководствовались рекомендациями производителя тест-систем, разработанными для анализа ВПЧ в урогенитальных соскобах: концентрации ВПЧ $\leq 3 \lg 10/100$ тыс. кл. оцениваются как клинически малозначимые; от 3 до 5 $\lg 10/100$ тыс. кл. – как клинически значимые; более 5 $\lg 10/100$ тыс. кл. – как клинически значимые с высоким риском развития дисплазии.

Для количественного определения ДНК ГВЧ (ВЭБ, ЦМВ и ВГЧ-6) в клинических материалах использовали набор реагентов для ПЦР с гибридационно-флюоресцентной детекцией в режиме реального времени – АмплиСенс EBV/CMV/HHV6–скрин-FL.

Для эндогенного внутреннего контроля использовали β -глобиновый ген.

Статистический анализ. Для статистической обработки результатов использовали пакет прикладных компьютерных программ Statistica 6.0 и BIOPSTAT. Статистические различия анализировали, применяя критерии хи-квадрат, Стьюдента, Манна – Уитни. Различия показателей считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

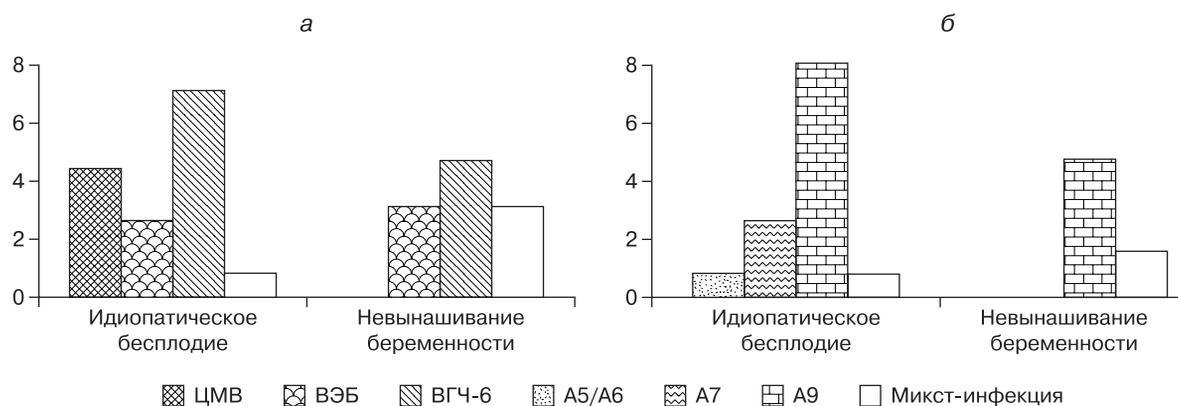
Изучены эякуляты пациентов 1–3-й группы. Суммарно ДНК ГВЧ и ВПЧ ВКР методом ПЦР была выявлена в эякулятах у 42 (21,4%) из 196 обследованных пациентов. Среди 42 пациентов с инфицированными эякулятами у 31 (73,8%) было идиопатическое бесплодие, у 11 (26,2%) – история невынашивания беременности у партнеров; различие между 1-й и 2-й группой статистически незначимо ($p = 0,3$). В 3-й

Таблица 1

Частота встречаемости ДНК ГВЧ и ВПЧ ВКР в эякулятах мужчин с бесплодием

Пациенты	ЦМВ	ВЭБ	ВГЧ-6	ВПЧ			Сочетания вирусов				Итого	
				A5/6	A7	A9	ВГЧ-6+ВЭБ	ЦМВ+ВГЧ-6	A5/6+A9	A7+A9		
1-я группа												
Идиопатическое бесплодие ($n = 112$)	5* (4,5)	3 (2,7)	8 (7,1)	1 (0,9)	3 (2,7)	9 (8,0)	1 (0,9)	0	1 (0,9)	0	31 (27,7)	
2-я группа												
Невынашивание ($n = 63$)	0	2 (3,2)	3 (4,8)	0	0	3 (4,8)	0	2 (3,2)	0	1 (1,5)	11 (17,5)	
3-я группа												
Здоровые ($n = 21$)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Всего... ($n = 196$)	5 (2,6)	5 (2,6)	11 (5,6)	1 (0,5)	3 (1,5)	12 (6,1)	1 (0,5)	2 (1,0)	1 (0,5)	1 (0,5)	42 (21,4)	

Примечание. * – количество пациентов (%).



Структура выявленных ГВЧ (а) и ВПЧ ВКР (б) в группах обследованных пациентов.

По горизонтали – группы пациентов; по вертикали – количество пациентов, в эякулятах которых обнаружены ДНК герпесвирусов ВЭБ, ЦМВ, ГВЧ-6 и их сочетания (а); ДНК ВПЧ ВКР А5/А6, А7, А9 и их сочетания (б).

группе ни у одного из практически здоровых фертильных мужчин, проходивших профилактическое обследование, ДНК вирусов в сперме не была обнаружена.

Результаты сравнительного анализа частоты обнаружения ДНК исследуемых вирусов в сперме мужчин 1–3-й группы представлены в табл. 1.

Данные табл. 1 показали, что в сперме мужчин 2-й группы ДНК ГВЧ и ПВЧ ВКР обнаружена суммарно в 17,5% случаев, в сперме у мужчин 1-й группы – в 27,7% случаев. Несмотря на то что частота обнаружения вирусов у мужчин с идиопатическим бесплодием оказалась более чем в 1,5 раза выше, чем у мужчин, партнерши которых страдали невынашиванием беременности, статистической значимости различия между 1-й и 2-й группой не достигали ($p = 0,053$).

В структуре выявленных вирусов (см. рисунок) все 3 ГВЧ составили суммарно 57,1% (24/42), при этом в группе мужчин с идиопатическим бесплодием их ДНК выделена у 17/24 (70,8%), во 2-й группе – у 7/24 (29,2%); $p > 0,05$. ДНК ВПЧ ВКР обнаружена суммарно у 42,9% (18/42) пациентов: у 14/18 (77,8%) в 1-й группе и у 4/18 (22,2%) во 2-й без достоверного различия между этими группами ($p > 0,05$).

Анализ частоты встречаемости каждого из трех изученных ГВЧ показал (см. рисунок, а), что ни в одном из образцов спермы пациентов 2-й группы ЦМВ не встречался в виде моноинфекции, но в 2 образцах был обнаружен в сочетании с ВГЧ-6, в то время как у пациентов с идиопатическим бесплодием ЦМВ в виде моноинфекции обнаружен у 5/112 (4,5%) пациентов и не был выявлен в сочетаниях с другими ГВЧ. ВЭБ встречался у 2,7% (3/112) пациентов в 1-й группе в виде моноинфекции и у 1 (0,9%) пациента в сочетании с ВГЧ-6 (0,9%). Во 2-й группе ВЭБ был обнаружен только в 2 (3,2%) эякулятах. Наиболее часто в эякулятах встречался ВГЧ-6: у 8 (7,1%) пациентов 1-й группы в виде моноинфекции и у 1 (1/112; 0,9%) в сочетании с ВЭБ. Во 2-й группе ВГЧ-6 обнаружен у 3 (4,8%) пациентов в виде моноинфекции и у 2 (3,2%) в сочетании с ЦМВ. Суммарно в эякулятах 175 бесплодных мужчин обеих групп ВГЧ-6 был определен у 14 (8%), ВЭБ – у 6 (3,4%) и ЦМВ – у 7 (4%). Статистическая обработка данных показала, что различия в частоте встречаемости ГВЧ между сравниваемыми группами были незначимыми. Частота детекции 3 изученных ГВЧ также существенно не различалась ($p > 0,05$).

При анализе частоты встречаемости в сперме ВПЧ ВКР разных типов установлено, что в структуре выявленных генотипов ВПЧ наиболее распространенными были генотипы, относящиеся к клайду А9 (14/175; 8,0%), которые определены в виде моноинфекции у 12/175 (6,8%) пациентов в обеих группах и дополнительно у 2 (1%) пациентов в сочетаниях с А5/6 и А7 (см. рисунок, б; табл. 1).

При сравнительном анализе частоты встречаемости ВПЧ ВКР всех типов у пациентов 1-й (14/112; 12,5%) и 2-й групп (4/63; 6,3%) различия оказались статистически значимыми ($p = 0,02$). Наиболее часто среди ВПЧ ВКР в эякулятах встречались генотипы клайда А9 (14/18; 77,8%), различие с другими клайдами статистически значимо ($p = 0,04$). Следует отметить, что у пациентов 2-й группы не были обнаружены ВПЧ клайда А5/6. В то же время у пациентов 1-й группы выявлены ВПЧ всех изученных клайдов (А5/6, А7 и А9) не только в виде моноинфекции, но и в сочетаниях (см. рисунок, б).

Для оценки влияния изучаемых вирусов на основные показатели качества спермы анализировали спермограммы обследованных пациентов. Результаты изучения 34 спермограмм представлены в табл. 2.

Статистический анализ показал значительные различия в показателях спермы инфицированных пациентов по сравнению со здоровыми лицами: в 2,5 раза снижено

Таблица 2

Сравнительный анализ основных показателей спермограмм у инфицированных пациентов и здоровых мужчин

Показатели спермы	Невынашивание беременности (n = 6)	Идиопатическое бесплодие (n = 15)	Здоровые (n = 13)
Концентрация сперматозоидов, 10 ⁶ /мл	77,9±45,5	85,4±35,8	92,1±57,9
Подвижность (а + б), %	38,3±8,5*	34,8±19,3**	52,7±15,1***
Морфологически нормальные формы, %	19,6±8,5 ^o	27,9±26,0 ^{oo}	47,7±10,6 ^{ooo}

Примечание. *** – $p = 0,0120$; ** – $p = 0,0452$; * – $p = 0,0165$; ^o – $p < 0,0001$.

Таблица 3

Вирусная нагрузка в положительных образцах эякулята

Концентрация вирусных ДНК	Вирусы				Всего (n = 47)
	ВПЧ ВКР (n = 20)	ЦМВ (n = 7)	ГЧ-6 (n = 14)	ВЭБ (n = 6)	
Копии ДНК на 100 тыс. клеток, медиана [min; max]	687 [8; 112 201]	6489 [15; 68 070]	374 [4; 13 628]	49 [13; 216]	217 [4; 112 201]

количество морфологически нормальных форм половых клеток у мужчин 2-й группы и в 1,7-у пациентов 1-й группы ($p < 0,0001$ и $p = 0,01$ соответственно); в 1,5 раза снижена подвижность сперматозоидов (различие статистически значимо; $p = 0,01$ и $p = 0,04$ соответственно).

У 47 пациентов удалось оценить вирусную нагрузку в эякулятах. Результаты изучения концентрации ДНК ВПЧ ВКР и ГВЧ в эякулятах представлены в табл. 3.

Количественный анализ ДНК изученных вирусов выявил большой разброс между образцами: минимальное значение составило 4 копии ДНК на 100 тыс. клеток, максимальное – 112 201 копия на 100 тыс. клеток. Медианное значение по всем положительным образцам оказалось относительно невысоким – 217 копий на 100 тыс. клеток (2,34 lg 10). Поскольку количество образцов, содержащих ВПЧ ВКР А5/6 и А7 было небольшим (2 и 4 соответственно), медианное значение концентрации ДНК ВПЧ ВКР было вычислено по всем ($n = 20$) положительным по ВПЧ образцам и составило 687 копий на 100 тыс. клеток (2,84 lg 10). Сравнение концентраций ДНК ГВЧ показало, что медианное значение в образцах, содержащих ЦМВ, составляло 6489 копий на 100 тыс. клеток (3,81 lg 10), что значительно превосходило вирусную нагрузку в эякулятах пациентов, инфицированных ВЭБ и ГЧ-6, а также ВПЧ ВКР. Важно отметить, что у части пациентов (13/42, 30,9%) концентрация вирусной ДНК в эякуляте превышала средние значения более чем в 100 раз и достигала 4–5 lg 10 на 100 тыс. клеток.

Обсуждение

В настоящей работе ДНК исследуемых вирусов обнаружена в эякуляте у каждого 5-го из 196 обследованных мужчин. Герпесвирусы ЦМВ, ГЧ-6, ВЭБ выявлены у 12,2%, ВПЧ ВКР – у 9,2% пациентов без клинических признаков вирусных заболеваний. Ни у одного из практически здоровых фертильных мужчин ВПЧ ВКР в эякуляте не были обнаружены. Полученные данные ниже, чем частота встречаемости ВПЧ ВКР, выявленная в сперме пациентов клиники ЭКО в Мексике (59,73%) [23], но сходны с результатами, полученными в среднем по странам Северной, Южной и Западной Европы (12,4%) [24]. Данные о распространении ГВЧ в настоящем исследовании ниже, чем в сперме у пациентов с бесплодием в Китае (28%), но практически сходны с ранее полученными результатами [12] обследования пациентов с идиопатическим бесплодием (13,1%). Расхождения разных авторов могут быть следствием нескольких причин. В опубликованных работах представлены результаты обследования различных групп бессимптомных лиц как по количеству и возрасту, так и по составу: взрослых молодых мужчин, доноров спермы, пациентов клиник ЭКО и КВД (STD), партнеров женщин с цервикальной интраэпителиальной неоплазией

(CIN) [25]. Неодинаковы способы получения, доставки и предобработки клинических материалов, а также методы детекции ДНК вирусов и оценки результатов.

Один из активно изучаемых вопросов, касающихся бессимптомной инфекции мужчин, – влияние вирусов на качество спермы. В ряде работ показано, что присутствие ВПЧ в эякуляте ассоциируется со снижением подвижности сперматозоидов или рН эякулята, а также с уменьшением количества морфологически нормальных половых клеток [5, 26]. Другие авторы не подтверждают негативное влияние ВПЧ на основные показатели спермограммы [6]. Столь же значительны расхождения во мнениях относительно изменений качества спермы у ГВЧ-инфицированных пациентов. В работах одних авторов сообщается об уменьшении концентрации и подвижности сперматозоидов в ЦМВ-инфицированных эякулятах [11]. Другие исследователи не обнаружили влияния ЦМВ, ВЭБ или ГЧ-6 на параметры спермы [13].

В настоящей работе при сравнении основных показателей спермы в вирусинфицированных образцах установлено, что подвижность сперматозоидов, а также количество морфологически нормальных половых клеток в эякулятах вирусинфицированных пациентов значительно снижены по сравнению со здоровыми мужчинами без проблем фертильности. Это указывает на возможность негативного влияния вирусных инфекций на репродуктивную функцию мужчин.

Отдельный вопрос – выяснение причины бесплодия семейных пар, вызванного невозможностью наступления или потерей беременности. Ответ на него представляет большую сложность в связи с необходимостью оценки роли как мужского, так и женского факторов. Полученные данные показали, что в эякулятах мужчин из 63 бесплодных пар с невынашиванием беременности ДНК ВПЧ ВКР встречалась значительно реже (6,3%), чем у мужчин с идиопатическим бесплодием (12,5%). Данные настоящей работы позволяют предположить, что при спонтанных абортах негативная роль ВПЧ-инфекции ассоциируется скорее с женским фактором, чем с мужским. В подтверждение этого предположения можно сослаться на результаты, показавшие, что у ВПЧ-позитивных женщин беременность наступает в 2,4 раза реже, чем у ВПЧ-негативных ($p < 0,02$) [27]. В случаях герпетического инфицирования сперматозоидов не выявлены статистически значимые различия между 1-й и 2-й группой, в то время как другие авторы отметили ассоциацию ГВЧ в эякулятах со спонтанным прерыванием беременности, а также с неудачами при использовании репродуктивных технологий [8].

В настоящее время многими исследователями признается, что скрининг герпесвирусов и ВПЧ необходим. Для оценки риска развития инфекционных и онкогенных заболеваний у женщин широко используют показатели вирусной нагрузки ВПЧ ВКР в органах урогенитального тракта (УГТ). Для мужчин аналогичные показатели пока не установлены. Высокие вирусные нагрузки в эякулятах у значительной части бессимптомных пациентов (30,9%) указывают на целесообразность разработки критериев оценки риска клинически выраженных заболеваний. Если учесть, что при высокой вирусной нагрузке персистенция вирусов в УГТ мужчин наблюдается статистически значимо чаще, чем при низкой вирусной нагрузке, можно предположить, что бессимптомные пациенты с высокой вирусной нагрузкой относятся к группе риска по прогрессированию заболевания и возможного развития онкопатоло-

логии. Однако для выяснения надежности использования количественного определения вирусной ДНК как предиктора неблагоприятного развития инфекции у мужчин необходимы дальнейшие динамические исследования с анализом течения заболевания и его исхода.

В заключение следует отметить, что вирусная ДНК не была выявлена ни у одного из практически здоровых мужчин, но была обнаружена в эякулятах у 24% пациентов с проблемами фертильности, причем ГВЧ и ВПЧ ВКР встречались приблизительно с одинаковой частотой. Эти результаты по крайней мере отчасти заполняют пробел в данных по Восточной Европе и указывают на возможную ассоциацию бессимптомной вирусной инфекции с нарушением фертильности у мужчин. Количественный анализ ДНК позволил определить у части пациентов с бесплодием высокие концентрации ДНК ГВЧ и ВПЧ ВКР. Это означает, что определение количества копий ДНК-содержащих вирусов можно использовать как полезный индикатор для мониторинга развития вирусных инфекций и своевременного принятия решения о начале терапии. Дальнейшие исследования помогут определить роль вирусных инфекций в нарушении репродуктивной функции у мужчин и разработать эффективные подходы для их лечения.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 1–6, 11–27 СМ. REFERENCES)

- Куш А.А., Науменко В.А., Климова Р.Р., Тюленев Ю.А., Малолينا Е.А. Герпесвирусная инфекция мужских гамет и бесплодие: от экспериментальных моделей к разработке клинических рекомендаций. *Вопросы вирусологии.* 2013; 1: 132–44.
- Бочарова Е.Н., Брагина Е.Н., Гусак Ю.К., Зыкова М.С., Лихаев Д.Н., Зотов В.В. и др. Спонтанное прерывание беременности, неудачи при использовании репродуктивных технологий и герпетическое инфицирование сперматозоидов. *Андрология и генитальная хирургия.* 2006; 1: 59–65.
- Брагина Е.Е., Абдумаликов Р.А., Курило Л.Ф., Шилейко Л.В., Латыпова М.Ф., Дмитриев Г.А. Выявление сперматозоидов, инфицированных вирусом простого герпеса. *Вестник дерматологии и венерологии.* 2000; 5: 18–22.
- Климова Р.Р., Чичев Е.В., Науменко В.А., Гаджиева З.С., Цибилов А.С., Адиева А.А. и др. Вирус простого герпеса и цитомегаловирус в эякуляте мужчин: вирус простого герпеса чаще встречается при идиопатическом бесплодии и коррелирует со снижением показателей спермы. *Вопросы вирусологии.* 2010; 55 (1): 27–31.
- Gimenes F., Souza R.P., Bento J.C., Teixeira J.J., Maria-Engler S.S., Bonini M.G. et al. Male infertility: a public health issue caused by sexually transmitted pathogens. *Nat. Rev. Urol.* 2014; 11 (12): 672–87.
- Dawson C., Whitfield H. Subfertility and male sexual dysfunction. *BMJ.* 1996; 312 (7035): 902–5.
- El Borai N., Inoue M., Lefevre C., Naumova E.N., Sato B., Yamamura M. Detection of herpes simplex virus DNA in semen and menstrual blood of individuals attending an infertility clinic. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 1997; 23 (1): 17–24.
- Kapranos N., Petrakou E., Anastasiadou C., Kotronias D. Detection of herpes simplex virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus in the semen of men attending an infertility clinic. *Fertil. Steril.* 2003; 79 (Suppl. 3): 1566–70.
- Garolla A., Pizzol D., Bertoldo A., De Toni L., Barzon L., Foresta C. Association, prevalence, and clearance of human papillomavirus and antisperm antibodies in infected semen samples from infertile patients. *Fertil. Steril.* 2013; 99 (1): 125–31.
- Schillaci R., Capra G., Bellavia C., Ruvolo G., Scazzone C., Venezia R. et al. Detection of oncogenic human papillomavirus genotypes on spermatozoa from male partners of infertile couples. *Fertil. Steril.* 2013; 100 (5): 1236–40.
- Kushch A.A., Naumenko V.A., Klimova R.R., Tyulenev Yu.A., Malolina E.A. Herpes virus infection of human gametes and male sterility: from experimental models to development of clinical recommendations. *Voprosy virusologii.* 2013; 1: 132–44. (in Russian)
- Bocharova E.N., Bragina E.N., Gusak Yu.K., Zykova M.S., Likhayev D.N., Zotov V.V. et al. Spontaneous abortion, failure of reproductive technology and herpetic infection of sperm. *Andrologiya i genital'naya khirurgiya.* 2006; 1: 59–65. (in Russian)
- Брагина Е.Е., Абдумаликов Р.А., Курило Л.Ф., Шилейко Л.В., Латыпова М.Ф., Дмитриев Г.А. Detection of spermatozoa infected with herpes simplex virus. *Vestnik dermatologii i venerologii.* 2000; 5: 18–22. (in Russian)
- Klimova R.R., Chichev E.V., Naumenko V.A., Gadzhieva Z.S., Tsiibizov A.S., Adieva A.A. et al. Herpes simplex virus and cytomegalovirus in male ejaculate: herpes simplex virus is more common in idiopathic infertility and correlates with a decrease in sperm parameters. *Voprosy virusologii.* 2010; 55 (1): 27–31. (in Russian)
- Kaspersen M.D., Larsen P.B., Kofod-Olsen E., Fedder J., Bonde J., Höllsberg P. Human herpesvirus-6A/B binds to spermatozoa acrosome and is the most prevalent herpesvirus in semen from sperm donors. *PLoS One.* 2012; 7 (11): e48810.
- Naumenko V., Tyulenev Y., Kurilo L., Shileiko L., Sorokina T., Evdokimov V. et al. Detection and quantification of human herpes viruses types 4–6 in sperm samples of patients with fertility disorders and chronic inflammatory urogenital tract diseases. *Andrology.* 2014; 2 (5): 687–94.
- Neofytou E., Sourvinos G., Asmarianaki M., Spandidos D.A., Makrigiannakis A. Prevalence of human herpes virus types 1–7 in the semen of men attending an infertility clinic and correlation with semen parameters. *Fertil. Steril.* 2009; 91 (6): 2487–94.
- Ochsendorf F.R. Sexually transmitted infections: impact on male fertility. *Andrologia.* 2008; 40 (2): 72–5.
- Morris B.J., Gray R.H., Castellsague X., Bosch F.X., Halperin D.T., Waskett J.H. et al. The strong protection afforded by circumcision against cancer of the penis (Invited Review). *Adv. Urol.* 2011; 2011: 812 368.
- Laprise C., Trottier H., Monnier P., Coutlée F., Mayrand M.H. Prevalence of human papillomaviruses in semen: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod.* 2014; 29 (4): 640–65.
- Chan S.Y., Delius H., Halpern A.L., Bernard H.U. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J. Virol.* 1995; 69 (5): 3074–83.
- Bernard H.U., Calleja-Macias I.E., Dunn S.T. Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *Int. J. Cancer.* 2006; 118: 1071–6.
- Medeiros L.R., Ethur A.B., Hilgert J.B., Zanini R.R., Berwanger O., Bozzetti M.C. et al. Vertical transmission of human papillomavirus: a systematic quantitative review. *Cad. Saude Publica.* 2005; 21 (4): 1006–15.
- Skoczynski M., Gozdicka-Jozefiak A., Kwasniewska A. Prevalence of human papillomavirus in spontaneously aborted products of conception. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 2011; 90 (12): 1402–5.
- Jungwirth A., Diemer T., Dohle G.R., Giwercman A., Kopa Z., Tourayne H., Krausz C. *Guidelines on Male Infertility.* European Association of Urology; 2013. Available at: http://www.uroweb.org/gls/pdf/16_Male_Infertility_LR.pdf.
- World Health Organization. *WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen.* Geneva: World Health Organization; 2010.
- Flores-Sánchez I., Gutiérrez-Salinas J., Enriquez-Alvarado E., Hernández-Rodríguez S., Ramos-Barragán C., Salamanca-Ceciliano A. et al. Detection of human papillomavirus types 16 and 18 in semen samples from patients in an assisted reproduction program. *Ginecol. Obstet. Mex.* 2010; 78 (12): 645–51.
- Hebnes J.B., Olesen T.B., Duun-Henriksen A.K., Munk C., Norrild B., Kjaer S.K. Prevalence of genital human papillomavirus among men in Europe: systematic review and meta-analysis. *J. Sex Med.* 2014; 11 (11): 2630–44.
- Lenzi A., Mirone V., Gentile V., Bartoletti R., Ficarra V., Foresta C. et al. Rome Consensus Conference – statement; human papilloma virus diseases in males. *BMC Public Health.* 2013; 13: 117.
- Yang Y., Jia C.W., Ma Y.M., Zhou L.Y., Wang S.Y. Correlation between HPV sperm infection and male infertility. *Asian J. Androl.* 2013; 15 (4): 529–32.
- Spandorfer S.D., Bongiovanni A.M., Fasioulotis S., Rosenwaks Z., Ledger W.J., Witkin S.S. Prevalence of cervical human papillomavirus in women undergoing in vitro fertilization and association with outcome. *Fertil. Steril.* 2006; 86 (3): 765–7.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 578.821.5:578.23].083.2

Замедянская А.С., Титова К.А., Сергеев Ал.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев Ар.А., Галахова Д.О., Нестеров А.Е., Носарева О.В., Шишкина Л.Н., Таранов О.С., Омигов В.В., Агафонов А.П., Сергеев А.Н.

ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ЧЕЛОВЕКА К ВИРУСУ НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЕРВИЧНЫХ КУЛЬТУР МОНОЦИТОВ-МАКРОФАГОВ

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»», 630559, пос. Кольцово, Новосибирская область

В исследованиях, проведенных на первичных культурах клеток гранулоцитов, мононуклеаров и моноцитов-макрофагов, полученных из крови человека, с использованием вируса натуральной оспы (ВНО) в дозах 0,001–0,021 БОЕ/кл. (бляшкообразующие единицы на лунку), была отмечена положительная динамика накопления вируса только в моноцитах-макрофагах с максимальными значениями его концентраций (5,0–5,5 lg БОЕ/мл) в основном через 6 сут после заражения. Факт размножения ВНО в моноцитах-макрофагах был подтвержден данными электронной микроскопии. В то же время вирус вакцины при испытанных дозах 3,3 и 4,2 lg БОЕ/мл не проявлял способности к размножению в этих клетках человека. Чувствительность людей к ВНО по данным, полученным на моноцитах-макрофагах человека, соответствовала ~1 БОЕ (с учетом беспрепятственного взаимодействия вируса в его организме с клетками такого типа), что согласуется с ранее опубликованными теоретическими данными о его чувствительности к этому вирусу. Экспериментально обоснованное нами значение чувствительности человека к ВНО позволит прогнозировать адекватность разрабатываемых *in vivo* моделей натуральной оспы с использованием чувствительных животных, что необходимо для надежной оценки эффективности лечебно-профилактического действия создаваемых препаратов против оспы.

Ключевые слова: вирус натуральной оспы; вирус вакцины; человек; первичная культура клеток крови; 50% инфицирующая доза; вирусная продукция.

Для цитирования: Замедянская А.С., Титова К.А., Сергеев Ал.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев Ар.А., Галахова Д.О., Нестеров А.Е., Носарева О.В., Шишкина Л.Н., Таранов О.С., Омигов В.В., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Оценка чувствительности человека к вирусу натуральной оспы с использованием первичных культур моноцитов-макрофагов. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (2): 69-73.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2- 69-73

Zamedyanskaya A.S., Titova K.A., Sergeev Al.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev Ar.A., Galakhova D.O., Nesterov A.E., Nosareva O.V., Shishkina L.N., Taranov O.S., Omigov V.V., Agafonov A.P., Sergeev A.N. **EVALUATION OF THE HUMAN SENSITIVITY TO SMALLPOX VIRUS BY THE PRIMARY CULTURES OF THE MONOCYTE-MACROPHAGES**

State Research Center for Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russian Federation

Studies of the primary cultures of granulocytes, mononuclear, and monocyte-macrophage cells derived from human blood were performed using variola virus (VARV) in the doses of 0.001-0.021 PFU/cell (plaques-forming units per cell). Positive dynamics of the virus accumulation was observed only in the monocyte-macrophages with maximum values of virus concentration (5.0-5.5 lg PFU/ml) mainly within six days after the infection. The fact of VARV replication in the monocyte-macrophages was confirmed by the data of electron microscopy. At the same time, virus vaccines when tested in doses 3.3 and 4.2 lg PFU/ml did not show the ability to reproduce in these human cells. The people sensitivity to VARV as assessed from the data obtained on human monocyte-macrophages corresponded to ~1 PFU (taking into account the smooth interaction of the virus in the body to the cells of this type), which is consistent to previously found theoretical data on the virus sensitivity. The human susceptibility to VARV assessed experimentally can be used to predict the adequacy of developed smallpox models (*in vivo*) based on susceptible animals. This is necessary for reliable assessment of the efficiency of development of drugs for treatment and prophylaxis of the smallpox.

Key words: variola virus; vaccinia virus; human; primary blood cells; 50% infectious dose; virus production.

For citation: Zamedyanskaya A.S., Titova K.A., Sergeev Al.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev Ar.A., Galakhova D.O., Nesterov A.E., Nosareva O.V., Shishkina L.N., Taranov O.S., Omigov V.V., Agafonov A.P., Sergeev A.N. Evaluation of the human sensitivity to smallpox virus by the primary cultures of the monocyte-macrophages. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(2): 69-73. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2- 69-73

For correspondence: Alena S. Zamedyanskaya, Junior research scientist, State Research Center for Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russian Federation, E-mail: zamedyanskaya_as@vector.nsc.ru

Information about authors:

Zamedyanskaya A.S., <http://orcid.org/0000-0002-1177-2693>

Sergeev Al.A., <http://orcid.org/0000-0001-8355-5551>

Titova K.A., <http://orcid.org/0000-0001-8764-9408>

Kabanov A.S., <http://orcid.org/0000-0002-6287-0912>

Bulychev L.Ye., <http://orcid.org/0000-0001-9598-7327>

Для корреспонденции: Замедянская Алена Сергеевна, младший научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»», 630559, пос. Кольцово, Новосибирская область, E-mail: zamedyanskaya_as@vector.nsc.ru

Sergeev Ar.A., <http://orcid.org/0000-0002-3591-1571>
Galakhova D.O., <http://orcid.org/0000-0002-7801-4141>
Nesterov A.E., <http://orcid.org/0000-0001-7943-3287>
Nosareva O.V., <http://orcid.org/0000-0003-2387-4299>
Shishkina L.N., <http://orcid.org/0000-0002-8264-0217>
Taranov O.S., <http://orcid.org/0000-0002-6746-8092>
Omigov V.V., <http://orcid.org/0000-0002-2028-6099>
Agafonov A.P., <http://orcid.org/0000-0003-2577-0434>
Sergeev A.N., <http://orcid.org/0000-0001-5984-8776>

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received 24 February 2015

Accepted 19 March 2015

В научной литературе содержится информации о чувствительности людей к вирусу натуральной оспы (ВНО): до 10 вирусных частиц могут вызвать заболевание человека [1, 2], при этом доказательств, обосновывающих величину данного показателя, не приводится. В то же время существует экспериментальный подход, позволяющий оценить этот показатель для млекопитающих *in vitro*, используя их первичные культуры клеток-мишеней для того или иного вируса [3–5 и др.]. Известно, что основными первичными клетками-мишенями для ВНО у человека, судя по данным, полученным с этим вирусом на модельных животных [6–8], являются макрофаги (клетки системы мононуклеарных фагоцитов).

В связи с этим целью настоящих исследований было проведение экспериментальной оценки чувствительности человека к ВНО с использованием его первичных культур клеток системы мононуклеарных фагоцитов (моноцитов-макрофагов).

Материал и методы

Все эксперименты с живым ВНО были проведены на базе ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Россия) в лаборатории с максимальным (первым по классификации РФ) уровнем биологической защиты (BSL-4 по зарубежной классификации) с использованием изолирующих пневмокапсулов.

Вирус. В экспериментах использовали штамм Ind-3a ВНО и штамм Л-ИВП вируса вакцины (ВВ), полученные из Государственной коллекции вирусов и риккетсий ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Две серии вирусосодержащего материала, использованные в экспериментах, были приготовлены при их культивировании в клетках Vero и имели биоконцентрацию 6,7 и 7,0 lg БОЕ/мл соответственно. Вирусосодержащий материал был расфасован в индивидуальные пробирки и хранился при минус 70°C.

Клеточная культура. Для наработки вирусосодержащей суспензии и титрования различных биоматериалов использовали перевиваемую культуру клеток Vero, полученную из коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Получение первичных клеток крови человека. Добровольцы перед взятием у них крови для приготовления первичных культур клеток были обследованы на наличие противооспешных антител в сыворотке крови с помощью реакции нейтрализации с использованием ВВ [9]. Для приготовления первичных культур клеток использовали кровь от 3 добровольцев (25–30 лет), 2 из которых ранее (1 и 3 года тому назад) были вакцинированы против натуральной оспы и имели титры антител к ВВ: 1:32 и более 1:256. Процедуру взятия венозной крови у добровольцев осуществляли в стационаре

ФБУЗ «Медико-санитарная часть № 163» Федерального медико-биологического агентства России в соответствии с протоколом № 3 от 02.12.13, утвержденным этической комиссией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Полученную от добровольцев кровь в растворе ЭДТА вносили на двойной градиент плотности фикоколл-верографина 1,077 и 1,119 г/мл в соотношении их объемов 1:2. После 40 мин центрифугирования в бакет-роторе с ускорением 200 g (1500–1800 об/мин) при 20°C над границей градиента плотности 1,077 г/мл собирали слой клеток для получения суспензионной первичной культуры мононуклеаров крови (СПКМК). Для получения суспензионной первичной культуры гранулоцитов крови (СПКГК) слой клеток собирали между верхней и нижней границей градиентов плотности 1,077 и 1,119 г/мл. Отобранные клетки дважды отмывали питательной средой RPMI-1640 путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 10 мин при комнатной температуре. После второго центрифугирования к клеткам добавляли поддерживающую питательную среду RPMI-1640 с гентамицином (80 мкг/мл) и эмбриональной бычьей сывороткой (2% по объему), подсчитывали концентрацию клеток и перед экспериментом вносили в лунки 24-луночных культуральных планшетов по $(7,5 \pm 0,5) \cdot 10^5$ кл/лунку. Для получения монослойной первичной культуры моноцитов-макрофагов крови (МПМК-МК) СПКМК заливали по 1 мл в лунки 24-луночного культурального планшета, сменив питательную среду на ростовую: среду RPMI-1640 с гентамицином (80 мкг/мл) и эмбриональной бычьей сывороткой (10% по объему) и инкубировали в атмосфере, содержащей 5% CO₂ при 37°C в течение 24 ч. Затем не адгезированные на дне лунок клетки удаляли и лунки промывали средой RPMI-1640. Непосредственно перед заражением в лунках с монослоем макрофагоподобных клеток меняли питательную среду на поддерживающую, при этом клетки из 4 лунок планшета снимали со дна и подсчитывали в камере Горяева, в среднем их концентрация составляла $(9,0 \pm 1,5) \cdot 10^5$ кл/лунку.

В качестве отрицательного контроля, показывающего отсутствие накопления вирусов, использовали суспензию клеточного дебриса, полученного путем 3-кратного замораживания – оттаивания смеси, приготовленной в равных пропорциях (по количеству клеток) СПКГК, СПКМК и МПМК-МК в поддерживающей питательной среде с последующей проверкой на отсутствие жизнеспособных клеток с помощью световой микроскопии и путем посева на культуральный планшет.

Изучение динамики накопления вирусов в первичных клетках крови человека. Клетки каждой лунки инфицировали в объеме 0,01 мл ВНО или ВВ в дозах

Таблица 1

Динамика накопления штамма Ind-3a ВНО в первичных культурах клеток крови не вакцинированного против натуральной оспы человека

Вид материала	Доза заражения, БОЕ/кл.	Концентрация ВНО, lg БОЕ/мл ($M \pm I_{95}$, $n = 4$), в клеточных материалах в разные часы п. з.				
		1	24	48	72	144
СПКГК	0,021	4,2±0,1	3,7±0,1	3,7±0,1	3,5±0,0	3,4±0,1
	0,001	3,0±0,1	2,5±0,1	2,4±0,0	2,8±0,0	2,5±0,0
СПКМК	0,008	3,8±0,1	4,7±0,1*	4,5±0,0*	4,5±0,1*	5,4±0,0***
	0,002	3,2±0,1	2,1±0,3	3,5±0,0**	4,0±0,3**	5,1±0,2***
МПКМ-МК	0,017	4,1±0,2	3,5±0,0	4,4±0,0**	5,2±0,1#	5,0±0,1#
	0,003	3,4±0,0	2,4±0,0	4,2±0,1**	4,3±0,0**	5,5±0,0***
Контроль (дебрис СПКГК, СПКМК, МПКМ-МК)	0,017 ^{###}	4,1±0,1	3,8±0,1	3,4±0,2	3,2±0,1	1,8±0,2
	0,003 ^{###}	3,5±0,0	2,5±0,0	1,7±0,2	1,8±0,1	<0,7

Примечание. * – величина достоверно выше, чем через 1 ч п. з., $p < 0,05$; ** – величина достоверно выше, чем через 24 ч п. з., $p < 0,05$; *** – величина достоверно выше, чем через 72 ч п. з., $p < 0,05$; # – величина достоверно выше, чем через 48 ч п. з., $p < 0,05$; ### – величина определена в пересчете на начальное количество взятых клеток в смеси до их дезинтеграции; < 0,7 – величина ниже порога чувствительности (0,7 lg БОЕ/лунку) использованного метода титрования. Здесь и в табл. 2: n – число повторов определения объединенных проб содержимого 4 лунок; M – среднее значение; I_{95} – 95% доверительный интервал.

0,001–0,021 БОЕ/кл. В каждой временной точке через 1, 24, 48, 72 и 144 ч после заражения (п. з.) или 1, 24, 48, 72, 96 ч п. з. делали объединенную пробу содержимого 4 лунок после 3-кратной заморозки-оттаивания для определения биологической концентрации ВНО или ВВ соответственно. Для электронно-микроскопического исследования инфицированный ВНО монослой МПКМ-МК отмывали, снимали резиновым полисменом и готовили образцы, для этой же цели использовали СПКМК, зараженные ВНО, предварительно сняв резиновым полисменом клетки, фиксированные ко дну лунок пластикового планшета.

Определение 50% инфицирующей дозы вируса и его урожайности. Показатели урожайности и инфекционности ВНО в МПКМ-МК определяли после их инфицирования в объеме 0,01 мл в лунках культуральных планшетов дозами от 0,05 до 1600 БОЕ/млн клеток с 10-кратным шагом, используя для каждой дозы по 6 лунок. Параметры урожайности ВНО оценивали в пересчете на 1 млн клеток, учитывая среднюю концентрацию клеток по 4 лункам и среднюю концентрацию вирусов по 6 лункам (после 3-кратной заморозки-оттаивания), соответствующим минимальной дозе вируса, вызывающей их накопление во всех 6 лунках.

Вирусологический анализ. Концентрацию жизнеспособного вируса в биоматериалах определяли методом титрования в монослое клеток Vero [9].

Электронно-микроскопическое исследование. Для этих исследований образцы МПКМ-МК и СПКМК, инфицированных ВНО, фиксировали в 4% растворе параформальдегида и дофиксировали 1% раствором осмиевой кислоты, обезвоживали по стандартной методике в растворах этилового спирта возрастающей концентрации и ацетоне и заливали в смесь эпон–аралдит. Ультратонкие срезы органов готовили на микротоме Райхерт–Янг (Австрия), контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Срезы исследовали в электронном микроскопе JEM 1400 («Jeol», Япония), фотосъемку проводили с помощью встроенной цифровой камеры Jeol и цифровой камеры бокового вывода Veleta («SIS», Германия). Для обработки и анализа снимков использовали программный пакет iTEM («SIS», Германия).

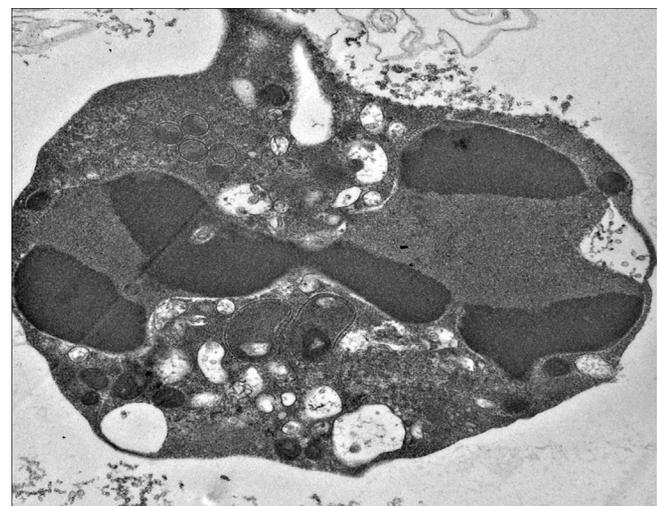
Статистическую обработку результатов проводили стандартными методами [10] с помощью пакета компьютерных программ Statistica 6.0 («StatSoft Inc.» 1984–2001) с оценкой достоверности различий ($p \leq 0,05$) для 95% доверительного уровня (I_{95}). ИД₅₀ рассчитывали по формуле Спирмена–Кербера.

Результаты и обсуждение

На начальном этапе необходимо оценить возможность размножения ВНО в первичных культурах клеток, полученных из крови человека. Для этого были приготовлены на основе крови добровольца, не вакцинированного против натуральной оспы, СПКГК, СПКМК и МПКМ-МК, включая контроль (их клеточный дебрис). С целью сравнения результатов исследования на ВНО парал-

ельно проводили аналогичного типа эксперимент на МПКМ-МК, но с использованием ВВ. Результаты этих исследований представлены в табл. 1 и 2.

Данные табл. 1 убедительно свидетельствуют о размножении ВНО в СПКМК и МПКМ-МК, при этом в зависимости от используемой в эксперименте заражающей дозы вируса наблюдали значимый прирост его биологической концентрации уже через 1 и 2 сут п. з. Максимального уровня накопления вирус достигал в основном через 6 сут п. з. По данным электронной микроскопии обнаружены признаки размножения вируса



Электроннограмма человеческой монослойной первичной культуры моноцитов-макрофагов крови через 72 ч после заражения штаммом Ind-3a ВНО в дозе 0,017 lg БОЕ/кл.: моноцит-макрофаг в состоянии апоптоза, в его цитоплазме (вверху слева) несколько незрелых вирусных частиц

Таблица 2

Динамика накопления штамма Л-ИВП ВВ в первичных культурах клеток крови не вакцинированного против натуральной оспы человека

Вид материала	Доза заражения, БОЕ/кл.	Концентрация ВНО, lg БОЕ/мл ($M \pm I_{95}$, $n = 4$), в клеточных материалах в разные часы после заражения				
		1	24	48	72	96
МПКМ-МК	0,017	4,1±0,0	4,2±0,1	4,2±0,2	4,1±0,0	4,0±0,0
	0,002	3,2±0,1	3,1±0,0	3,0±0,1	3,0±0,1	3,0±0,3
Контроль (дебрис МПКМ-МК)	0,017*	4,2±0,1	4,3±0,1	4,2±0,1	4,2±0,2	3,8±0,1
	0,002*	3,3±0,0	3,0±0,1	3,1±0,1	3,0±0,3	2,9±0,1

Примечание. * – величина определена в пересчете на начальное количество взятых клеток до их дезинтеграции.

в моноцитах-макрофагах МПКМ-МК (см. рисунок) и СПКМК человека. В то же время сколько-нибудь значимого прироста биологической концентрации ВНО в СПКМК при заражении разными дозами вируса не наблюдалось в течение всего срока наблюдения. В противоположность результатам, полученным на МПКМ-МК с ВНО, приведены данные, указывающие на отсутствие размножения в этой клеточной культуре в течение 4 сут наблюдения другого представителя рода ортопоксвирусов ВВ (см. табл. 2).

Используя представленные результаты исследований, провели эксперименты по изучению чувствительности к ВНО МПКМ-МК людей (3 человека: 2 вакцинированных против натуральной оспы и 1 невакцинированный), а также уровня вирусной продукции этими клетками, рассчитанных с учетом регистрации данных через 6 сут п. з. о наличии в них вируса или величины его концентрации соответственно. Результаты приведены в табл. 3.

Несмотря на некоторую тенденцию к снижению чувствительности к ВНО моноцитов-макрофагов, полученных из крови вакцинированных оспенной вакциной людей по сравнению с таковой у невакцинированного, существенных различий между величинами ID_{50} этого вируса для моноцитов-макрофагов от 3 добровольцев выявить не удалось (см. табл. 3). Это скорее всего объясняется тем, что забор крови у вакцинированных добровольцев осуществляли через достаточно большой промежуток времени после проведенной вакцинации (1

Таблица 3

Чувствительность к штамму Ind-3a ВНО и его продуктивность для МПКМ-МК 3 человек (2 вакцинированных против натуральной оспы и 1 невакцинированный)

Показатель	Значения показателей для сыворотки и МПКМ-МК крови от 3 человек		
	1*	2**	3**
Титры противооспепных антител в реакции нейтрализации	< 1:4	1:32	> 1:256
ID_{50} ВНО, lg БОЕ ($M \pm I_{95}$, $n = 6$)	-0,13±0,41	0,03±0,33	0,03±0,33
Урожайность вируса, lg БОЕ/млн кл. ($M \pm I_{95}$, $n = 6$)	2,13±0,39	2,87±1,21	2,01±0,45

Примечание. * – человек, не вакцинированный против оспы; ** – вакцинированные против оспы; n – число проб, взятых на разведение вируса; M – среднее значение; I_{95} – 95% доверительный интервал.

