

ISSN 0507-4088 (Print)  
ISSN 2411-2097 (Online)



Д.И.ИВАНОВСКИЙ

# ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

3

---

Том 60 • 2015



Издательство  
"МЕДИЦИНА"

[www.medlit.ru](http://www.medlit.ru)

Volume 60 • Issue 3 • 2015

**РОССИЙСКАЯ  
АКАДЕМИЯ  
НАУК**

Журнал "Вопросы вирусологии" представлен в следующих международно-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

ЛР № 010215 от 29.04.97

**Почтовый адрес:**

115088, Москва,  
ул. Новоостановская, д. 5, стр. 14,  
ОАО "Издательство "Медицина"

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

Зав. редакцией **Т. М. Курушина**  
Тел. +7-495-678-63-95

E-mail: [vopr.virusol@idm.msk.ru](mailto:vopr.virusol@idm.msk.ru)  
[www.medlit.ru](http://www.medlit.ru)

**ОТДЕЛ РЕКЛАМЫ**

Тел./факс +7-495-678-64-84

E-mail: [info@idm.msk.ru](mailto:info@idm.msk.ru)

[www.medlit.ru](http://www.medlit.ru)

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

Редактор **Е.П. Мороз**

Художественный редактор  
**А. В. Минаичев**

Технический редактор  
**Т. В. Нечаева**

Корректор **В. С. Смирнова**

Переводчик **С. К. Чаморовский**

Верстка **Е. М. Архипова**

Сдано в набор 05.03.2015.

Подписано в печать 29.04.2015.

Формат 60 × 88%.

Печать офсетная.

Печ. л. 6,00.

Усл. печ. л. 5,88.

Уч.-изд. л. 6,36.

Заказ 282.

Отпечатано в типографии ООО

"Подольская Периодика",

142110, г. Подольск, ул. Кирова, 15

ISSN 0507-4088. *Вопр. вирусологии.* 2015.

Т. 60. №3 1-48

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.

**3**

**Том 60 · 2015**

### 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.)

Белуосова Р.В. (д.в.н., проф.)

Галегов Г.А. (д.б.н., проф.)

Гендон Ю.З. (д.м.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.п., проф., акад. РАН; Москва, Россия)

**Бугаев 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 Л.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.п., 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.п., 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)

**Яшгулов 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 Л.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, M.Sc.; 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 60 • 3 • 2015**

**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.; **Gendon Yu.Z.** – MD, PhD, DSc, 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 F.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)

**Drozhdov 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)

**Berencsi 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)

**Maneckarn 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

- Смирнова К.В., Дидук С.В., Сенюта Н.Б., Гурцевич В.Э.* Молекулярно-биологические свойства гена LMP1 вируса Эпштейна–Барр: структура, функции и полиморфизм. . . . . 5
- Петров А.А., Плеханова Т.М., Сидорова О.