и 3 года), когда у них уже отсутствовали активированные моноциты-макрофаги, которые, как известно, появляются и находятся в организме в ранние сроки после введения антигена. Отсутствие достоверных различий между значениями ID_{50} ВНО для моноцитов-макрофагов от 3 добровольцев позволило провести оценку средней величины этого показателя по измерениям, выполненным на всех этих людях ($ID_{50} = -0,02 \pm 0,23$ lg БОЕ; урожайность – $2,34 \pm 1,16$ lg БОЕ/млн кл.).

Если учесть, что основными первичными клетками-мишенями у человека для ВНО, судя по данным, полученным на модельных для ВНО животных (макака циномогус и мышь популяции ICR) [6–8], являются клетки системы мононуклеарных фагоцитов, с которых в основном и начинается инфекционный процесс при этом заболевании, наши данные позволяют оценить чувствительность людей к этому возбудителю инфекции, которая примерно соответствует 1 БОЕ ($-0,02 \pm 0,23$ lg БОЕ) при условии его беспрепятственного взаимодействия в организме человека с клетками такого типа. Следует обратить внимание на то, что результат определения чувствительности людей к ВНО на основе наших экспериментальных данных, полученных на первичных культурах клеток человека (моноцитах-макрофагах), не противоречит таковому (до 1 lg БОЕ) для самих людей, теоретически оцененному по развитию клинической картины заболевания [1, 2].

Кроме размножения ВНО в макрофагах у модельных животных (мышь популяции ICR и макака циномогус), ряд ученых [7] также отмечают репликацию вируса в их предшественниках (моноцитах крови макака циномогус), но только при внутривенном заражении этих животных огромной дозой вируса (9 lg БОЕ). Вероятно, такое размножение данного патогена в моноцитах крови человека тоже может происходить только при геморрагическом типе натуральной оспы, о чем свидетельствует регулярное обнаружение у людей вируса в существенных концентрациях в этой ткани [11–13 и др.], тогда как при обычном клиническом типе заболевания ВНО в крови практически не регистрируется [14–16 и др.]. В связи с этим скорее всего чувствительность макрофагов у человека и приматов к вирусу выше таковой их предшественника (моноцита крови). Несмотря на то что для многих ортопоксвирусных инфекций характерно размножение вируса в клетках системы мононуклеарных фагоцитов чувствительных макроорганизмов, в случае использования ВВ и МПКМ-МК человека не было зарегистрировано вируспродуктивной активности этих клеток. При выполнении аналогичной работы с данным вирусом другие ученые также не обнаружили его размножения в клетках, полученных из человеческих моноцитов [17].

Заключение

В исследованиях, проведенных на различных первичных культурах клеток, полученных из крови не вакцинированного против натуральной оспы человека, с использованием ВНО в дозах 0,001–0,021 БОЕ/кл., была отмечена положительная динамика накопления

вируса только в СПКМК и МПКМ-МК с максимальными значениями его концентраций (5,0–5,5 lg БОЕ/мл) в основном через 6 сут п. з. При этом по данным электронной микроскопии, размножение вируса наблюдалось только в моноцитах-макрофагах, присутствующих в СПКМК и МПКМ-МК. ВВ при испытанных дозах 0,002 и 0,017 БОЕ/кл. не проявлял способности к размножению в МПКМ-МК. Не было обнаружено достоверных различий между двумя вакцинированными против натуральной оспы добровольцами и одним невакцинированным по чувствительности к ВНО и вируспродуктивной активности их моноцитов-макрофагов крови. Чувствительность людей к ВНО по данным, полученным на моноцитах-макрофагах человека, соответствовала ~1 БОЕ (с учетом беспрепятственного взаимодействия вируса с клетками такого типа в организме людей), что подтверждает ранее опубликованные данные о его чувствительности к этому вирусу, теоретически оцененные с учетом развития клинической картины заболевания.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 7–9, 11–13, 16, 17 с м. REFERENCES)

1. Дроздов С.Г., Гарин Н.С., Джиндоян Л.С., Тарасенко В.М. *Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях*. М.: Медицина; 1987.
2. Огарков В.И., Гапочко К.Г. *Аэрогенная инфекция*. М.: Медицина; 1975.
3. Жуков В.А., Шишкина Л.Н., Сафатов А.С., Сергеев А.А., Пьянков О.В., Петрищенко В.А. и др. Валидация модифицированного алгоритма прогнозирования восприимчивости хозяина к вирусам с учетом параметров восприимчивости первичных культур клеток-мишеней и факторов врожденного иммунитета. *Вестник РАМН*. 2010; 5: 24–9.
4. Сергеев А.А. *Изучение репродукции вируса гриппа в первичных культурах клеток респираторных органов для прогноза его инфекционности in vivo: Дисс. ... канд. мед. наук*. Кольцово; 2008.
5. Жуков В.А., Шишкина Л.Н., Сергеев А.А., Фанкин И.В., Сметанникова М.А., Пьянков О.В. и др. Изучение возможности прогнозирования чувствительности к гриппу различных отделов респираторного тракта хозяина. *Вестник РАМН*. 2007; 5: 32–7.
6. Сергеев А.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев А.А., Таранов О.С., Титова К.А. и др. Способ оценки активности лечебно-профилактических препаратов против вируса натуральной оспы. Патент РФ № 2522483, 2014.
10. Закс Л. *Статистическое оценивание*. М.: Statistics; 1976.
14. Маренникова С.С., Щелкунов С.Н. *Патогенные для человека ортопоксвирусы*. М.: КМК Scientific Press Ltd.; 1998.
15. Бургасов П.Н., Николаевский Г.П. *Натуральная оспа*. М.: Медицина; 1972.
1. Drozdov S.G., Garin N.S., Dzhindoyan L.S., Tarasenko V.M. *Fundamentals of Safety in Microbiological and Virological Laboratories [Osnovy tekhniki bezopasnosti v mikrobiologicheskikh i virusologicheskikh laboratoriyakh]*. Moscow: Meditsina; 1987. (in Russian)
2. Ogarkov V.I., Gapochko K.G. *Aerogenic Infection [Aerogennaya infektsiya]*. Moscow: Meditsina; 1975. (in Russian)
3. Zhukov V.A., Shishkina L.N., Safatov A.S., Sergeev A.A., P'yankov O.V., Petrishchenko V.A. et al. Validation of the modified algorithm predicting host susceptibility to viruses within the parameters of the susceptibility of primary cultures of target cells and factors of innate immunity. *Vestnik RAMN*. 2010; 5: 24–9. (in Russian)
4. Sergeev A.A. *The Study of the Reproduction of Influenza Virus in Primary Cell Cultures of Respiratory Organs for the Prediction of its Infectivity in Vivo: Diss. Kol'tsovo*; 2008. (in Russian)
5. Zhukov V.A., Shishkina L.N., Sergeev A.A., Fankin I.V., Smetannikova M.A., P'yankov O.V. et al. Study of the possibility predicting sensitivity to various influenza respiratory tract of the host. *Vestnik RAMN*. 2007; 5: 32–7. (in Russian)
6. Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev A.A., Taranov O.S., Titova K.A. et al. A Method for Evaluating the Activity of Therapeutic and Prophylactic Drugs Against Smallpox Virus. Patent RF № 2522483, 2014. (in Russian)
7. Jahrling P.B., Hensley L.E., Martinez M.J., LeDuc J.W., Rubins K.H., Relman D.A. et al. Exploring the potential of variola virus infection of cynomolgus macaques as a model for human smallpox. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2004; 101 (42): 15 197–200.
8. Wahl-Jensen V., Cann J.A., Rubins K.H., Huggins J.W., Fisher R.W., Johnson A.J. et al. Progression of pathogenic events in cynomolgus macaques infected with variola virus. *PLoS One*. 2011; 6 (10): e24832.
9. Lepar-Goffart I., Poirier B., Garin D., Tissier M-H, Fuchs F., Crance J.M. Standardization of a neutralizing anti-vaccinia antibodies titration method: an essential step for titration of vaccinia immunoglobulins and smallpox vaccines evaluation. *J. Clin. Virol*. 2005; 32 (1): 47–52.
10. Zaks L. *Statistical Estimation [Statisticheskoe otsenivanie]*. Moscow: Statistika; 1976. (in Russian)
11. Downie A.W., McCarthy K., Macdonald A., MacCallum F.O., Macrae A.D. Virus and virus antigen in the blood of smallpox patients. Their significance in early diagnosis and prognosis. *Lancet*. 1953; 265 (6778): 164–6.
12. Downie A.W., Fedson D.S., St. Vincent L., Rao A.R., Kempe C.H. Haemorrhagic smallpox. *J. Hyg. (Lond.)*. 1969; 67 (4): 619–29.
13. Mitra A.C., Chatterjee S.N., Sarkar J.K., Manji P., Das A.K. Viraemia in haemorrhagic and other forms of smallpox. *J. Indian Med. Assoc.* 1966; 47 (3): 112–4.
14. Marennikova S.S., Shchelkunov S.N. *Human Pathogenic Orthopoxviruses [Patogennye dlya cheloveka ortopoksvirusy]*. Moscow: KMK Scientific Press Ltd.; 1998. (in Russian)
15. Burgasov P.N., Nikolaevskiy G.P. *Smallpox [Natrual'naya ospa]*. Moscow: Meditsina; 1972. (in Russian)
16. Rao A.R. *Smallpox. Bombay: The Kothari Book Depart.* WorldCat; 1972.
17. Drillien R., Spohner D., Bohbot A., Hanau D. Vaccinia virus-related events and phenotypic changes after infection of dendritic cells derived from human monocytes. *Virology*. 2000; 268 (2): 471–81.

Поступила 24.02.15
Принята в печать 19.03.15

Чешик С.Г., Кистенева Л.Б.

ЦИТОМЕГАЛОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ И СПОНТАННЫЕ АБОРТЫ У ЖЕНЩИН В I И II ТРИМЕСТРАХ БЕРЕМЕННОСТИ

ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»
Минздрава России, 123098, г. Москва

Целью исследования явилось определение с помощью вирусологических и сероиммунологических методов частоты инфицирования цитомегаловирусом (ЦМВ) женщин, у которых беременность завершилась спонтанным абортom, установление активных форм инфекции и прегравидарная подготовка к очередной беременности. Обследовано 116 женщин, у которых произошли спонтанные выкидыши в сроки до 28 нед беременности. Маркеры ЦМВ-инфекции (ЦМВИ) были выявлены у 109 (94%) женщин. В целом активная форма ЦМВИ установлена у 49 (42,2%) женщин: возвратная форма (реактивированная реинфекция) у 13 (26,5%) и персистирующая форма (в стадии продуктивной репликации) – у 36 (73,5%). Во всех случаях лечение активных форм ЦМВИ проводилось до наступления очередной беременности. В этих целях применялась иммуномодулирующая терапия.

Ключевые слова: цитомегаловирусная инфекция; спонтанные аборты у женщин; диагностика; лечение.

Для цитирования: Чешик С.Г., Кистенева Л.Б. Цитомегаловирусная инфекция и спонтанные аборты у женщин в I и II триместрах беременности. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (2): 74-78.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2-74-78

Cheshik S.G., Kisteneva L.B.

HUMAN CYTOMEGALOVIRUS INFECTION AND SPONTANEOUS ABORTION IN PREGNANT WOMEN OF I AND II TRIMESTER

Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya,
Moscow, 123098, Russian Federation

The goal of this work was the evaluation of the frequency of human CMV infection among the women, whose pregnancy ended in miscarriage, detection of active forms of infection and treatment before pregnancy. Virological and sero-immunological techniques were used. A total of 116 women who had miscarriages before the 28 week of pregnancy were submitted to the CMV test. 109 women (94.0%) demonstrated positive results. 49 women (42.2%) had active form of the cytomegalovirus infection. 13 women (26.5%) had the recurrent form and 36 patients (73.5%) had the persistent form of CMV infection (stage of productive replication). All the women with active CMVI were treated before the next pregnancy. Immunomodulatory therapy for the treatment was used.

Key words: human cytomegalovirus infection; spontaneous abortion in women; diagnostics; treatment.

For citation: Cheshik S.G., Kisteneva L.B. Human cytomegalovirus infection and spontaneous abortion in pregnant women of I and II trimester. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(2): 74-78. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2-74-78

For correspondence: Lidia B. Kisteneva, Doctor of Medicine, Head of the Laboratory of epidemiology, prevention and diagnosis of viral hepatitis, Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow, 123098, Russian Federation, E-mail: lidia.kisteneva@gmail.com

Information about authors:

Cheshik S.G., orcid.org/0000-0001-7639-7268

Kisteneva L.B., orcid.org/0000-0001-7336-409X

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received 23 March 2015

Accepted 28 May 2015

Невынашивание беременности является одной из важнейших проблем акушерства: частота самопроизвольных выкидышей составляет 15–20% всех беременностей, т. е. почти каждая 5-я беременность завершается спонтанным абортom [1, 2]. По данным статистического анализа за 2005–2009 гг., в Российской Федерации отмечено повышение абсолютного числа самопроизвольных прерываний беременности и их удельного веса в общем числе абортов, что оказывает

негативное влияние на демографическую ситуацию в стране [3].

Нередко факт невынашивания беременности связывают с инфекционным фактором, в частности с цитомегаловирусной инфекцией (ЦМВИ). До 92% женщин фертильного возраста в России инфицированы цитомегаловирусом (ЦМВ). Как известно, частота инфицирования женщин ЦМВ прямо коррелирует с частотой случаев внутриутробной ЦМВИ [4, 5].

Для корреспонденции: Кистенева Лидия Борисовна, д-р мед. наук, заведующая лабораторией эпидемиологии, профилактики и диагностики вирусных гепатитов, ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России Н.Ф. Гамалеи», 123098, г. Москва, E-mail: lidia.kisteneva@gmail.com

Таблица 1

Результаты обследования женщин, перенесших спонтанный аборт в I и II триместрах беременности, на маркеры ЦМВИ

Определяемые маркеры	Число обследованных	Обнаружение маркеров ЦМВИ					
		I триместр (n = 83)		II триместр (n = 33)		итого	
		абс.	% (M±m)	абс.	% (M±m)	абс.	% (M±m)
IgM анти-ЦМВ	116	10	12,0±3,6	3	9,1±5,0	13	11,2±2,9
IgG анти-ЦМВ	116	77	92,8±2,8	29	87,9±5,7	106	91,4±2,6
Ag ЦМВ в культуре клеток, зараженной кровью	116	15	18,1±4,2	5	15,2±6,2	20	17,2±3,5
Ag ЦМВ в культуре клеток, зараженной мочой	116	24	28,9±5,0	9	27,3±7,8	33	28,4±4,2
Всего...	116	79	95,2±2,3	30	90,9±5,9	109	94,0±2,2

Целью исследования явилось определение с помощью вирусологических и серологических методов частоты инфицирования вирусом цитомегалии женщин, у которых беременность завершилась спонтанным абортом, установление активных форм инфекции и прегравидарная подготовка пациенток к очередной беременности.

Материал и методы

Нами было обследовано на маркеры ЦМВИ 116 женщин, у которых произошли спонтанные выкидыши в сроки до 28 нед беременности. У 83 (71,6%) пациенток спонтанные аборт возникли в I триместре и у 33 (28,4%) – во II. У 14 (12,1%) женщин прерывание беременности произошло при сроке 22–27 нед, что в настоящее время по номенклатуре ВОЗ оценивается как очень ранние преждевременные роды.

Возраст женщин колебался от 18 до 42 лет (28,1±0,5). Изучение анамнеза показало, что 80 (69%) женщин имели генитальную патологию преимущественно воспалительного генеза. Повреждение эндометрия констатировано в 26 (22,4%) случаях (эндометрит, эндометриоз). Хроническая экстрагенитальная патология наблюдалась у 38 (32,8%) пациенток. Искусственное прерывание беременности (по желанию женщины) в анамнезе имело место в 29 (25%) случаях, в том числе повторные случаи у 8 (6,9%). Спонтанный аборт при 1-й беременности произошел у 68 (58,6%) пациенток. У 32 (27,6%) женщин спонтанному аборту предшествовало искусственное прерывание беременности и у 16 (13,8%) – роды. Все пациентки обследовались ретроспективно в течение 12 нед после самопроизвольного выкидыша.

Для верификации диагноза ЦМВИ использовали 3 группы методов:

- серологические – определение специфических антител классов IgM и IgG в сыворотке крови: непрямая иммунофлюоресценция (НИФ) или твердофазный иммуноферментный анализ (тИФА);

- вирусологические – выявление антигенов (Ag) ЦМВ в материалах от больных (неструктурного сверххраненного белка pp72 кД и структурного белка pp65) в диплоидных клетках фибробластов легких эмбриона человека, зараженных кровью или мочой обследованных пациенток (быстрый культуральный метод – БКМ) [6]. Для обнаружения Ag ЦМВ использовали смесь моноклональных антител к сверххраненному белку pp72 и раннему белку ЦМВ pp65 (ЦМВМоноСкан производства ООО “БТК Лабдиагностика”, Москва). Детекция Ag проводилась НИФ после 48-часовой инкубации [6];

- молекулярно-генетические – выявление ДНК ЦМВ в соскобах со слизистой оболочки шейки матки методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Сочетание вирусологических и серологических методов является оптимальным, так как позволяет не только диагностировать ЦМВИ, но и определять ее активность [7]. Основанием для подтверждения активной формы ЦМВИ служит факт репродукции инфекционного вируса: виремия, антигенемия, ДНКемия, изоляция ЦМВ или определение его белков (в клеточной культуре) в клинических материалах от пациенток, а также сероконверсия – выявление IgM анти-ЦМВ и низкоavidных IgG-антител у ранее серонегативных лиц, нарастание титра специфических антител класса IgG в 4 раза и более во 2-м образце парных сывороток.

Результаты и обсуждение

В результате обследования маркеры ЦМВИ были выявлены у 109 (94%) пациенток, перенесших самопроизвольный аборт, из 116 женщин (табл. 1). Существенных различий в количественном соотношении выявленных маркеров в I и II триместрах беременности не установлено. Всего IgM анти-ЦМВ выявлены у 13 (11,2%) женщин, виремия – у 20 (17,2%) и вирурия – у 33 (28,4%). IgM определялись совместно с IgG анти-ЦМВ, что позволило диагностировать возвратную форму ЦМВИ. Активная форма ЦМВИ у инфицированных ЦМВ женщин, перенесших спонтанный аборт, установлена у 49 (45%).

В соответствии с классификацией, принятой в нашей клинике, у пациенток, перенесших спонтанный аборт, были выделены 3 клинико-лабораторные формы: латентная, возвратная (реактивированная/реинфекция) и персистирующая в стадии продуктивной репликации (табл. 2). Помимо первичной инфекции, наиболее опасной является возвратная форма ЦМВИ, при которой, по нашим данным, внутриутробное инфицирование плода наблюдалось в 4 раза чаще, чем при персистирующей форме [8].

Атрибутивным признаком для выделения возвратной формы является обнаружение IgM анти-ЦМВ совместно с предшествующими IgG анти-ЦМВ при обязатель-

Таблица 2

Клинико-лабораторные формы ЦМВИ у женщин, перенесших спонтанный аборт (n = 116)

Форма инфекции	Количество женщин		Верификация формы ЦМВИ
	абс.	% (M±m)	
Возвратная (реинфекция и реактивация)	13	11,2±2,9	IgM анти-ЦМВ + IgG анти-ЦМВ + виремия и/или вирурия
Персистирующая (в стадии продуктивной репликации)	36	31,0±4,3	IgG анти-ЦМВ + виремия и/или вирурия
Латентная	60	51,7±4,6	Только IgG анти-ЦМВ

Структура спонтанных аборт у женщин в I и II триместрах беременности и формы ЦМВИ ($n = 116$)

Структура спонтанных абортов	Формы ЦМВИ						ЦМВИ не выявлена	
	возвратная		персистирующая		латентная			
I триместр, $n = 83$								
Спорадический спонтанный аборт ($n = 31$)	абс.	% ($M \pm m$)	абс.	% ($M \pm m$)	абс.	% ($M \pm m$)	абс.	% ($M \pm m$)
	4	12,1 \pm 5,7	10	30,3 \pm 8,0	19	57,6 \pm 7,1	–	–
Неразвивающаяся беременность ($n = 26$)	4	15,4 \pm 7,1	4	15,4 \pm 7,1	16	61,5 \pm 9,5	2	7,7 \pm 5,3
Привычное невынашивание беременности ($n = 24$)	2	8,3 \pm 5,6	12	50,0 \pm 10,2	8	33,4 \pm 9,6	2	8,3 \pm 5,8
II триместр, $n = 33$								
Спорадический спонтанный аборт ($n = 17$)	абс.	% ($M \pm m$)	абс.	% ($M \pm m$)	абс.	% ($M \pm m$)	абс.	% ($M \pm m$)
	3	17,6 \pm 9,5	4	23,5 \pm 10,6	8	47,1 \pm 12,5	2	11,8 \pm 8,4
Неразвивающаяся беременность ($n = 5$)	–	–	3	60,0 \pm 24,5	2	40 \pm 24,5	–	–
Привычное невынашивание беременности ($n = 11$)	–	–	3	27,3 \pm 24,1	7	63,6 \pm 15,2	1	9,1 \pm 9,1

ном выделении и других вирусных маркеров ЦМВИ. Возвратная форма включает не только реактивацию, но и реинфекцию.

В связи с некоторыми клиническими особенностями спонтанные аборты у наблюдавшихся женщин были подразделены на спорадические спонтанные аборты (50), неразвивающуюся беременность (31) и привычное невынашивание беременности (ПНБ) (35). Как видно из табл. 3, при любом виде спонтанного аборта может наблюдаться любая форма ЦМВИ, однако при спорадических спонтанных абортах в ранние сроки, включая замершую беременность, возвратная форма инфекции встречалась несколько чаще, чем при привычной потере беременности. При первичном невынашивании чаще наблюдали персистирующую ЦМВИ, при которой нередко выявляли хронический субклинический эндометрит [1, 9].

Достоверно меньшее количество латентных форм ЦМВИ при ПНБ ($p < 0,05$) можно расценить как косвенное указание на более выраженный вторичный иммунодефицит у данных пациенток. Как правило, неразвивающаяся беременность, возникшая в связи с активной ЦМВИ, не имеет склонности к повторению.

Причины спорадического спонтанного аборта разнообразны и не всегда могут быть точно установлены [1, 10]. По нашим наблюдениям, у женщин с ПНБ, как правило, уже 1-я беременность заканчивается ее прерыванием. Показано, что искусственные аборты и роды в анамнезе предшествовали спорадическим спонтанным абортам и неразвивающейся беременности у 43,2 \pm 5,5% пациенток и только у 17,1 \pm 6,4% женщин с ПНБ ($p < 0,01$). Это говорит о том, что причины или факторы, способствующие прерыванию беременности при ПРБ, имеются у значительного числа пациенток до беременности, а не формируются в процессе гестации.

В наших наблюдениях неразвивающаяся беременность установлена в 31 (26,7% всех спонтанных абортов) случае, из которых в I триместре – у 26 (83,5%) женщин. У пациенток диагностировали все формы ЦМВИ (латентная, возвратная и персистирующая), которые могли быть причастны к гибели эмбриона/плода. Неразвивающаяся беременность цитомегаловирусной природы в ранние сроки возможна в тех случаях, когда у женщины активная форма ЦМВИ уже присутствует в момент зачатия или в первые недели после него (первичная инфек-

ция, реактивация, реинфекция). Так, по нашим данным, у каждой пятой женщины зачатие происходит на фоне активной ЦМВИ.

ПНБ наблюдалось у 30,2% пациенток. В патогенезе невынашивания беременности, особенно привычной, большое значение придается хроническому эндометри-ту, протекающему обычно субклинически. Проведенные гистоморфологические исследования позволили верифицировать бессимптомно протекающий воспалительный процесс в эндометрии у 64% пациенток с невынашиванием [1, 9]. Причиной такого эндометрита является персистенция условно-патогенных микроорганизмов, выявленная в 67,7%, как и персистенция вирусных агентов (ЦМВ, вирусы простого герпеса, энтеровирусы), обнаруженная у 59,6% женщин с ПНБ [11].

Персистирующая форма ЦМВИ выявлена нами у 42,9% женщин с ПНБ. Отметим, что с увеличением количества повторных спонтанных абортов растет и частота персистирующей формы ЦМВИ. Поэтому в части случаев субклиническая форма хронического эндометрита ассоциируется с ЦМВИ. Однако имеются сомнения относительно возможности персистирующей цитомегаловирусной моноинфекции приводить к повторному выкидышу, поскольку ЦМВ свойственен, как правило, перемежающийся характер репродукции. При ПНБ причинная роль персистирующей ЦМВИ обычно проявляется при сочетании с другими этиопатогенетическими факторами, в том числе инфекционными.

В этиопатогенезе невынашивания беременности важная роль принадлежит поражению плаценты и хронической плацентарной недостаточности. Плацента является барьером на пути экзогенного инфицирования между матерью и плодом, хотя и несовершенным. Требуется около 3 нед, чтобы вирус пассировался из трофобласта в стромальные фибробласты и эндотелиальные клетки капилляров плода [12–14].

Обследование женщин с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом (ОАГА) не должно ограничиваться исследованием только на маркеры ЦМВИ [15]. Необходимо выявить и исключить другие факторы, способные влиять на репродуктивную функцию: другие генитальные инфекции, гормональный статус, алло- и аутоиммунные, тромбофилические, генетические и анатомические факторы.

Таблица 4

Препараты выбора, используемые для лечения активных форм ЦМВИ у женщин в отсутствие беременности

Препараты	Способ введения	Разовая доза	Продолжительность курса лечения
Цитотект/Неоцитотект	Внутривенно через день	10,0 мл (минимальная доза)	3 инфузии
Имуноглобулин человека нормальный для внутримышечного введения	Внутримышечно через день	4,5 мл 2 раза, затем 3,0 мл 2 раза	7 дней
Имуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения	Внутривенно через день	25,0 мл	3 инфузии
Тактивин 0,01%	Подкожно 2 раза в неделю	100 мкг	10 нед
Тималин	Внутримышечно 2 раза в неделю	10 мг	10 нед
Циклоферон 12,5%	Внутримышечно 1 раз в неделю	2,0 мл	10 нед

В наших наблюдениях более чем у половины пациенток выявлялись воспалительные заболевания генитальной сферы. Так, в генитальном тракте женщин, перенесших спонтанный аборт, обнаруживались *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, *Human herpesvirus simplex*. В результате сочетание ЦМВ с иными патогенами не всегда приводило к росту активных форм ЦМВИ, однако показано, что сочетание ЦМВ с *Ureaplasma urealyticum* сопровождалось достоверным увеличением частоты случаев персистирующей формы ЦМВИ в стадии продуктивной репликации ($p < 0,01$). Нередко ЦМВИ сочеталась с двумя и более инфекциями (18,2%), формируя вирусно-вирусные и вирусно-бактериальные ассоциации [16].

Каждый случай активной ЦМВИ у женщины должен быть рассмотрен индивидуально. В этой связи мы выделили 3 группы женщин:

- женщины, у которых причинная роль ЦМВ представлялась очевидной и, возможно, единственной – 9,5%.
- женщины, у которых ЦМВИ рассматривалась как ассоциированная, когда имелись и другие причины (например, микст-инфекция, другие факторы), – 21,6%.
- пациентки, у которых роль ЦМВИ рассматривалась как минимальная или сомнительная (ЦМВ-вирурия – 11,2% (ЦМВ-«свидетель»)).

Существенных различий в оценке роли ЦМВИ в I и II триместрах беременности не установлено. У 13,8% женщин причина спонтанных выкидышей осталась неизвестной.

Сложной проблемой остается терапия ЦМВИ. Основными средствами для лечения этой инфекции являются противовирусные химиопрепараты – ганцикловир, валганцикловир, фоскарнет, цидофовир и иммуномодулирующие средства [17, 18]. Особые трудности возникают при проведении терапии у женщин фертильного возраста и беременных, так как в ходе лечебных мероприятий у них необходимо соблюдать повышенные требования

безопасности, чтобы исключить риск нежелательных явлений. В этой связи противовирусные химиопрепараты не могут быть применены у этих женщин из-за их высокой токсичности и непредсказуемых последствий для детородной функции. Поэтому вполне оправданы поиск и клиническое исследование средств для иммунокорректирующей терапии, способствующей подавлению или смягчению активности инфекции.

Целью иммунокорректирующей терапии является улучшение иммунного ответа и постепенное снижение вирусной репликации, так что последняя может быть контролируема иммунной системой хозяина.

Только женщины, у которых обнаруживается инфекционный вирион в крови, моче или шейке матки, подлежат лечению. Основная цель такого лечения состоит в том, чтобы подготовить женщину к будущей беременности и обеспечить зачатие в условиях латентной ЦМВИ и благоприятное течение беременности в I триместре, когда активизация ЦМВИ представляет наибольшую опасность для эмбриона.

Препараты, использовавшиеся нами для лечения активных форм ЦМВИ у женщин репродуктивного возраста в отсутствие беременности, представлены в табл. 4.

Учитывая снижение активности Т-клеточного звена иммунитета, для лечения активной ЦМВИ у женщин в отсутствие беременности был использован препарат тактивин, в котором представлены олигопептиды вилочковой железы. По завершении курса лечения тактивин проводили контрольное обследование на маркеры ЦМВИ. Положительные результаты лечения с прекращением ЦМВ-виремии, вирурии и элиминации IgM анти-ЦМВ из крови после первого курса лечения были достигнуты у 71,2% лечившихся. Тактивин переносился хорошо, но имели место отдельные аллергические реакции.

Необходимо отметить, что, хотя показатели эффективности при применении перечисленных средств не имели достоверных различий, наиболее высокие позитивные результаты были зафиксированы в случае применения виферона в сочетании с нормальным иммуноглобулином человека. Сочетанное применение нормального иммуноглобулина человека для внутримышечного введения с противовирусным и иммуномодулирующим рекомбинантным интерфероном $\alpha 2\beta$ было проведено у 74 женщин с ОАГА и активной ЦМВИ. При контрольном обследовании установлено, что трансформация реактивированной формы в латентную произошло у 29 (93,5%) лечившихся, а персистирующая форма трансформировалась в латентную у 34 (70,8%). В целом представленные средства иммунокорректирующей терапии можно рассматривать как препараты выбора.

Допустимость очередной беременности обсуждалась с женщиной в зависимости от результатов лечения, она разрешалась при ликвидации активности ЦМВИ, установлении латентной формы инфекции.

Основной вывод, вытекающий из наших наблюдений, состоит в том, что лечение активных форм ЦМВИ у женщин с невынашиванием беременности является одним из резервов уменьшения частоты акушерской патологии и перинатальных осложнений и в конечном счете улучшения демографической ситуации. Считаем, что простейшим скрининговым тестом на ЦМВИ могло бы явиться определение специфических антител классов IgM и IgG.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 7, 12–14, 16, 18 см. REFERENCES)

1. Радзинский В.Е., Димитрова В.И., Майскова И.Ю. *Неразвивающаяся беременность*. М.; 2009.
2. Сидельникова В.М. Невынашивание беременности – современный взгляд на проблему. *Российский вестник акушера-гинеколога*. 2007; 2: 62–4.
3. Шувалова М.Т., Волгина Л.Ф., Протопопова Т.А., Чаусов А.А., Суханова Л.П. Сравнительный анализ аборт в Российской Федерации и регионах. *Акушерство и гинекология*. 2011; 4: 85–8.
4. Исаков В.А., Рыбалкин С.Б., Романцев М.Г. *Герпесвирусная инфекция*. СПб.; 2006.
5. Баринский И.Ф., Махмудов Ф.Р. *Герпес*. Баку: «Victory»; 2013.
6. МР № 02.030-08. *Быстрый культуральный метод диагностики герпесвирусных инфекций: Методические рекомендации*. М.: Роспотребнадзор; 2008.
8. Чешик С.Г., Кистенева Л.Б., Стаханова В.М., Шараров Б.У., Малышев Н.А. Диагностика и лечение цитомегаловирусной инфекции у беременных женщин. *Инфекционные болезни*. 2005; 3 (2): 31–6.
9. Стрижаков А.Н., Игнатко И.В. *Потеря беременности*. М.; 2007.
10. Подзолкова Н.М., Скворцова М.Ю., Шевелева Т.В. *Невынашивание беременности*. М.; 2012.
11. Стрижаков А.Н., Каграманова Ж.А., Сускова В.С., Выжлова Е.Н. Урогенитальные инфекции и иммунозаместительная терапия. *Вестник Ферона*. 2013; 2: 19–24.
15. Климова Р.Р., Малиновская В.В., Паршина В.В., Гусева Т.С., Новикова С.В., Торшина З.В. и др. Влияние вирусных инфекций на цитокиновый профиль у беременных женщин с отягощенным акушерским анамнезом и иммунокорректирующая терапия интерфероном альфа2В человека. *Вопросы вирусологии*. 2013; 58 (1): 18–23.
17. Ершов Ф.И., Киселев О.И. *Интерфероны и индукторы (от молекул до лекарств)*. М.: ГЭОТАР-медиа; 2005.

REFERENCES

1. Radzinskiy V.E., Dimitrova V.I., Mayskova I.Yu. *Missed Miscarriage [Nerazvivayushchayaya beremennost']*. Moscow; 2009. (in Russian)
2. Sidel'nikova V.M. Miscarriage – a modern perspective on the issue. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa*. 2007; 2: 62–4. (in Russian)
3. Shuvalova M.T., Volgina L.F., Protopopova T.A., Chausov A.A., Sukhanova L.P. Comparative study of miscarriages in the Russian Federation and regions. *Akusherstvo i ginekologiya*. 2011; 4: 85–8. (in Russian)

4. Isakov V.A., Rybalkin S.B., Romantsev M.G. *Herpes Virus Infection [Herpesvirusnaya infektsiya]*. St.Petersburg; 2006. (in Russian)
5. Barinskiy I.F., Makhmudov F.R. *Herpes Virus [Gerpes]*. Baku: "Victory"; 2013. (in Russian)
6. МР № 02.030-08. *A quick cultural method used for diagnosis of herpesviruses: methodological recommendations*. Moscow: Rospotrebnadzor; 2008. (in Russian)
7. Revello M.G., Gerna G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus and newborn infant. *Clin. Microbiol. Rev.* 2002; 15 (4): 680–715.
8. Cheshik S.G., Kisteneva L.B., Stakhanova V.M., Sharapov B.U., Malyshev N.A. Diagnosis and therapy of cytomegalovirus (CMV) infection in pregnancy. *Infektsionnye bolezni*. 2005; 3 (2): 31–6. (in Russian)
9. Strizhakov A.N., Ignatko I.V. *Miscarriage [Poterya Beremennosti]*. Moscow; 2007. (in Russian)
10. Podzolkova N.M., Skvortsova M.Yu., Sheveleva T.V. *Pabitual Abortion [Nevynashivanie beremennosti]*. Moscow; 2012. (in Russian)
11. Strizhakov A.N., Kagrananov Zh.A., Suskova V.S., Vyzhlova E.N. Urogenital infection and immunosupportive therapy. *Vestnik Ferona*. 2013; 2: 19–24. (in Russian)
12. Gabrielli L., Losi L., Varani S., Lazzarotto T., Eusebi V., Landini M.P. Complete replication of human cytomegalovirus in explants of first trimester human placenta. *J. Med. Virol.* 2001; 64 (4): 499–504.
12. La Torre R., Nigro G., Mazzoco M., Best A.M., Adler S.P. Placental enlargement in women with primary maternal cytomegalovirus infection is associated with fetal and neonatal disease. *Clin. Infect. Dis.* 2006; 43 (8): 994–1000.
14. Schleiss M.R. The role of the placenta in the pathogenesis of congenital cytomegalovirus infection. Is the benefit of cytomegalovirus immune globuline for the newborn mediated through improved placental health and function? *Clin. Infect. Dis.* 2006; 43: 1001–3.
15. Klimova R.R., Malinovskaya V.V., Parshina V.V., Guseva T.S., Novikova S.V., Torshina Z.V. et al. The influence of viral infections on cytokine profile among pregnant women with positive obstetric history and immunocorrection therapy using interferon alpha-2V person. *Voprosy virusologii*. 2013; 58 (1): 18–23. (in Russian)
16. Andreoni K.A., Wang X., Huang S.M., Huang E.S. Human cytomegalovirus hyperimmune globulin not only neutralizes HCMV infectivity, but also inhibits HCMV-induced intracellular NF-kappaB, Sp1 and signaling pathways. *J. Med. Virol.* 2002; 67 (1): 33–40.
17. Ershov F.I., Kiselev O.I. *Interferons and Inductors (from molecules to drugs) [Interferony i induktory (ot molekul do lekarstv)]*. Moscow: GEOTAR-media; 2005. (in Russian)
18. Mercorelli B., Sinigalia E., Loregian A., Palù G. Human cytomegalovirus DNA replication: antiviral targets and drugs. *Rev. Med. Virol.* 2008; 18 (3): 177–210.

Поступила 23.03.15
Принята в печать 28.05.15

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 615.281.8.03:578.821.5].076.9.036.8

Титова К.А.¹, Сергеев Ал.А.¹, Кабанов А.С.¹, Булычев Л.Е.¹, Сергеев Ар.А.¹, Галахова Д.О.¹, Шишкина Л.Н.¹, Замедянская А.С.¹, Нестеров А.Е.¹, Глотов А.Г.², Таранов О. С.¹, Омигов В.В.¹, Агафонов А.П.¹, Сергеев А.Н.¹

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДЕЛИ МЫШЬ ICR – ВИРУС НАТУРАЛЬНОЙ ОСПЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ПРЕПАРАТОВ

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор"», 630559, пос. Кольцово, Новосибирская область;

²ГНУ «Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока» Российской академии сельскохозяйственных наук, 630501, пос. Краснообск, Новосибирская область

Мышей аутбредной популяции ICR интраназально (и/н) заражали вирусом натуральной оспы (ВНО, штамм Ind-3a). Клинические признаки заболевания не появлялись даже при использовании максимально возможной дозы вируса 5,2 lg бляшкообразующих единиц (БОЕ). При этом 50% инфицирующая доза (ИД₅₀) ВНО, оцениваемая по наличию или отсутствию вируса в легких через 3 сут после заражения (п. з.), была равна 2,7±0,4 lg БОЕ, что с учетом его 10% аппликации в легких при и/н введении соответствовало 1,7 lg БОЕ. Это свидетельствует о высокой инфекционности ВНО для мышей, сравнимой с его инфекционностью для человека. После и/н заражения мышей ВНО в дозе 30 ИД₅₀ наиболее высокие концентрации вируса обнаружены в легких (4,9 lg БОЕ/мл гомогената) и тканях носовой полости (4,8 lg БОЕ/мл). Патоморфологические изменения в респираторных органах инфицированных ВНО мышей появлялись через 3–5 сут п. з., а размножение ВНО отмечено в эпителиоцитах и макрофагах. При пероральном введении препаратов ST-246 и НИОХ-14 в дозе 60 мкг на 1 г массы мыши за 1 сут до заражения, через 2 ч, 1 и 2 сут п. з. продукция ВНО в легких через 3 сут п. з. снижалась в 10 раз. Таким образом, аутбредных мышей ICR, инфицированных ВНО, можно использовать в качестве лабораторной модели натуральной оспы при оценке лечебно-профилактической эффективности противооспых препаратов.

Ключевые слова: вирус натуральной оспы; мышь; интраназальное заражение; размножение вируса; патоморфологические изменения; модельное животное.

Для цитирования: Титова К.А., Сергеев Ал.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев Ар.А., Галахова Д.О., Шишкина Л.Н., Замедянская А.С., Нестеров А.Е., Глотов А.Г., Таранов О. С., Омигов В.В., Агафонов А.П., Сергеев А.Н. Использование модели мышь ICR – вирус натуральной оспы для оценки эффективности противовирусных препаратов. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (2):79-84.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2-79-84

Titova K.A.¹, Sergeev Al.A.¹, Kabanov A.S.¹, Bulychev L.E.¹, Sergeev Ar.A.¹, Galakhova D.O.¹, Shishkina L.N.¹, Zamedyanskaya A.S.¹, Nesterov A.E.¹, Glotov A.G.², Taranov O.S.¹, Omigov V.V.¹, Agafonov A.P.¹, Sergeev A.N.¹

THE USE OF THE MODEL MOUSE ICR – VARIOLA VIRUS FOR EVALUATION OF ANTIVIRAL DRUG EFFICACY

¹State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russian Federation; ²Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East, Krasnoobsk, Novosibirsk region, 630501, Russian Federation

Mice of the ICR outbred population were infected intranasally (i/n) with the variola virus (VARV, strain Ind-3a). Clinical signs of the disease did not appear even at the maximum possible dose of the virus 5.2 lg PFU/head (plaque-forming units per head). In this case, 50% infective dose (ID50) of VARV estimated by the presence or absence of the virus in the lungs three days after infection (p.i.) was equal to 2.7 ± 0.4 lg PFU/head. Taking into account the 10% application of the virus in the lungs during the intranasal infection of the mice, it was adequate to 1.7 lg PFU/lungs. This indicates a high infectivity of the VARV for mice comparable to its infectivity for humans. After the i/n infection of mice with the VARV at a dose 30 ID50/head the highest concentration of the virus detected in the lungs (4.9 ± 0.0 lg PFU/ml of homogenate) and in nasal cavity tissues (4.8 ± 0.0 lg PFU/ml) were observed. The pathomorphological changes in the respiratory organs of the mice infected with the VARV appeared at 3-5 days p.i., and the VARV reproduction noted in the epithelial cells and macrophages were noticed. When the preparations ST-246 and NIOCH-14 were administered orally at a dose of 60 µg/g of mouse weight up to one day before infection, after 2 hours, 1 and 2 days p.i., the VARV reproduction in the lungs after 3 days p.i. decreased by an order of magnitude. Thus, outbred ICR mice infected with the VARV can be used as a laboratory model of the smallpox when evaluating the therapeutic and prophylactic efficacy of the antimallpox drugs.

Key words: variola virus; mouse; intranasal infection; virus reproduction; pathomorphological damages; model animal.

For citation: Titova K.A., Sergeev Al.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev Ar.A., Galakhova D.O., Shishkina L.N., Zamedyanskaya A.S., Nesterov A.E., Glotov A.G., Taranov O.S., Omigov V.V., Agafonov A.P., Sergeev A.N. The use of the model mouse ICR – variola virus for evaluation of antiviral drug efficacy. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(2): 79-84. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2-79-84

For correspondence: Kseniya A. Titova, Junior research scientist, State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", Koltsovo, Novosibirsk region, 630559, Russian Federation, E-mail: titova_ka@vector.nsc.ru

Для корреспонденции: Титова Ксения Александровна, младший научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор»@», 630559, пос. Кольцово, Новосибирская область, E-mail: titova_ka@vector.nsc.ru

Information about authors:

Titova K.A., <http://orcid.org/0000-0001-8764-9408>
Sergeev A.I.A., <http://orcid.org/0000-0001-8355-5551>
Kabanov A.S., <http://orcid.org/0000-0002-6287-0912>
Bulychev L.Ye., <http://orcid.org/0000-0001-9598-7327>
Sergeev Ar.A., <http://orcid.org/0000-0002-3591-1571>
Galahova D.O., <http://orcid.org/0000-0002-7801-4141>
Shishkina L.N., <http://orcid.org/0000-0002-8264-0217>
Zamedyanskaya A.S., <http://orcid.org/0000-0002-1177-2693>
Nesterov A.E., <http://orcid.org/0000-0001-7943-3287>
Glotov A.G., <http://orcid.org/0000-0002-2006-0196>
Taranov O.S., <http://orcid.org/0000-0002-6746-8092>
Omigov V.V., <http://orcid.org/0000-0002-2028-6099>
Agafonov A.P., <http://orcid.org/0000-0003-2577-0434>
Sergeev A.N., <http://orcid.org/0000-0001-5984-8776>

Funding. This scientific work was carried out with the financial support of the State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector" and the Ministry of Education and Science (State contract № 14.518.11.7035).

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

Received 17 February 2015

Accepted 19 March 2015

Для оценки эффективности действия разрабатываемых противовирусных препаратов на этапах научно-исследовательской работы и доклинических исследований по требованиям национальных органов контроля крайне важно иметь не менее двух видов животных, моделирующих соответствующее инфекционное заболевание у человека. Что касается вируса натуральной оспы (ВНО), до настоящего времени подобран лишь 1 вид такого животного – макака циномогус (*Macaca fascicularis*, синоним – *M. irus*) [1–3]. Однако использование данного модельного животного в вирусологических экспериментах является крайне дорогостоящим и трудоемким.

Ранее нами было обнаружено, что первичные суспензионные культуры клеток легких, полученные от аутбредных мышей ICR, чувствительны к ВНО и способны продуцировать его *in vitro* [4]. Кроме того, уже установлено, что 10–14-суточных аутбредных мышей ICR, инфицированных вирусом оспы обезьян (ВОО), по своей структуре и свойствам наиболее близким к ВНО, можно использовать в качестве лабораторной модели при оценке лечебно-профилактической эффективности препаратов против оспы обезьян [5, 6]. Однако в отношении мышей, инфицированных ВНО, подобные исследования не проводились.

В связи с этим целью настоящих исследований явилось изучение возможности использования мышей аутбредной популяции ICR в качестве животных – моделей натуральной оспы для оценки эффективности противовирусных препаратов.

Материал и методы

Все эксперименты были проведены в лаборатории с максимальным уровнем биологической защиты (BSL-4) с использованием изолирующих пневмокостюмов на базе ГНЦ ВБ «Вектор» (Россия).

Животные. В экспериментах использовали мышей аутбредной популяции ICR: 10–14-суточных (массой 8–10 г) и 30–35-суточных (массой 18–20 г), полученных из питомника ГНЦ ВБ «Вектор». При выполнении исследований соблюдали «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» и требования по гуманному содержанию и использованию лабораторных животных [7]. Эвтаназию мышей осуществляли методом цервикальной дислокации и после этого извлекали органы и ткани (носовая перегородка,

головной мозг, трахея, лимфоузлы, легкие, пищевод, печень, селезенка, поджелудочная железа, двенадцатиперстная кишка, почки, надпочечники, кожа) для вирусологических и микроскопических исследований.

Вирус. В работе использовали штамм Ind-3a ВНО, полученный из Государственной коллекции вирусов и риккетсий ГНЦ ВБ «Вектор» (пос. Кольцово, Новосибирская область), наработанный в культуре клеток Vero. Концентрацию вируса в культуральной жидкости определяли методом подсчета количества бляшек при титровании в клетках Vero, рассчитывали и выражали в десятичных логарифмах бляшкообразующих единиц в 1 мл (lg БОЕ/мл) [8]. Концентрация вируса в использованных для работы образцах составляла $6,7 \pm 0,1$ lg БОЕ/мл.

Инфицирование мышей ВНО. После ингаляционного наркоза диэтиловым эфиром аутбредным мышам ICR (массой 8–10 г) интраназально (и/н) вводили вирусосодержащую жидкость в объеме 0,03 мл суммарно в обе ноздри, используя для заражения различные дозы ВНО (1,2, 2,2, 3,2, 4,2 и 5,2 lg БОЕ, по 6 животных на дозу). Используя данные о наличии и отсутствии ВНО в легких через 3 сут после заражения (п. з.), рассчитывали 50% инфицирующую дозу (ID_{50}) ВНО для мышей.

Введение химических соединений при инфицировании мышей ВНО. В работе использовали химические соединения с установленной антиортопоксвирусной активностью [9, 10]: НИОХ-14 (7-[N'-(4-трифторметилбензоил)-гидразинокарбонил]-трицикло[3.2.2.0^{2,4}]нон-8-ен-6-карбоновая кислота) и ST-246 (4-трифторметил-N-(3,3a,4,4a,5,5a,6,6a-октагидро-1,3-диоксо-4,6-этенциклопроп[*f*]изоиндол-2 (1H)-ил)-бензамид), синтезированные для исследования [9] по описанной методике [10]. Мышам перорально вводили по 0,2 мл суспензии этих соединений в дозе 60 мкг на 1 г массы мыши ежедневно однократно за 1 сут до заражения, через 2 ч, 1 и 2 сут п. з. ВНО. В качестве плацебо вводили 0,2 мл раствора, содержащего 0,75% метилцеллюлозы и 1% твина-80, использованного для приготовления суспензии препаратов НИОХ и ST-246.

Определение титров ВНО в органах и тканях инфицированных мышей. При исследовании диссеминации ВНО в организме мышей определяли его концентрацию (в lg БОЕ/мл) в сыворотке и клетках крови, а также в 10% гомогенатах органов через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 10 сут п. з. В экспериментах по оценке противовирусной эффективности препаратов определяли количество ВНО в

легких (в lg БОЕ/легкие) через 3 сут п. з. в контрольной группе мышей и при введении препаратов. Во всех случаях использовали метод подсчета количества блюшек при внесении последовательных разведений образцов на монослой культуры клеток Vero [8]. Минимальное количество вируса, которое могло быть выявлено при использованном методе титрования, составляло 0,4 lg БОЕ/мл и 1,1 lg БОЕ/легкие.

Получение и инфицирование ВНО первичных монослойных культур моноцитов-макрофагов (Мц-Мф) селезенки мышей. Для получения монослоя Мц-Мф использовали гомогенаты селезенки интактных мышей аутбредной популяции ICR массой 18–20 г. Суспензию спленоцитов инкубировали в течение 24 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 80 мкг/мл гентамицина, в 24-луночных плоскодонных планшетах. Затем после двукратного отмывания средой RPMI-1640 оставшиеся адгезированные Мц-Мф инфицировали ВНО при множественности заражения 0,017 БОЕ/кл. и культивировали в течение 3 сут в среде RPMI-1640 с 2% сыворотки при прочих описанных выше условиях. После этого монослой клеток отмывали, снимали резиновым полисменом и готовили образцы для электронно-микроскопического исследования.

Микроскопические исследования. Для световой микроскопии образцы органов и тканей мышей фиксировали в 4% растворе параформальдегида, готовили парафиновые срезы и окрашивали гематоксилином и эозином. Для электронно-микроскопического исследования образцов прибегали к дополнительной фиксации 1% раствором осмиевой кислоты, ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца. Микроскопические исследования и микрофото съемку проводили с использованием светооптического микроскопа Imager Z1 («Zeiss», Германия) и электронного микроскопа JEM 1400 («Jeol», Япония).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку и сравнение результатов осуществляли стандартными методами [11] с помощью пакета компьютерных программ Statistica 6.0 («StatSoft Inc.». 1984–2001) с оценкой достоверности различий ($p \leq 0,05$) для 95% доверительного уровня (I_{95}). ИД₅₀ рассчитывали по формуле Спирмена–Кербера. Сравнение доли инфицированных животных в группах проводили по критерию χ^2 , для сравнения титров ВНО в легких использовали U -критерий Манна–Уитни и t -критерий Стьюдента [11].

Результаты и обсуждение

Было установлено, что и/н введение ВНО даже в максимально возможной дозе, равной 5,2 lg БОЕ, 10–14-суточным аутбредным мышам ICR (массой 8–10 г) не вызвало у них появления каких-либо внешних клинических признаков заболевания.

В экспериментах, касающихся определения чувствительности мы-

шей к ВНО, сначала провели изучение динамики накопления вируса в легких при и/н заражении ВНО в дозе 4,2 lg БОЕ, используя по 3 животных на каждую временную точку. При этом через 5–10 мин п. з. в легких находилось 3,2±0,3 lg БОЕ/легкие, через 1 сут п.з. – 3,2±0,3 lg БОЕ/легкие, через 2 сут – 4,8±0,3 lg БОЕ/легкие, через 3 сут – 4,4±0,4 lg БОЕ/легкие, через 4 сут – 4,5±0,4 lg БОЕ/легкие, через 5 сут – 3,5±0,3 lg БОЕ/легкие и через 7 сут – 2,3±0,4 lg БОЕ/легкие. Из полученных данных видно, что наиболее высокие уровни накопления ВНО в легких мышей наблюдались через 2 и 3 сут п. з.

Следует особо отметить, что при использованном нами и/н способе заражения мышей только 10% вводимого вирусного материала попадало в легкие, поскольку и/н инфицирующая доза вируса была равна 4,2 lg БОЕ, а его количество в легких через 5–10 мин п. з. составило всего 3,2 lg БОЕ.

Учитывая предыдущие результаты, на следующем этапе работы оценивали ИД₅₀ ВНО по его наличию или отсутствию в легких мышей через 3 сут п. з. При этом определено, что значение этого показателя равно 2,7±0,4 lg БОЕ. Однако с учетом 10% аппликации вируса в легких при и/н заражении ИД₅₀ ВНО для мышей может быть на 1,0 lg ниже и составлять 1,7±0,4 lg БОЕ. Это свидетельствует о достаточно высокой чувствительности данного вида животных к ВНО только с учетом развития инфекционного процесса в организме без появления клинических признаков заболевания, приближающейся к таковой у человека, а именно до 1,0 lg жизнеспособных вирусных частиц, вызывающих развитие и инфекционного процесса, и клинических признаков заболевания [12].

В дальнейшем изучали динамику диссеминации ВНО в органах и тканях мышей через 1, 2, 3, 4, 5, 7 и 10 сут после и/н инфицирования в дозе 4,2 lg БОЕ (30 ИД₅₀). Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Динамика накопления штамма Ind-3a ВНО в органах, тканях и сыворотке крови мышей, интраназально инфицированных дозой 4,2 lg БОЕ (30 ИД₅₀)

Органы и ткани* мышей (n = 4)	Концентрация ВНО, lg БОЕ/мл, M±I ₉₅ , в органах и тканях мышей в разные сроки после заражения, сут							
	1	2	3	4	5	6	7	10
Клетки крови	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Сыворотка крови	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Головной мозг	< 0,4	< 0,4	1,3±0,6	< 0,4	2,2±0,3	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Носовая перегородка со слизистой оболочкой	< 0,4	4,8±0,3	3,9±0,3	3,9±0,2	3,0±0,4	2,9±0,2	4,2±0,3	< 0,4
Трахея	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Легкие	2,7±0,3	4,6±0,4	4,1±0,4	3,7±0,3	3,1±0,3	3,2±0,4	2,0±0,3	< 0,4
Пищевод	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Печень	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Селезенка	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Почки	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4
Двенадцатиперстная кишка	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4	< 0,4

Примечание. * – 4% гомогенаты органов, клетки и сыворотка крови; < 0,4 – величина ниже порога чувствительности (0,4 lg БОЕ/мл) использованного метода титрования ВНО. Здесь и в табл. 2: n – число мышей, взятых на временную точку; M – среднее.

Противовирусная активность препаратов в отношении штамма Ind-3a ВНО через 3 сут после и/н заражения аутбредных мышей ICR дозой 4,2 Ig БОЕ (30 ИД₅₀)

Показатель	Показатели инфекционности ВНО у мышей при введении препаратов в суточной дозе 60 мкг/г и в контроле		
	НИОХ-14	ST-246	контроль*
Количество вируса в легких у каждой мыши через 3 сут после и/н заражения, Ig БОЕ/легкие	2,4	2,5	4,5
	2,5	2,3	4,5
	2,1	2,3	4,4
	< 1,1	< 1,1	3,5
	< 1,1	< 1,1	2,8
	< 1,1	< 1,1	2,7
	< 1,1	< 1,1	2,7
Среднее количество вируса в легких мышей через 3 сут п. з., Ig БОЕ/легкие, $M \pm I_{95}$	2,3±0,5** (n = 3)	2,4±0,3** (n = 3)	3,6±0,8 (n = 7)
ИПП вируса в легких инфицированных мышей, Ig	1,3	1,2	–
Количество и доля (в %) инфицированных мышей через 3 сут п. з.	3 (43)#	3 (43)#	7 (100)
КЗ от инфицирования, %	57	57	–

Примечание. * – в контроле вводили раствор метилцеллюлозы с твином-80; < 1,1 – величина ниже порога чувствительности (1,1 Ig БОЕ/легкие) использованного метода титрования ВНО; ** – достоверное отличие от контроля по *t*-критерию Стьюдента и *U*-критерию Манна–Уитни ($p < 0,05$); # – достоверное отличие от контроля по критерию χ^2 ($p = 0,018$ с поправкой Йетса $p = 0,076$); ИПП – индекс подавления продукции = среднее количество вируса в легких контрольной группы – среднее количество вируса в легких опытной группы; КЗ – коэффициент защиты = % инфицированных животных в контроле – % инфицированных животных в опыте.

Из табл. 1 видно, что в легких ВНО зарегистрирован через 1 сут п. з. Затем через 2 сут п. з. он был обнаружен в высоких концентрациях в легких и носовой перегородке со слизистой оболочкой, но к 10-м суткам п. з. вирус не удалось выявить в этих биоматериалах с помощью использованного метода титрования. Через 3 и 5 сут п. з. ВНО присутствовал в относительно низких концентрациях в головном мозге мышей. При этом во все сроки исследования от 1 до 10 сут п. з. вирус вообще не выявлялся в клетках и сыворотке крови, трахее, пищеводе, печени, селезенке, почках и двенадцатиперстной кишке (см. табл. 1). Самая высокая концентрация ВНО зарегистрирована в легких и носовой перегородке со слизистой оболочкой через 2 сут п. з. (см. табл. 1). Несмотря на то что концентрация ВНО в крови мышей на протяжении всего исследования была ниже предела обнаружения вируса при использованном нами методе титрования, его присутствие в системе кровообращения в низких концентрациях вполне возможно. Поэтому спорадическое появление ВНО в головном мозге (см. табл. 1) может быть вызвано его проникновением через гематоэнцефалический барьер. Также не исключена возможность его поступления в этот орган через обонятельный тракт. Снижение концентрации ВНО до неопределяемых величин в легких и носовой перегородке через 10 сут п. з., вероятно, обусловлено действием факторов иммунного ответа мышей.

Далее было обнаружено, что через 3–5 сут п. з. появлялись патоморфологические изменения в тканях и клетках легких, носовой полости и головного мозга мышей, инфицированных ВНО в дозе 30 ИД₅₀ (см. рисунок, а–г). При этом у мышей, как и у некоторых других животных, моделирующих ортопоксвирусные инфекции у человека, наблюдались в общем виде сходные патоморфологические изменения в органах [13–15]. Более того, размножение вируса отмечено не только в эпителиоцитах и макрофагах органов респираторного тракта мышей, инфицированных ВНО *in vivo*, но и в первичной культуре селезеночных мышечных Мц-Мф при их непосредственном заражении ВНО *in vitro* (см. рисунок, д, е). При этом морфологические характеристики репродукции ВНО в чувствительных клетках

аутбредных мышей ICR соответствовали таковым ортопоксвирусов, описанным в научной литературе [13–15].

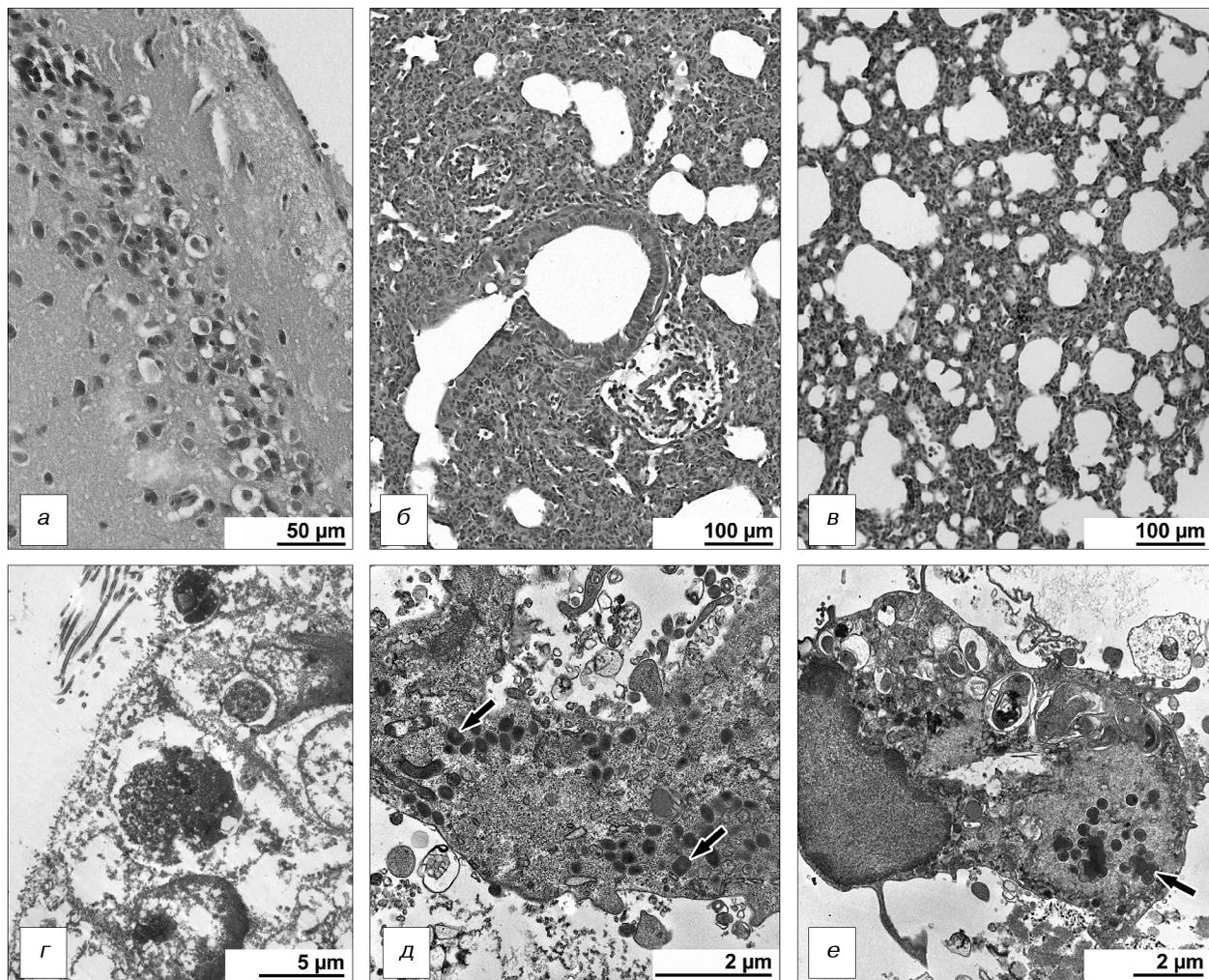
В следующей серии экспериментов оценивали лечебно-профилактическую эффективность препаратов ST-246 и НИОХ-14 у мышей, и/н инфицированных ВНО в дозе 30 ИД₅₀. Результаты этих исследований представлены в табл. 2. Отмечено, что количество инфицированных мышей, обработанных препаратами ST-246 и НИОХ-14 и зараженных ВНО, через 3 сут п. з. достоверно ($p \leq 0,05$) меньше, чем в контроле. Кроме того, используемые препараты уменьшали продукцию ВНО в легких мышей через 3 сут п. з. по сравнению с контролем.

Эксперименты по оценке эффективности противооспенного действия ST-246 и НИОХ-14 ранее проводились и другими исследователями с использованием культур клеток и разных видов животных [16–18]. Результаты данных исследований совпадают с нашими данными об эффективности этих препаратов в отношении ортопоксвирусов, в том числе ВНО.

Анализ полученных нами и описанных в научной литературе показателей активности противовирусных средств, действие которых, как правило, направлено на уменьшение взаимодействия вируса с клетками органов-мишеней и/или развития инфекционного процесса, позволяет рекомендовать использование мышей аутбредной популяции ICR в качестве животных – моделей натуральной оспы с целью оценки эффективности противооспенных препаратов.

Заключение

При и/н заражении ВНО аутбредных мышей ICR даже в максимально возможной дозе, равной 5,2 Ig БОЕ, не было обнаружено клинических признаков заболевания. ИД₅₀ ВНО для мышей, оцениваемая по наличию или отсутствию вируса в легких через 3 сут п. з., с учетом 10% аппликации в легких вводимого и/н вируса равна 1,7 Ig БОЕ/легкие и сравнима с таковой у человека, полученной теоретическим путем по данным регистрации клинической картины заболевания. У мышей, и/н зараженных ВНО в дозе 30 ИД₅₀, обнаружено размножение вируса в легких и носовой полости с максимальными значениями



Внутренние органы мышей аутбредной популяции ICR с патологическими изменениями через 3 и 5 сут после и/н заражения штаммом Ind-3a ВНО в дозе 30 ИД₅₀, а также первичная культура моноцитов-макрофагов селезенки мышей этой же популяции с репликацией ВНО через 3 сут п. з. в дозе 0,017 БОЕ/кл.

a–в – гистологические препараты головного мозга и легких (окраска гематоксилином и эозином): *a* – нейроны пирамидного слоя головного мозга с локальными дистрофическими изменениями: клетки в состоянии баллонной дистрофии, межклеточные промежутки в разной степени расширены (5 сут п. з.); *б* – паренхима легких с резко выраженной воспалительной инфильтрацией, преобладанием ателектазов и интенсивным периваскулярным отеком (3 сут п. з.); *в* – в легких интенсивный диффузный отек, ателектазы и дистелектазы, формирующие картину неравномерного воздухонаполнения альвеол, большая часть легких в спавшемся состоянии (5 сут п. з.); *г–е* – электронограммы слизистой оболочки носа и селезеночных моноцитов-макрофагов (контрастирование уранилацетатом и цитратом свинца): *г* – эпителий слизистой оболочки носовой полости с дистрофическими изменениями (5 сут п. з.): утрата ресничек и вакуолизация цитоплазмы эпителиоцитов; *д* – клетки первичной культуры моноцитов-макрофагов селезенки с признаками репродукции вируса: зрелые внутриклеточные оболочечные вирионы (стрелки) в цитоплазме макрофага; *е* – макрофаг, в цитоплазме которого присутствует крупная вирусная фабрика (стрелка), содержащая незрелые вирусные частицы.

его концентрации 4,8–4,9 Ig БОЕ/мл. При этом у мышей, как и у человека, выявлены сходные патоморфологические изменения в легких и первичные клетки-мишени для ВНО (макрофаги и эпителиоциты). Показано, что аутбредных мышей ICR, инфицированных ВНО, можно использовать в качестве лабораторной модели натуральной оспы при оценке лечебно-профилактической эффективности противооспепных препаратов.

Финансовая поддержка. Данная научная работа проведена при финансовой поддержке ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» и Министерства образования и науки РФ (Государственный контракт №14.518.11.7035).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–3, 8, 10, 13–15, 17–18 см. REFERENCES)

- Сергеев А.А., Булычев Л.Е., Пьянков О.В., Сергеев А.А., Кабанов А.С., Боднев С.А. и др. Поиск модельного животного для изучения эффективности противооспепных препаратов. В кн.: *Гигиенические аспекты в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия человека*. Новосибирск; 2012: 356–64.
- Сергеев А.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Пьянков О.В., Сергеев Ар.А., Таранов О.С. и др. Использование мыши в качестве модельного животного для оценки эффективности лечебно-профилактического действия препаратов против оспы обезьян. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 2: 60–5.
- Сергеев А.А., Кабанов А.С., Булычев Л.Е., Сергеев А.А., Таранов О.С., Боднев С.А. и др. Способ оценки противооспепной активности лечебно-профилактических препаратов. Патент РФ № 2496149; 2013.

7. *Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных*. Перевод с английского. Washington, D.C.: National Academy Press; 1996.
 9. Кабанов А.С., Сергеев А.А., Шишкина Л.Н., Булычев Л.Е., Скарнович М.О., Сергеев А.А. и др. Сравнительное изучение противовирусной активности химических соединений в отношении ортопоксвирусов в экспериментах in vivo. *Вопросы вирусологии*. 2013, 4: 39–43.
 11. Закс Л. *Статистическое оценивание*. Перевод с немецкого. М.: Статистика; 1976.
 12. Дроздов С.Г., Гарин Н.С., Джиндоян Л.С., Тарасенко В.М. *Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях*. М.: Медицина; 1987.
 16. Булычев Л.Е., Сергеев А.А., Кабанов А.С., Пьянков О.В., Сергеев А.А., Таранов О.С. и др. Изучение эффективности химических синтезированных соединений против ортопоксвирусов. *Дальневосточный журнал инфекционной патологии*. 2012; 20: 102–5.
- REFERENCES**
1. Jahrling P.B., Hensley L.E., Martinez M.J., LeDuc J.W., Rubins K.H., Relman D.A. et al. Exploring the potential of variola virus infection of cynomolgus macaques as a model for human smallpox. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004; 101 (42): 15 197–200.
 2. Huggins J., Goff A., Hensley L., Mucker E., Shamblin J., Wlazlowski C. et al. Nonhuman primates are protected from smallpox virus or monkeypox virus challenges by the antiviral drug ST-246. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53 (6): 2620–5.
 3. Chapman J.L., Nichols D.K., Martinez M.J., Raymond J.W. Animal models of Orthopoxvirus infection. *Vet. Pathol.* 2010; 47 (5): 852–70.
 4. Sergeev A.A., Bulychev L.E., P'yankov O.V., Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bodnev S.A. et al. Search for an animal model to study the effectiveness of antismallpox drugs. In: *Hygienic Aspects in the Field of Sanitary and Epidemiological Welfare of Human [Gigienicheskie aspekty v oblasti obespecheniya sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya cheloveka]*. Novosibirsk; 2012: 356–64. (in Russian)
 5. Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., P'yankov O.V., Sergeev Ar.A., Taranov O.S. et al. Exploitation of mouse model for assessment of therapeutic and prophylactic efficacy of drugs against monkeypox. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2013; 2: 60–5. (in Russian)
 6. Sergeev A.A., Kabanov A.S., Bulychev L.E., Sergeev A.A., Taranov O.S., Bodnev S.A. et al. Method for Evaluating the Antipox Activity of Therapeutic and Prophylactic Preparations. Patent RF № 2496149; 2013. (in Russian)
 7. *The Guide to the Care and Use of Laboratory Animals [Rukovodstvo po sodержaniyu i ispol'zovaniyu laboratornykh zhivotnykh]*. Transl. from Engl. Washington, D.C.: National Academy Press; 1996. (in Russian)
 8. Leparc-Goffart I., Poirier B., Garin D., Tissier M.H., Fuchs F., Crance J.M. Standardization of a neutralizing anti-vaccinia antibodies titration method: an essential step for titration of vaccinia immunoglobulins and smallpox vaccines evaluation. *J. Clin. Virol.* 2005; 32 (1): 47–52.
 9. Kabanov A.S., Sergeev A.A., Shishkina L.N., Bulychev L.E., Skarnovich M.O., Sergeev A.A. et al. Comparative studying antiviral activity of chemical compounds concerning of orthopoxviruses in vivo experiments. *Voprosy virusologii*. 2013; 4: 39–43. (in Russian)
 10. Jordan R., Bailey T.R., Rippin S.R. Compounds, compositions and methods for treatment and prevention of orthopoxvirus infections and associated diseases. Patent WO 2004/112718 A3. International Patent Classification C07D 209/56; 2005.
 11. Zaks L. *Statistical Estimation [Statisticheskoe otsenivanie]*. Transl. from German. Moscow: Statistika; 1976. (in Russian)
 12. Drozdov S.G., Garin N.S., Dzhindoyan L.S., Tarasenko V.M. *Fundamentals of Safety in Microbiological and Virological Laboratories [Osnovy tekhniki bezopasnosti v mikrobiologicheskikh i virusologicheskikh laboratoriyakh]*. Moscow: Meditsina; 1987. (in Russian)
 13. Martinez M.J., Bray M.P., Huggins J.W. A mouse model of aerosol-transmitted orthopoxviral disease: morphology of experimental aerosol-transmitted orthopoxviral disease in a cowpox virus-BALB/c mouse system. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2000; 124 (3): 362–77.
 14. Sbrana E., Xiao S.Y., Newman P.C., Tesh R.B. Comparative pathology of North American and central African strains of monkeypox virus in a ground squirrel model of the disease. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 2007; 76 (1): 155–64.
 15. Goff A.J., Chapman J., Foster C., Wlazlowski C., Shamblin J., Lin K. et al. A novel respiratory model of infection with monkeypox virus in cynomolgus macaques. *J. Virol.* 2011; 85 (10): 4898–909.
 16. Bulychev L.E., Sergeev A.A., Kabanov A.S., P'yankov O.V., Sergeev A.A., Taranov O.S. et al. Study of the efficacy of the chemical synthesized compounds against orthopoxviruses. *Dal'nevostochnyy zhurnal infektsionnoy patologii*. 2012; 20: 102–5. (in Russian)
 17. Jordan R., Goff A., Frimm A., Corrado M.L., Hensley L.E., Byrd C.M. et al. ST-246 antiviral efficacy in a nonhuman primate monkeypox model: determination of the minimal effective dose and human dose justification. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53 (5): 1817–22.
 18. Stabenow J., Buller R.M., Schriewer J., West C., Sagartz J.E., Parker S.A. A mouse model of lethal infection for evaluating prophylactics and therapeutics against monkeypox virus. *J. Virol.* 2010; 84 (8): 3909–20.

Поступила 17.02.15

Принята в печать 19.03.15

© ИЛЬИНЫХ А.В., ПОЛЕНОГОВА О.В., 2016
УДК 578.841:578.42].083.2

Ильиных А.В., Поленогова О.В.

ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ВЕРТИКАЛЬНОЙ ПЕРЕДАЧИ ВИРУСА ЯДЕРНОГО ПОЛИЭДРОЗА В РЯДУ ГЕНЕРАЦИЙ НЕПАРНОГО ШЕЛКОПРЯДА *LYMANTRIA DISPAR* (L.)

ФГБУН «Институт систематики и экологии животных» СО РАН, 630091, г. Новосибирск

Вирусы насекомых могут играть значительную роль в популяционной динамике своих хозяев. Поэтому вопрос, каким образом поддерживается перманентность вирусной инфекции у особей-вирусоносителей, относится к одной из интригующих проблем общей биологии и вирусологии. В лабораторных условиях осуществлялось моделирование вертикальной передачи вируса ядерного полиэдрома (ВЯП) у непарного шелкопряда при относительно высокой смертности особей родительского поколения (60%). С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) выполнялась диагностика скрытого вируса у насекомых до их инфицирования в лабораторных условиях, а также у особей, выживших после заражения. Показатель гибели от полиэдрома насекомых, полученных от выживших после заражения ВЯП особей, в поколениях F₁, F₂ и F₃ составил 14±4, 10±4 и 5±0,5% соответственно. В последующих трех поколениях гибели насекомых от полиэдрома не отмечалось. Уровень вирусоносительства у эмбрионов во всех случаях превышал значения гибели насекомых от полиэдрома, т. е. полученные результаты показывают, что присутствие вируса у насекомых не означает неизбежной гибели хозяев. Вероятно, вирусная ДНК может полностью или частично утратить свою инфекционность, хотя и выявляться в анализируемых образцах насекомых. Вирусная инфекция может развиваться у потомков выживших после заражения насекомых и вызывать смерть особей от полиэдрома в течение трех поколений непарного шелкопряда. Уровень вирусоносительства, определенный у эмбрионов с помощью ПЦР, выше, чем количество погибших насекомых от полиэдрома среди особей дочерних поколений.

Ключевые слова: бакуловирусы; вертикальная передача; непарный шелкопряд *Lymantria dispar* L.

Для цитирования: Ильиных А.В., Поленогова О.В. Доказательство вертикальной передачи вируса ядерного полиэдрома в ряду поколений непарного шелкопряда *Lymantria dispar* (L.). *Вопросы вирусологии*. 2016; 61 (2): 85-88.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2-85-88

Ilyinykh A.V., Polenogova O.V.

THE PROOF OF VERTICAL TRANSMISSION OF THE NUCLEOPOLYHEDROVIRUS IN MANY GENERATIONS OF THE GYPSY MOTH *LYMANTRIA DISPAR* L.

Institute of Systematics and Ecology of Animals, Novosibirsk, 630091, Russian Federation

Introduction. Insect viruses can play an important role in population dynamics of their hosts. That is why the problem of permanent viral infection support among virus-positive insects is associated with one of the intriguing problems of general biology and virology.

Materials and methods. Under laboratory conditions, the modeling of the vertical transmission of the nucleopolyhedrovirus (NPV) gypsy moth was implemented at relatively high level of mortality among insects of parental generation (60%). The diagnostics of the occult virus was executed by the PCR method among insects before their infection under laboratory conditions, as well as among insects that survived after inoculation.

Results. The NPV-caused mortality among insects that survived after infection in generations F₁, F₂, and F₃ was 14 ± 4%, 10 ± 4%, and 5 ± 0.5%, respectively. In the following three generations NPV-induced mortality was not noticed.

Discussion. The level of the virus-positive individuals among the gypsy moth embryos in all occasions was higher than the NPV-induced mortality of insects. Thus, the given results show that the presence of virus among insect does not mean inevitable mortality of their hosts. Perhaps, the viral DNA can completely or partly lose its infectivity but may exist in the analyzed insect samples.

Conclusions. The viral infection can be formed among progeny surviving after inoculation of insects. It can be actuated during three generations of the gypsy moth. The level of the virus-positive individuals among the gypsy moth embryos determined by the PCR method in daughter generations was higher than the NPV-induced mortality of insects.

Key words: baculoviruses; vertical transmission; gypsy moth *Lymantria dispar* L.

For citation: Ilyinykh A.V., Polenogova O.V. The proof of vertical transmission of the nucleopolyhedrovirus in many generations of the gypsy moth *Lymantria dispar* L. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(2): 85-88. (In Russ.)

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2-85-88

For correspondence: Alexandr V. Ilyinykh, Doctor of Biology, Leading research scientist, Institute of Systematics and Ecology of Animals, Novosibirsk, 630091, Russian Federation, E-mail: avilyinykh@mail.ru

Information about authors:

Ilyinykh A.V., <http://orcid.org/0000-0001-8825-7748>

Polenogova O.V., <http://orcid.org/0000-0003-3438-3217>

Funding. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project № 14-04-00615a).

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

Received 26 September 2014

Accepted 20 November 2014

Для корреспонденции: Ильиных Александр Васильевич, д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт систематики и экологии животных» СО РАН, 630091, г. Новосибирск, E-mail: avilyinykh@mail.ru

Вирусы насекомых могут играть существенную роль в популяционной динамике своих хозяев [1, 2]. Смертность насекомых от вироза может наступать в результате действия как экзогенного, так и эндогенного вирусов. В первом случае вирус передается от больных или погибших особей здоровым в течение одной генерации или через внешнюю среду (горизонтальная передача). Кроме того, вирус способен передаваться эндогенным путем – от родителей потомкам через внутреннее содержимое яйца (вертикальная передача) [3]. Однако некоторые принципиальные вопросы, связанные с вертикальной передачей вирусов, к настоящему времени не ясны. Прежде всего имеющиеся результаты весьма противоречивы: так, смертность от вироза среди потомков насекомых, выживших в результате заражения родительского поколения, варьирует от 0% у *Spodoptera ornitogalli* [3] до 100% у *Bombyx mori* [4]. Кроме того, большинство выполненных исследований ограничено первым дочерним поколением выживших после заражения особей [4–6 и др.]. Известны лишь 2 работы, в которых исследовался длительный эффект вертикальной передачи вируса в ряду генераций насекомых (по 5 в каждой работе): *Plodia interpunctella* [7] и *Spodoptera exigua* [8]. Однако в этих статьях нет данных о смертности особей в результате вертикальной передачи вируса, сообщается лишь о количестве насекомых-вирусоносителей (хотя вирусоносительство может и не приводить к смертности насекомых от вироза). До настоящего времени не было попыток ответить на вопрос: существует ли предел, в течение которого вирус способен передаваться и вызывать смерть особей в ряду генераций насекомого?

Поэтому в данной работе на примере непарного шелкопряда и поражающего его вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) впервые определяли, как долго бакуловирус в результате вертикальной передачи способен передаваться и вызывать смерть особей в генерациях насекомого-хозяина при относительно высокой гибели насекомых (~60%) родительского поколения. Иными словами, моделировалась ситуация, возникающая при эпизоотическом процессе в популяциях насекомых. Кроме того, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) дана оценка вирусоносительства у потомков особей, выживших после заражения насекомых, в течение 6 генераций. Полученные данные приближают к пониманию механизмов инициации эпизоотий (естественных и искусственных), вызванных бакуловирусами, в популяциях лесных насекомых-филлофагов.

Материал и методы

Для экспериментов использовали яйцекладки непарного шелкопряда, собранные в очаге массового размножения на территории Новосибирской области в 2006 г. Подготовку яиц и культивирование насекомых выполняли по методике, описанной ранее [9]. Во время эксперимента гусениц содержали на ветвях березы *Betula pendula*, являющейся основным кормовым растением непарного шелкопряда в Западной Сибири и Зауралье. Для заражения гусениц вирусом из ручного опрыскивателя обрабатывали 4 примерно одинаковые ветви кормового растения, равномерно распределенные на площади 0,25 м². В работе применяли штамм Алтайский (из коллекции микроорганизмов Института систематики и экологии животных СО РАН) в концентрации 10⁶ полиэдров на 1 мл, количество вирусной суспензии составляло 2,5 мл в каждом случае. Инфицирование проводили через 2

дня после линьки гусениц на IV возраст, в контрольной группе корм обрабатывали дистиллированной водой. После просушивания ветви растений помещали в 3-литровые сосуды с гусеницами непарного шелкопряда по 15 особей в каждый сосуд. Количество насекомых в опыте и контроле по 150 особей. Сосуды просматривали ежедневно и при необходимости заменяли корм и удаляли погибших особей, которых анализировали под световым микроскопом (Биолам-R15; “ЛЮМО”, Россия) для определения причины гибели. Выживших насекомых выращивали до фазы имаго, скрещивали и от них получали потомство. Для исследования влияния половой принадлежности насекомых на уровень вертикальной передачи вируса скрещивали инфицированных самок с контрольными самцами, а контрольных самок с инфицированными самцами.

Для оценки значимости различий выборочных средних применяли критерий Стьюдента, используя угловое преобразование Фишера.

Часть сбора яиц непарного шелкопряда, из которых выращивали насекомых, использовали для диагностики скрытого вируса с помощью ПЦР. Для анализа отбирали по 100 яйцекладок, из отдельной яйцекладки брали по 20 жизнеспособных яиц и стерилизовали с поверхности [9]. В стерильных условиях из яиц извлекали эмбрионы и помещали в пробирки Eppendorf по 20 особей в каждую. До проведения ПЦР образцы хранили при -70°C.

Суммарную ДНК из образцов насекомых выделяли с помощью комплекта реагентов для выделения ДНК (ООО “Лаборатория МЕДИГЕН”, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Амплификацию ПЦР-продукта гена белка слияния Ld130 проводили в 20 мкл буфера, содержащего 10 мкл PyroStart™ Fast PCR Master Mix (2X) (“Fermentas”, США); 0,1 мкМ прямого и обратного праймеров и 27,5% ДНК по объему. Дизайн специфических праймеров выполняли по полнотекстовой последовательности ВЯП непарного шелкопряда, задепонированной в базе данных GenBank под номером NC_001973 [10]. Структура разработанных праймеров для определения ДНК ВЯП непарного шелкопряда в биологических образцах:

прямой: 5' CGGGCATCATCCGCGGCC 3' (127651–127668),

обратный: 5' CGCCCTCCAGCTCCGCGC 3' (127944–127927).

ПЦР проводили на амплификаторе DNA Engine Dyad® Peltier Thermal Cycler (“Bio-Rad”, США) в следующем режиме: денатурация 30 с – 94°C, отжиг 30 с – 68°C и синтез 30 с – 72°C 37 циклов; синтез 7 мин – 72°C. Размер амплифицируемого фрагмента составлял 294 пары нуклеотидов.

Результаты и обсуждение

Смертность насекомых в родительском поколении при инфицировании гусениц непарного шелкопряда ВЯП составила 62±7%, в контроле – 2±0,4% ($p < 0,001$). Вероятно, смертность контрольных насекомых может объясняться проявлением спонтанного полиэдроза, характерного для особей природных популяций непарного шелкопряда [9]. Смертность насекомых от вирусной инфекции у выживших после заражения потомков особей наблюдалась в поколениях F₁–F₃ (14±4, 10±4 и 5±0,5% соответственно), в последующих генерациях гибели не отмечалось (см. таблицу).

Имеющиеся данные литературы, касающиеся ис-

Уровень вирусоносительства и смертность непарного шелкопряда от спонтанного полиэдроза у потомков особей, выживших после инфицирования ВЯП гусениц родительского поколения

Покло- ление насе- комых	Уровень вирусоносительства у насекомых, определенный с помощью ПЦР, % ($n = 100$)		Смертность насекомых от полиэдроза, % ($n = 150$)	
	зараженные	контрольные	зараженные	контрольные
F1	78±9	42±4	14±4*	1±0,1
F2	46±7	34±7	10±4*	0
F3	32±5	24±5	5±0,5*	0
F4	11±2	–	0	0
F5	8±1	10±2	0	0
F6	10±1	8±1	0	0

Примечание. Приведены средние значения±стандартная ошибка; * – значимость различий выборочных средних ($p < 0,01$) между потомками выживших зараженных и контрольных насекомых; (–) – нет данных.

следования вертикальной передачи вируса у непарного шелкопряда, неоднозначны. Так, по данным Муррея и Элкинтона [11], гибель насекомых от полиэдроза среди потомков особей, выживших после заражения вирусом в фазе гусеницы II возраста, составила менее 2%. Эти авторы считают, что смертность от полиэдроза среди потомков выживших особей явилась результатом случайного заражения насекомых вирусом в лаборатории. Однако Шапиро и Робертсон [12] в схожих экспериментах продемонстрировали, что гибель насекомых от вируса в дочернем поколении варьировала от 4,7 до 11,5% в зависимости от дозы вируса в родительском поколении. Эти авторы в свою очередь относят смертность насекомых среди потомков инфицированного поколения на счет вертикальной передачи вируса. Сравнивая результаты этих двух работ, необходимо подчеркнуть, что в экспериментах Шапиро и Робертсона [12] смертность от полиэдроза среди родительского поколения варьировала от 10 до 90%, а в опытах Муррея и Элкинтона [11] этот показатель составил 17%. Возможно, относительно низкая смертность от полиэдроза среди особей родительского поколения является величиной, недостаточной для демонстрации вертикальной передачи вируса.

В других экспериментах по изучению вертикальной передачи ВЯП у непарного шелкопряда зараженность особей дочернего поколения отмечалась на уровне 15% [13]. Таким образом, можно заключить, что полученные в настоящей работе результаты в целом совпадают с имеющимися для непарного шелкопряда по поколению F₁ литературными данными.

Интерес представляет вопрос о том, зависит ли вертикальная передача от количества погибших насекомых в родительском поколении. По данным Шапиро и Робертсона [12], смертность особей непарного шелкопряда от полиэдроза в родительском поколении прямо коррелировала со смертностью в дочернем поколении, но этих результатов недостаточно для обобщения. Различия в передаче

вируса, о которых можно судить по имеющимся работам, вероятно, связаны с возрастными различиями инфицированных насекомых и различиями в смертности особей родительского поколения.

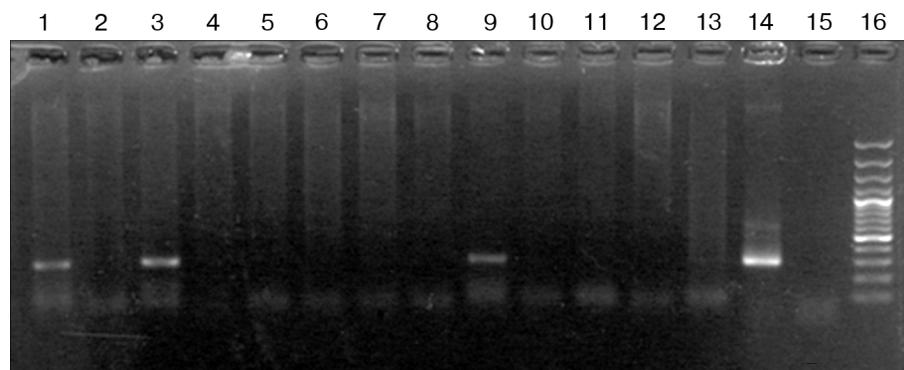
Определение уровня спонтанного полиэдроза у особей дочернего поколения F₁, полученных в результате скрещивания инфицированных самок с контрольными самцами, а также контрольных самок с инфицированными самцами, достоверных различий не выявило: смертность насекомых составила 12±3 и 10±2% соответственно ($p < 0,01$), т. е. вирус передавался как самцами, так и самками насекомых, выживших после инфицирования. Показано, что при инфицировании насекомых сублетальными дозами локализация и репликация вируса происходят в гонадах насекомых [6], поэтому передача вируса может осуществляться особями обоего пола.

Вопрос о том, в каком виде происходит вертикальная передача вируса у насекомых, является дискуссионным. Обсуждается возможность интеграции вируса в геном хозяина [14], передача в виде открытой вирусной инфекции [3, 15], а также в латентной форме [16–18].

Результаты ПЦР показали, что уровень вирусоносительства у эмбрионов, выделенных из яиц родительского поколения, составил 42±9%. Вероятно, этот уровень является фоновым для исследуемой популяции, поскольку у ряда видов насекомых, собранных в природных условиях, отмечено наличие скрытого вируса. В частности, применение ПЦР показало, что латентный вирус обнаруживался в популяциях зимней пяденицы *Operophtera brumata* в США на уровне 28% [19], а в различных популяциях капустной совки *Mamestra brassicae* на территории Англии – в пределах 50–100% [16].

У эмбрионов, полученных от выживших после заражения насекомых, уровень вирусоносительства снижался от 78±9% в поколении F₁ до 8±1% в поколении F₅ (см. таблицу). На рисунке представлена электрофореграмма продуктов ПЦР ДНК из эмбрионов поколения F₄, полученных от выживших после заражения ВЯП насекомых. Из анализа электрофореграммы следует, что в данном случае 3 пробы из 13 оказались положительными на вирус.

По-видимому, снижение уровня вирусоносительства в ряду генераций потомков выживших после заражения насекомых отчасти вызвано элиминацией особей, погиб-



Электрофорез продуктов ПЦР гена LD 130 ВЯП непарного шелкопряда из эмбрионов (поколение F₄), полученных из яиц насекомых, выживших после заражения вирусом в фазе гусеницы IV возраста.

1, 3, 9 – положительные на ВЯП пробы; 2, 4–8, 10–13 – отрицательные на ВЯП пробы; 14 – положительный контроль; 15 – отрицательный контроль; 16 – маркер O'GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder ("FERMENTAS", США).

ших от полиэдроза. Кроме того, возможно, что репликация вируса подавляется механизмами преодоления вирусной инфекции в организме насекомого-хозяина. Во всех случаях, когда отмечалось вирусоносительство, его уровень превышал количество погибших насекомых от ВЯП, т. е. присутствие вируса у насекомых не означает неизбежной гибели хозяев. Вероятно, вирусная ДНК может частично (или полностью) утратить свою инфекционность, хотя и выявляться в образцах насекомых. Однако в течение трех генераций насекомого вирус может находиться в организме хозяина, сохраняя при этом способность к литическому циклу развития.

Заключение

Таким образом, в работе впервые в прямом эксперименте удалось продемонстрировать, что вирусная инфекция может не только развиваться у насекомых, выживших в результате воздействия бакуловируса, но также вызывать гибель определенной части особей в результате вертикальной передачи вируса в течение трех генераций. Передача вируса дочернему поколению происходит как самцами, так и самками насекомых, выживших после инфекции, а уровень вирусоносительства у насекомых-хозяев при вертикальной передаче ВЯП выше, чем смертность от полиэдроза. По-видимому, вирусная ДНК может частично (или полностью) утратить свою инфекционность, хотя и выявляться в образцах анализируемых насекомых.

Финансирование. Исследование было поддержано грантом РФФИ (проект № 14-04-00615а).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ilyinykh A. Analysis of the causes of declines in Western Siberian outbreaks of the nun moth *Lymantria monacha*. *BioControl*. 2011; 56: 123–31.
2. Opoku-Debrah J.K., Hill M.P., Knox C.B., Moore S.D. Overcrowding of false codling moth, *Thaumotobia leucotreta* (Meyrick) leads to the isolation of five new *Cryptophlebia leucotreta* granulovirus (CrLeGV-SA) isolates. *J. Invertebr. Pathol.* 2013; 112: 219–28.
3. Kukan B. Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in insects. *J. Invertebr. Pathol.* 1999; 74: 103–11.
4. Khurad A.M., Mahulikar A., Rathod M.K., Rai M.M., Kanginakudru S., Nagaraju J. Vertical transmission of nucleopolyhedrovirus in the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Invertebr. Pathol.* 2004; 87: 8–15.
5. Kouassi L.N.G., Tsudo K., Goto C., Mukarava S., Sakamari S., Kusigemati K. et al. Prevalence of latent virus in *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) and its activation by heterologous virus. *Appl. Entomol. Zool.* 2009; 44 (1): 95–102.
6. Vitro C., Zarat C., Lopes-Ferber M., Murillo R., Williams T. Gender-mediated differences in vertical transmission of a nucleopolyhedrovirus. *Plos One*. 2013; 8 (8): 1–5.
7. Burden J.P., Griffiths C.M., Cory J.S., Smith P., Sait S.M. Vertical transmission of sublethal granulovirus infection in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Mol. Ecol.* 2002; 11 (3): 547–55.
8. Cabodevilla O., Villar E., Virto C., Murillo R., Williams T., Caballero P. Intra- and intergenerational persistence of an insect nucleopolyhedrovirus: adverse effects of sublethal disease on host development, reproduction, and susceptibility to superinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77 (9): 2954–60.
9. Ilyinykh A.V., Shternshis M.V., Kuzminov S.V. Exploration into a mechanism of transgenerational transmission of nucleopolyhedrovirus in *Lymantria dispar* L. in Western Siberia. *BioControl*. 2004; 49 (4): 441–54.
10. Kuzio J., Pearson M.N., Harwood S.H., Funk C.J., Evans J.T., Slavicek J.M. et al. Sequence and analysis of the genome of a baculovirus pathogenic for *Lymantria dispar*. *Virology*. 1999; 253 (1): 17–34.
11. Murray K.D., Elkinton J.S. Environmental contamination of egg masses as a major component of transgenerational transmission of gypsy moth nuclear polyhedrosis virus (LdMNPV). *J. Invertebr. Pathol.* 1989; 53: 324–34.
12. Shapiro M., Robertson J.L. Yield and activity of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nucleopolyhedrosis virus recovered from survivors of viral challenge. *J. Econ. Entomol.* 1987; 80: 901–5.
13. Myers J., Malakar H.R., Cory J.S. Sublethal nucleopolyhedrovirus infection effects on female pupal weight, egg mass size, and vertical transmission in gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Environ. Entomol.* 2000; 29: 1268–72.
14. Yamao M., Katayama N., Nakazawa H., Yamakawa M., Hayashi Y., Hara S. et al. Gene targeting in the silkworm by use of a baculovirus. *Genes Dev.* 1999; 13 (5): 511–6.
15. Cooper D., Cory J.S., Theilmann D.A., Myers J.H. Nucleopolyhedroviruses of forest and western tent caterpillars: cross-infectivity and evidence for activation of latent virus in high-density field populations. *Ecol. Entomol.* 2003; 28: 41–50.
16. Burden J.P., Nixon C.P., Hodgkinson A.E., Rossee R.D., Sait S.M., King L.A. et al. Covert infections as a mechanism for long-term persistence of baculoviruses. *Ecol. Lett.* 2003; 6: 524–31.
17. Murillo R., Hussey M.S., Possee R.D. Evidence for covert baculovirus infections in a *Spodoptera exigua* laboratory culture. *J. Gen. Virol.* 2011; 92: 1061–70.
18. Vilaplana L., Wilson K., Redman E.M., Cory J.S. Pathogen persistence in migratory insects: high levels of vertically-transmitted virus infection in field populations of the African armyworm. *Evol. Ecol.* 2010; 24: 147–60.
19. Burand J.P., Kim W., Welch A., Elkinton J.S. Identification of a nucleopolyhedrovirus in winter moth populations from Massachusetts. *J. Invertebr. Pathol.* 2011; 108: 217–9.

Поступила 26.09.14

Принята в печать 20.11.14

ДИСКУССИЯ

© КОВАЛЕВ С.Ю., МУХАЧЕВА Т.А., 2016
УДК 616.831-002-022:578.833.26]:577.21.083

Ковалев С.Ю., Мухачева Т.А.

УНИФИКАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», 620000, г. Екатеринбург

Применение молекулярно-генетических методов и подходов в эпидемиологических исследованиях стало настоящим прорывом в понимании закономерностей, путей и механизмов распространения возбудителей инфекций. Однако отсутствие стандартных методов исследования приводит к несопоставимости форматов полученных результатов. В целях унификации методов предлагается выбрать один фрагмент вирусного генома, секвенирование которого было бы необходимым и достаточным условием для проведения молекулярно-эпидемиологических исследований клещевого энцефалита (КЭ). Кандидатом на эту роль может быть фрагмент гена *E* длиной 454 нуклеотидов, представленный наибольшим количеством последовательностей в базе данных GenBank. Кроме того, на основе кодируемой этим фрагментом аминокислотной последовательности была разработана система дифференциации вируса КЭ (ВКЭ) на структурные единицы – кластероны (Kovalev S., Mukhacheva T., 2013). На примере природных очагов Среднего Урала была показана информативность кластеронного подхода к изучению генетической структуры популяции ВКЭ-Сиб. Каждый очаг КЭ оказался уникальным как по количественному, так и по качественному составу кластеронов. При этом наибольшее их разнообразие наблюдалось на юге Среднего Урала в зоне Транссибирского пути, что отражает историю колонизации этой территории, тесным образом связанную с дорогами из Сибири в европейскую часть России. Было выявлено три кластерона возрастом не более 50 лет, присутствие которых может свидетельствовать об активном эволюционном процессе в популяциях ВКЭ-Сиб. В свою очередь тип их территориального распределения указывает на решающую роль антропогенного фактора в распространении ВКЭ (Kovalev S., Mukhacheva T., 2014). Кластеронный подход позволяет учесть не только генетическую, но и фенотипическую изменчивость вируса и должен рассматриваться скорее в качестве дополнения, а не альтернативы филогенетическому анализу. Помимо научного, предлагаемый подход может иметь и прикладное значение, например использоваться региональными службами Роспотребнадзора для эпидемиологического мониторинга КЭ. Унификация исследований на основе одного стандартного генетического маркера позволит объединить усилия исследователей из разных регионов России и других стран в изучении КЭ.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; унификация; фрагмент генома; генетическая структура; кластерон.

Для цитирования: Ковалев С.Ю., Мухачева Т.А. Унификация молекулярно-эпидемиологических исследований клещевого энцефалита. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61 (2):89-95.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2-89-95

Kovalev S.Y., Mukhacheva T.A.

UNIFICATION OF THE MOLECULAR EPIDEMIOLOGICAL RESEARCH OF THE TICK-BORNE ENCEPHALITIS

Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, Yekaterinburg, 620000, Russian Federation

Molecular genetic techniques and approaches in epidemiological studies were breakthrough in the understanding of the laws, ways, and mechanisms of the spread of the pathogens. However, lack of standard methods makes it difficult to compare results obtained by different scientific groups. In this work we propose to choose one fragment of the TBEV genome as a genetic marker whose sequencing would be both obligatory and sufficient for the molecular epidemiological studies. The best candidate for this purpose may be a fragment of the gene *E* of 454 nucleotides in length. The deduced amino acid sequence of this fragment was a basis for a new approach for the TBEV differentiation with clusteron being a structural unit (Kovalev and Mukhacheva, 2013). The clusteron approach was proved to be informative for studying the genetic structure of the TBEV-Sib population in the Middle Urals. TBE foci were shown to be unique in both quantitative and qualitative composition of the clusterons. The greatest clusteron diversity in the south of the Middle Urals, through the Trans-Siberian way, may reflect the history of the colonization, closely associated with the roads between Siberia and the European part of Russia. The age of three clusterons did not exceed 50 years, which may indicate an ongoing evolutionary process taking place in the TBEV-Sib populations. In turn, their spatial distribution indicates the crucial role of human factors in the spread of the TBEV (Kovalev & Mukhacheva, 2014). The clusteron approach provides formalization of ideas about the structure of the viral populations and could be used not only by researchers but also by epidemiological surveillance services. Unification of the studies of the TBEV on the basis of a standard genetic marker would consolidate the efforts of researchers from different regions of Russia and other countries.

Для корреспонденции: Ковалев Сергей Юрьевич, канд. биол. наук, доцент, зав. лаборатории молекулярной генетики ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», 620000, г. Екатеринбург, E-mail: sergey.kovalev@urfu.ru

Key words: tick-borne encephalitis virus; unification; genome fragment; genetic structure; clusteron.

For citation: Kovalev S.Y., Mukhacheva T.A. Unification of the molecular epidemiological research of the tick-borne encephalitis. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(2): 89-95. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-2-89-95

For correspondence: Sergei Y. Kovalev, Candidate of Biology, Associate Professor, Head of Laboratory of Molecular Genetics, Ural Federal University named after the first President of Russia B.N. Yeltsin, Yekaterinburg, 620000, Russian Federation, E-mail: sergey.kovalev@urfu.ru

Information about authors:

Kovalev S.Y., orcid.org/0000-0002-4669-5288

Mukhacheva T.A., orcid.org/0000-0002-9300-5921

Acknowledgments. The authors are grateful to B.A. Galishev, V.L. Umpelev, T.A. Pimenova, and T.E. Snitkovskaya for help in collecting ticks and organizing expeditions.

Funding. This work was supported by the Russian Foundation for Basic Research (Project № 16-04-00329 A).

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

Received 02 September 2014

Accepted 25 September 2014

Для чего нужна унификация молекулярно-эпидемиологических исследований?

Унификацией (лат. unus – один + facio – делаю; объединение) называется приведение к единообразию, единой форме или системе.

Привлечение молекулярно-генетических методов и подходов к эпидемиологическим исследованиям стало прорывом в понимании закономерностей, путей и механизмов распространения возбудителей инфекций человека, животных и растений. В результате сформировалось новое научное направление – молекулярная эпидемиология [1]. На этапе накопления первичных данных были приемлемы любые методы, в частности рестрикционный анализ, олигонуклеотидное картирование, молекулярная гибридизация, секвенирование и другие. Однако со временем несовместимость форматов получаемых данных стала важным препятствием в решении вопросов эволюции возбудителя, установлении его генетической структуры, проведении мониторинга природных очагов и т. д.

Сегодня в молекулярной эпидемиологии клещевого энцефалита (КЭ) применяются два несопоставимых метода: молекулярная гибридизация и секвенирование нуклеиновых кислот. Первый метод ввиду его ограниченной применимости и низкой информативности сейчас используется крайне редко, в то время как секвенирование стало основой молекулярно-эпидемиологических исследований КЭ. Определение полной нуклеотидной последовательности вирусного генома было бы идеальным решением и навсегда решило проблему несовместимости форматов. Однако, несмотря на небольшие размеры (около 11 тыс. нуклеотидов), количество полногеномных последовательностей вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) равняется лишь 73 (без учета 24 последовательностей, кодирующих полипротеин), а темп их поступления в базу данных GenBank составляет всего несколько последовательностей в год. Проблема заключается в том, что для полногеномного секвенирования требуется значительное количество генетического материала, которое чаще всего можно получить только из штаммов, хранящихся лишь в нескольких вирусологических коллекциях. Кроме того, было отмечено, что в результате длительного пассирования штаммов ВКЭ на лабораторных животных или культуре клеток нуклеотидная последовательность вирусного генома может отличаться от исходной [2, 3]. Поэтому большинство исследователей сосредоточилось на секвенировании

фрагментов вирусного генома (генетические маркеры) различной длины в зависимости от своих предпочтений и возможностей.

Наиболее часто в научной литературе фигурируют такие важные маркеры, как ген *E* и/или его фрагменты, 5'- и 3'-нетранслируемые регионы (НТР), а также гены *NS5* и *NS3* (рис. 1). Такое разнообразие маркеров неизбежно приводит к трудностям в установлении филогенетических связей между разными штаммами. Единственный выход из сложившейся ситуации мы видим в унификации, т. е. в устранении излишнего количества подходов и приведении их к единообразию. Иными словами, было бы рационально выбрать один генетический маркер (стандартную последовательность) вирусного генома, секвенирование которого было бы необходимым и достаточным условием для проведения молекулярно-эпидемиологических исследований. В отдельных случаях для исследования предпочтительнее брать два и более фрагмента вирусного генома. Как правило, это требование относится к вирусам, обладающим выраженной способностью к рекомбинации (Picorna-, Retroviridae и др.) или имеющим сегментированный геном (Reo-, Orthomyxo-, Bunyaviridae и др.). Однако поскольку ВКЭ является вирусом с несегментированным геномом, для которого наличие рекомбинации не было показано экспериментально, изучение одного генетического маркера является достаточным условием для проведения молекулярно-эпидемиологических исследований. Исследования, безусловно, не должны ограничиваться только этим участком, однако определение его последовательности должно стать обязательным. Это позволило бы объединить результаты работы исследовательских групп, работающих в разных регионах РФ и других странах, в единое информационное пространство для изучения КЭ в глобальном масштабе на всем ареале вируса от Дальнего Востока до Западной Европы. Следует отметить, что унифицированная процедура мультилокусного сиквенс-типирования хорошо зарекомендовала себя в области молекулярной эпидемиологии бактериальных инфекций и пользуется все большей популярностью среди исследователей [4, 5].

В качестве стандартного маркера мы предлагаем фрагмент гена *E* длиной 454 нуклеотида [6] (в качестве примера – последовательность под номером доступа в GenBank GU444161). В настоящее время в базе данных GenBank насчитывается 1164 последовательности, содержащие этот фрагмент, что в несколько раз больше по сравнению с остальными маркерами (см. рис. 1). Бо-

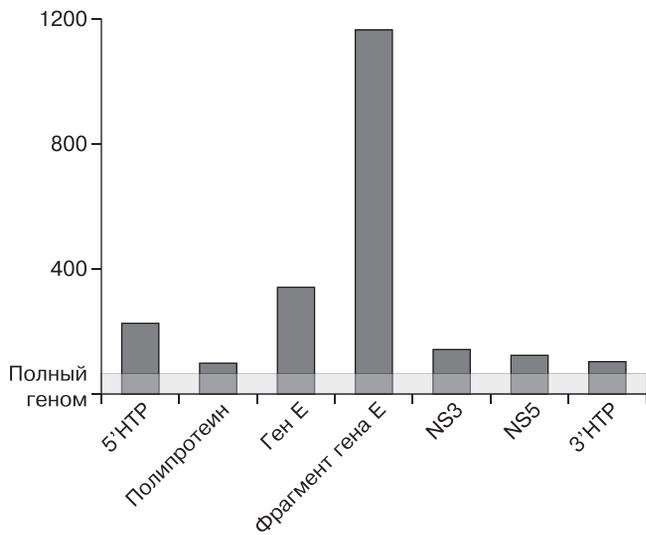


Рис. 1. Представленность последовательностей наиболее часто используемых генетических маркеров ВКЭ в базе данных GenBank. Светло-серым цветом показано количество полногеномных последовательностей на фоне числа последовательностей для каждого маркера (темно-серый цвет). Фрагмент гена E – предлагаемый для унификации исследований участок длиной 454 нуклеотида.

лее того, на основе анализа этого фрагмента нами была предложена система дифференциации штаммов ВКЭ в пределах субтипа, основанная на объединении их в кластероны, т. е. группы штаммов, имеющих идентичную аминокислотную последовательность фрагмента белка E [6]. Использование кластеронного подхода в качестве инструмента для изучения и мониторинга генетической структуры популяций вируса в природных очагах КЭ на региональном и локальном уровне показало его высокую информативность [7].

Целью настоящей статьи является теоретическое обоснование необходимости внедрения в практику молекулярно-эпидемиологических исследований унифицированного подхода, основанного на установлении кластеронной структуры ВКЭ в природных очагах, для создания целостного представления о генетическом разнообразии вирусных популяций и разработки принципов перманентного мониторинга очагов КЭ.

Кластероны и кластеронная структура

В 2009 г. нами была показана принципиальная возможность объединения штаммов и изолятов ВКЭ-Сиб (далее природные изоляты вирусов и штаммы будут обозначаться как штаммы) в отдельные группы или кластеры по признаку идентичности аминокислотных последовательностей фрагмента поверхностного белка E [8].

Одним из важнейших является вопрос о критериях выбора фрагмента вирусного генома и его размера. Гликопротеин E является основным структурным мембранным белком ВКЭ, который обеспечивает связывание ВКЭ с клеточными рецепторами, определяет тропизм,

вирулентность и обеспечивает образование вируснейтрализующих антител [9]. Как было показано ранее, нуклеотидная последовательность этого участка генома является информативным маркером для определения филогенетических связей как между вирусами комплекса КЭ, так и между субтипами в пределах одного вида вируса [10–14]. Этот район генома относительно консервативен, однако его размер и уровень вариабельности достаточны для калибровки молекулярных часов и расчета эволюционного возраста ВКЭ [11, 15–17]. Фрагмент гена E длиной 454 нуклеотидов (позиции с 311 по 762 гена E без участков связывания праймеров) и кодируемый им фрагмент гликопротеина E (104–254 аминокислотных остатков) был выбран нами по ряду причин. Во-первых, он содержит как консервативные, так и вариабельные участки [12]. В него входят аминокислотные замены в позициях 206, 175, 234, которые являются специфичными для субтипов ВКЭ и филогенетических линий ВКЭ-Сиб [18–20]. Во-вторых, на момент начала исследований в GenBank уже имелось достаточное количество последовательностей, включавших интересующий нас фрагмент, что позволило провести сравнительный анализ данных. В-третьих, размер данного участка позволяет найти компромисс между достаточной информативностью маркера и возможностью его амплификации непосредственно из зараженного клеща (минуя стадию выделения штамма вируса), что позволяет исследовать максимально возможное количество изолятов ВКЭ и получать важнейшую информацию о возбудителе непосредственно в ходе эпидемического сезона.

Значительное пополнение базы данных GenBank последовательностями вирусного генома и его фрагментов (1164 последовательности на февраль 2014 г.) в последние несколько лет позволило структурировать всю совокупность штаммов ВКЭ на основе общего подхода. В качестве основного элемента структуры был предложен кластерон – группа штаммов ВКЭ (более 3 для ВКЭ-Сиб и более 2 для ВКЭ-Дв и ВКЭ-Ев), имеющих идентичную аминокислотную последовательность, филогеографически связанных между собой и обладающих определенным типом территориального распределения: локальным или коридорным [6]. Название кластерона состоит из буквенно-цифрового индекса: цифра обозначает субтип (1 – ВКЭ-Дв, 2 – ВКЭ-Ев и 3 – ВКЭ-Сиб), а буква – определенную аминокислотную последовательность. Штаммы с уникальной последовательностью, встретившиеся 1 или 2 раза, были отнесены к группе уникальных (см. таблицу). Для расчета времени дивергенции штаммов внутри кластерона использовалась прямая оценка скорости нуклеотидных замен $1,56 \pm 0,29 \cdot 10^{-4}$ синоними-

Сравнение характеристик кластеронов трех субтипов ВКЭ

Субтип ВКЭ	Количество штаммов	Количество кластеронов	Минимальное количество штаммов в кластероне	Количество штаммов в кластеронах, %	Количество уникальных штаммов, %	Количество всех вариабельных позиций, %	Количество вариабельных позиций в кластеронах
ВКЭ-Сиб	762	18	3	623 (81,8)	139 (18,2)	70 (46,4)	13
ВКЭ-Ев	265	10	2*	227 (85,7)	38 (14,3)	28 (18,5)	9
ВКЭ-Дв	137	11	2*	114 (83,2)	23 (16,8)	31 (20,5)	10
Всего...	1164	39	-	964 (82,8)	200 (17,2)	-	-

Примечание. * – ввиду меньшего числа штаммов дальневосточного (ВКЭ-Дв) и европейского (ВКЭ-Ев) субтипов минимальное количество штаммов в кластероне было уменьшено до двух.

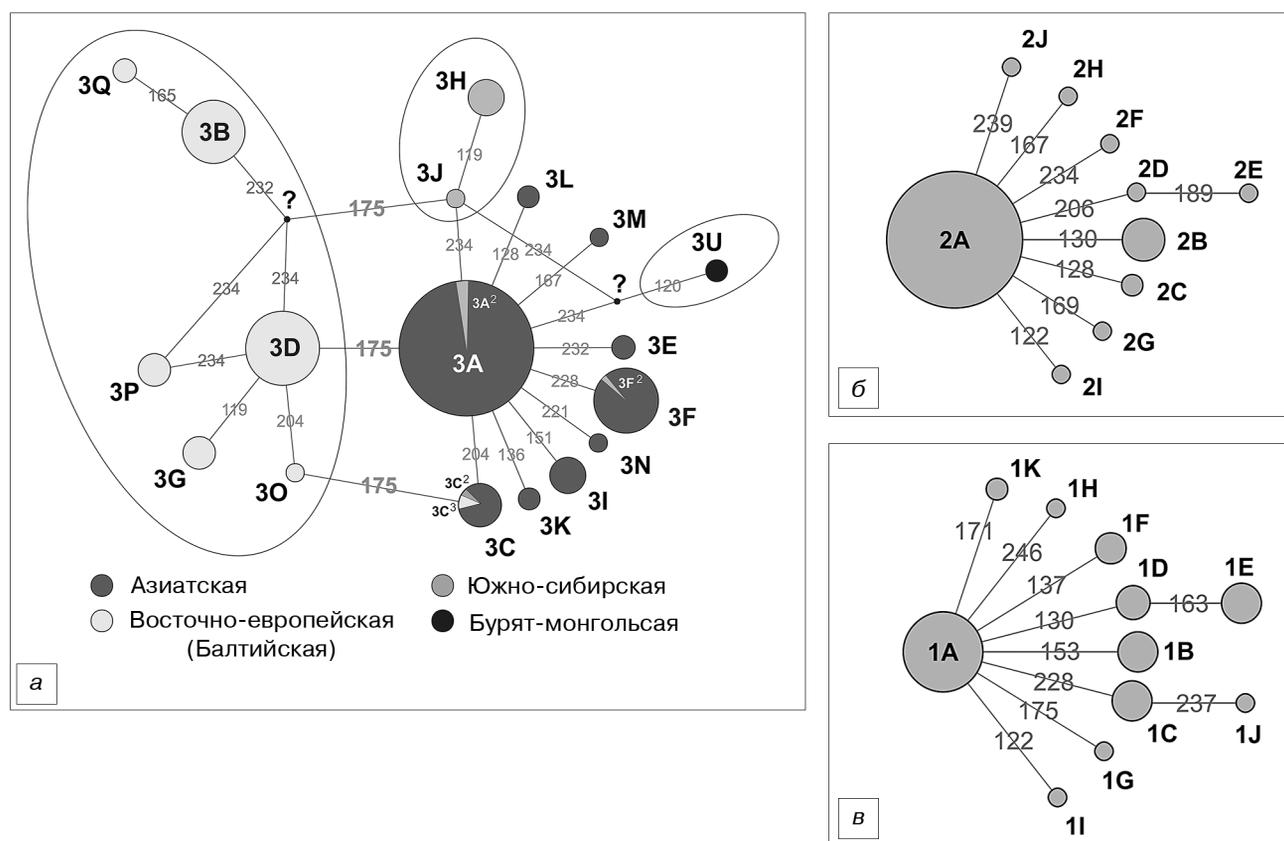


Рис. 2. Филогенетические сети кластеронов ВКЭ-Сиб (а), ВКЭ-Ев (б), ВКЭ-Дв (в). Кластероны всех субтипов имеют буквенное обозначение с номером субтипа. Так, кластероны 1А, 2А и 3А будут относиться к ВКЭ-Дв, ВКЭ-Ев и ВКЭ-Сиб соответственно. Овалами выделены филогенетические группы кластеронов. Площадь кругов пропорциональна количеству штаммов в кластере. Знаком вопроса обозначены последовательности, предсказанные теоретически, но пока не обнаруженные у вирусных изолятов. На линиях, соединяющих кластероны, обозначены позиции аминокислотных замен в белке Е.

ческих замен в год [8]. Сравнительные характеристики кластеронов трех субтипов ВКЭ показаны в таблице.

Наиболее удобным способом графического представления кластеронной структуры субтипов ВКЭ являются филогенетические сети, отражающие различия последовательностей в одну аминокислотную замену (рис. 2) [21]. Кластеронная структура ВКЭ-Сиб является наиболее сложной и представлена разветвленной сетью кластеронов с разным количеством штаммов (см. рис. 2, а). Различия между кластеронами внутри ВКЭ-Сиб могут достигать до 6 аминокислотных замен. В то же время кластеронная структура ВКЭ-Ев и ВКЭ-Дв достаточно проста, максимальные различия между кластеронами внутри субтипа составляют 3 и 4 аминокислотные замены соответственно (см. рис. 2, б, в).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей [6] позволил выделить внутри ВКЭ-Сиб 4 монофилетические группы (см. рис. 2). Кластероны ВКЭ-Сиб первой филогенетической группы (3А, 3С, 3Е, 3Г, 3И, 3К, 3Л, 3М и 3Н) составляют большую часть изученных штаммов и распространены в основном в азиатской части ареала (Урал и Западная Сибирь), поэтому эта группа кластеронов была названа *Азиатской* (прототипный штамм Zausaev, AF527415). Вторая группа кластеронов (3Н и 3J) встречается на юге Западной Сибири и была названа *Южно-сибирской* (штамм Aina, AF091006). Третья группа, распространенная на Урале,

в северо-западной части России, а также в странах Балтии (3В, 3D, 3G, 3O, 3P и 3Q), была названа *Восточно-европейской*, или *Балтийской* (Est54, DQ393773). Четвертая группа (кластерон 3U, штамм 886–84) встречается в Бурятии и Северной Монголии и была названа *Бурят-монгольской* (886–84, EF469662) (см. рис. 2). Все штаммы ВКЭ-Сиб, входящие в кластероны одной филогенетической группы, связаны между собой общим происхождением.

Среди последовательностей фрагмента белка Е штаммов ВКЭ-Сиб 70 из 151 аминокислоты оказались вариabельными, однако кластероны были выделены на основании только 13 аминокислотных замен (остальные встречались только у уникальных штаммов) (см. таблицу). Позиции кластеронспецифичных аминокислотных замен, как правило, различаются между субтипами. По всей видимости, аминокислотный профиль (уникальная комбинация аминокислотных замен) каждого кластерона не является случайным, поскольку закреплен у большого количества штаммов, эволюционно и географически связанных между собой. Было показано, что кластеронспецифичные аминокислотные замены у штаммов ВКЭ-Сиб расположены только на одной латеральной поверхности гликопротеина Е [6]. Это может свидетельствовать о некой функциональной роли этих замен, изучение которой является отдельным вопросом и требует дальнейших исследований.



Рис. 3. Кластерное разнообразие штаммов ВКЭ-Сиб на территории Среднего Урала. Градациями серого цвета обозначены территории с разным количеством кластеронов (от 1 до 9).

Количественный и качественный состав кластеронов, время появления и их филогенетические связи определяют кластеронную структуру ВКЭ.

Можно предположить, что любая территория, эндемичная по КЭ, представляет собой уникальный набор кластеронов с разным количеством штаммов в кластере, а также типами их распределения. В связи с этим представляется логичным применить кластеронный подход в качестве инструмента для изучения генетической структуры популяций вируса и мониторинга природных очагов КЭ.

Применение кластеронного подхода для изучения природных очагов

Кластеронный подход был применен для популяции ВКЭ из природных очагов Среднего Урала (в основном Свердловской области). Выбор территории обусловлен рядом причин. Во-первых, на территории Урала регистрируется высокий уровень заболеваемости – 20% всей заболеваемости в России с ежегодной регистрацией летальных случаев [22]. Во-вторых, наблюдение за штаммами ВКЭ на этой территории ведется на протяжении почти 50 лет (с 1966 г.). В-третьих, около 1/3 всех нуклеотидных последовательностей ВКЭ, представленных в GenBank, принадлежат штаммам и изолятам, выделенным на этой территории.

Начиная с 1966 г. на территории Свердловской области было выделено 387 изолятов и штаммов ВКЭ-Сиб. Из них 321 (82,9%) был дифференцирован на кластероны, остальные были отнесены к уникальным. Из 18 известных к настоящему времени кластеронов этого субтипа на Среднем Урале выявлено 14. Уральские штаммы ВКЭ-Сиб представлены в основном Азиатской (более 80%) и

в меньшей степени Восточно-европейской (около 20%) группами кластеронов [7]. На территории Свердловской области встречаются кластероны, характерные как для Западной Сибири, так и северо-запада европейской части России.

Разнообразие кластеронов ВКЭ и их распределение по территории являются двумя наиболее существенными

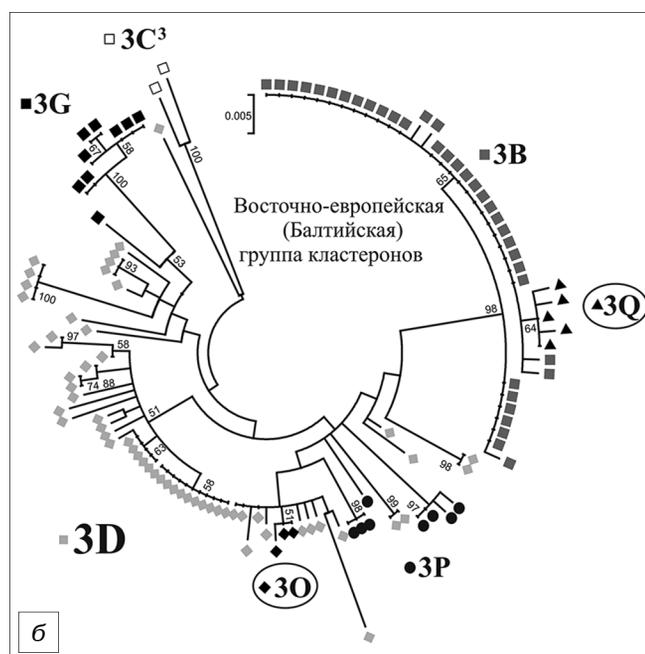


Рис. 4. Карта распределения кластеронов 3I, 3O и 3Q по территории Свердловской области (а); дендрограмма, демонстрирующая клональное происхождение кластеронов 3O и 3Q Восточно-европейской филогенетической линии (б). Филогенетическое положение штаммов кластера 3I Азиатской филогенетической линии не приведено.

характеристиками популяций ВКЭ в природном очаге. Было показано, что в Свердловской области количество кластеронов изменяется в широтном направлении. Так, наибольшее разнообразие (9 кластеронов) приходится на Екатеринбург и его пригороды, а также южную часть Свердловской области вдоль трассы Екатеринбург – Тюмень (рис. 3). По мере продвижения на север кластеронное разнообразие штаммов ВКЭ существенно снижается. Так, в пригородах Нижнего Тагила – второго по величине города Свердловской области – встретилось только 5 кластеронов, а в Верхотурском и Серовском районах (север области) – лишь по 2 (см. рис. 3). На остальной малонаселенной территории области встречается, как правило, только 1 кластерон 3А [7]. Значительное разнообразие кластеронов на юге области в зоне Транссибирского пути согласуется с ранее предложенной гипотезой о распространении ВКЭ-Сиб из Западной Сибири в результате колонизации европейцами этой территории в начале XVII века [8].

Большинство кластеронов не являются уникальными для Среднего Урала. Однако 3 кластера – 3I (Азиатская группа кластеронов), 3O и 3Q (Восточно-европейская группа) – встречаются только на этой территории и представляют особый интерес. Филогенетический анализ показал, что эти кластероны характеризуются клональным происхождением и низким генетическим разнообразием штаммов, что дает основание предполагать их недавнее происхождение (рис. 4, б). Кластерон 3Q (5 штаммов) имеет коридорный тип распределения с юга на север и встречается вдоль трассы Екатеринбург – Серов (см. рис. 3, а). По всей видимости, он является производным кластера 3B (см. рис. 4, б), от которого отличается одной аминокислотной заменой (Ser вместо Phe в позиции 165 белка E). Возраст кластера 3Q составил около 28 (24–37) лет. Кластерон O (3 штамма) имеет локальный тип распределения (окрестности г. Камышлов) и происходит от кластера 3D (см. рис. 4, а, б). Возраст этого кластера составляет всего 14 (12–17) лет. Локальный тип распределения характерен и для кластера 3I (пригород г. Березовский). Его возраст составил 42 (36–52) года.

Присутствие “молодых” кластеронов в природных очагах может свидетельствовать об активном эволюционном процессе, происходящем в популяциях ВКЭ в настоящее время. Филогенетическая близость штаммов в этих кластерах не оставляет сомнений в их клональном происхождении (см. рис. 4, б). Для «молодых» кластеронов естественно предположить локальный тип распределения, что и подтверждается на примере кластеронов 3O и 3I. Однако для кластера 3Q был отмечен коридорный тип (см. рис. 4, а). Штаммы этого кластера обнаружены исключительно вдоль трассы Екатеринбург – Серов протяженностью около 340 км, а также в окрестностях Екатеринбурга. На преодоление этого расстояния, если исходить из возраста кластера, должно было уйти не более 30 лет. Причины высокой скорости распространения штаммов этого кластера, а также близость к транспортным путям дают возможность предположить, что в основе распространения кластера 3Q лежит хозяйственная деятельность человека. При этом такая деятельность должна быть масштабной и действовать в течение времени, достаточного для переноса штаммов на большое расстояние. После тщательного сопоставления времени проводимых на интересующем нас участке долгосрочных масштабных мероприятий мы пришли к выводу, что распространение штаммов данного

кластера могло произойти в результате строительства автомобильной трассы Екатеринбург – Серов. Строительство велось 11 лет (с 1975 по 1985 г.) преимущественно в одном направлении (от Екатеринбурга). Домашние животные, синантропные виды зверей и птиц, сопровождавшие бригады дорожных строителей на протяжении всего времени строительства, вероятно, были основной причиной распространения зараженных вирусом клещей на большие расстояния за относительно короткое время. Примечательно, что кластерон 3I, распространенный в Березовском районе (окрестности Екатеринбурга), сохранил локальный тип распределения, несмотря на свое более раннее происхождение. На этом примере видно, что 2 кластера, территориально близко расположенные друг к другу, имеют разную судьбу, определяемую влиянием человека. Обладают ли “молодые” кластероны селективным преимуществом, внесут ли они изменения в структуру популяции ВКЭ-Сиб или исчезнут, покажут дальнейшие исследования.

Таким образом, процессы распространения ВКЭ, связанные с антропогенным фактором, могут проходить и в настоящее время, что необходимо учитывать при проведении мероприятий по неспецифической профилактике КЭ, а также разработке новых принципов мониторинга природных очагов.

Необходимо отметить, что кластеронный подход имеет некоторые ограничения и может рассматриваться скорее в качестве дополнения, а не альтернативы филогенетическому анализу. В отличие от последнего он позволяет учесть не только генетическую, но и фенотипическую изменчивость вируса, проявляющуюся в возникновении адаптивных замен аминокислот белка E у кластеронов – групп штаммов с одинаковым фенотипом. Значение таких адаптаций в эволюции ВКЭ еще предстоит выяснить. Кластеронный подход, помимо научного, может иметь и прикладное значение, например использоваться региональными службами Роспотребнадзора для проведения эпидемиологического мониторинга КЭ и оценки влияния изменчивости вируса на эффективность средств диагностики, профилактики и лечения.

В настоящей статье мы привели примеры использования определенного фрагмента вирусного генома и отметили его перспективность для унификации молекулярно-эпидемиологических исследований ВКЭ. Мы не беремся утверждать, что предложенный фрагмент генома является наиболее оптимальным вариантом, однако в связи со сложностями полногеномного секвенирования его повсеместное использование позволит объединить усилия исследователей из разных регионов России и других стран в изучении КЭ.

Благодарности. Авторы выражают благодарность Б.А. Галишеву, В.Л. Умпелеву, Т.А. Пименовой и Т.Э. Снитковской за помощь в сборе клещей и организацию экспедиций.

Финансирование. Настоящая работа была поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований № 16-04-00329 А.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–19, 21 см. REFERENCES)

20. Карань Л.С., Погодина В.В., Фролова Т.В., Платонов А.Е. Генетические различия восточно-европейской азиатской популяции вируса клещевого энцефалита сибирского подтипа. *Бюллетень сибирской медицины*. 2006; 5: 24–7.
22. Шелкова Е.С., Ковтун О.П., Романенко В.В. Клинико-

эпидемиологические особенности клещевого энцефалита в Свердловской области в периоде массовой иммунизации. *Неврологический вестник*. 2007; 39 (1): 75–9.

REFERENCES

- Schulte P.A., Perera F.P. *Molecular Epidemiology: Principles and Practices*. Orlando, FL: Academic Press. 1993.
- Mandl C.W., Kroschewski H., Allison S.L., Kofler R., Holzmann H., Meixner T. et al. Adaptation of tick-borne encephalitis virus to BHK-21 cells results in the formation of multiple heparan sulfate binding sites in the envelope protein and attenuation in vivo. *J. Virol.* 2001; 75 (12): 5627–37.
- Romanova L., Gmyl A.P., Dzhivanian T.I., Bakhmutov D.V., Lukashev A.N., Gmyl L.V. et al. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation. *Virology*. 2007; 362 (1): 75–84.
- Chan M.S., Maiden M.C., Spratt B.G. Database-driven multi locus sequence typing (MLST) of bacterial pathogens. *Bioinformatics*. 2001; 17 (11): 1077–83.
- Perez-Losada M., Browne E.B., Madsen A., Wirth T., Viscidi R.P., Crandall K.A. Population genetics of microbial pathogens estimated from multilocus sequence typing (MLST) data. *Infect. Genet. Evol.* 2006; 6 (2): 97–112.
- Kovalev S.Y., Mukhacheva T.A. Clusteron structure of tick-borne encephalitis virus populations. *Infect. Genet. Evol.* 2013; 14:22–8.
- Kovalev S.Y., Mukhacheva T.A. Clusterons as a Tool for Monitoring Populations of Tick-Borne Encephalitis Virus. *J. Med. Virol.* 2014; 86 (2):283–9.
- Kovalev S.Y., Chernykh D.N., Kokorev V.S., Snitkovskaya T.E., Romanenko V.V. Origin and distribution of tick-borne encephalitis virus strains of the Siberian subtype in the Middle Urals, the north-west of Russia and the Baltic countries. *J. Gen. Virol.* 2009; 90 (Pt. 12): 2884–92.
- Roehrig J.T. Antigenic structure of flavivirus proteins. *Adv. Virus Res.* 2003; 59: 141–75.
- Zanotto P.M., Gao G.F., Gritsun T., Marin M.S., Jiang W.R., Venugopal K. et al. An arbovirus cline across the northern hemisphere. *Virology*. 1995; 210 (1): 152–9.
- McGuire K., Holmes E.C., Gao G.F., Reid H.W., Gould E.A. Tracing the origins of louping ill virus by molecular phylogenetic analysis. *J. Gen. Virol.* 1998; 79 (Pt. 5): 981–8.
- Gao G.F., Hussain M.H., Reid H.W., Gould E.A. Classification of a new member of the TBE flavivirus subgroup by its immunological, pathogenetic and molecular characteristics: identification of subgroup-specific pentapeptides. *Virus Res.* 1993; 30 (2): 129–44.
- Mandl C.W., Holzmann H., Kunz C., Heinz F.X. Complete genomic sequence of Powassan virus: evaluation of genetic elements in tick-borne versus mosquito-borne flaviviruses. *Virology*. 1993; 194 (1): 173–84.
- Marin M.S., Zanotto P.M., Gritsun T.S., Gould E.A. Phylogeny of TYU, SRE, and CFA virus: different evolutionary rates in the genus *Flavivirus*. *Virology*. 1995; 206 (2): 1133–9.
- Suzuki Y. Multiple transmissions of tick-borne encephalitis virus between Japan and Russia. *Genes Genet. Syst.* 2007; 82 (3): 187–95.
- Zanotto P.M., Gould E.A., Gao G.F., Harvey P.H., Holmes E.C. Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93 (2): 548–53.
- Weidmann M., Ruzek D., Krivanec K., Zoller G., Essbauer S., Pfeffer M. et al. Relation of genetic phylogeny and geographical distance of tick-borne encephalitis virus in central Europe. *J. Gen. Virol.* 2011; 92 (Pt. 8): 1906–16.
- 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; 80 (Pt. 1): 179–85.
- Golovljova I., Katargina O., Geller J., Tallo T., Mittzenkov V., Vene S. et al. Unique signature amino acid substitution in Baltic tick-borne encephalitis virus (TBEV) strains within the Siberian TBEV subtype. *Int. J. Med. Microbiol.* 2008; 298 (S. 1): 108–20.
- Karan' L.S., Pogodina V.V., Frolova T.V., Platonov A.E. Genetic diversity of East European and Asian strains of tick-borne encephalitis virus belonging to Siberian genotype. *Bull. sib. med.* 2006; (5): 24–7. (in Russian)
- Bandelt H.J., Forster P., Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 1999; 16 (1): 37–48.
- Shelkova E.S., Kovtun O.P., Romanenko V.V. Clinico-epidemiologic peculiarities of tick-borne encephalitis in the Sverdlovsk region during mass immunization. *Nevrologicheskiy vestnik*. 2007; 39 (1): 75–9. (in Russian)

Поступила 02.09.14

Принята в печать 25.09.14

НЕКРОЛОГИ

ПАМЯТИ ОЛЕГА ИВАНОВИЧА КИСЕЛЕВА



Администрация ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России с глубоким прискорбием сообщает о скоропостижной кончине на 71-м году жизни директора Института, академика РАН, профессора Олега Ивановича Киселёва.

Олег Иванович родился в Магнитогорске 5 сентября 1945 г. Закончил Ленинградский государственный медицинский институт им. И.П. Павлова. По окончании института в 1968 г. поступил в аспирантуру Научно-исследовательского института экспериментальной медицины АМН СССР, в лабораторию биохимической генетики. В 1971 г. защитил кандидатскую диссертацию по медицине, в 1982 г. получил степень доктора биологических наук. С 1983 по 1988 г. работал в различных учреждениях Министерства медицинской и микробиологической промышленности СССР. В 1988 г. возглавил Всесоюзный научно-исследовательский институт гриппа Минздрава СССР.

Олег Иванович Киселёв был одним из ведущих специалистов в области биохимии, молекулярной биологии вирусов и биологической безопасности. Под его руководством выполнялись работы по конструи-

рованию противовирусных препаратов, созданию генно-инженерных вакцин. Он являлся инициатором и участником международных научных проектов. В качестве советника Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) и руководителя Национального центра по гриппу ВОЗ внес значительный вклад в развитие международного сотрудничества по вопросам надзора и контроля за гриппом и ОРВИ на территории России и в мире. О.И. Киселёв возглавлял Совет Санкт-Петербургского отделения Российского общества биохимиков и молекулярных биологов РАН, входил в состав редакционных коллегий научных и медицинских журналов. О.И. Киселёвым создана школа молекулярных биологов и генных инженеров.

Олег Иванович Киселёв — профессор, академик РАН, лауреат премий Правительства Российской Федерации в области науки и техники, награжден медалью ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени.

Российская наука понесла невосполнимую утрату: ушел из жизни талантливый ученый, наставник и принципиальный руководитель.

*ФГБУ "Научно-исследовательский институт гриппа"
Редакционная коллегия журнала «Вопросы вирусологии»*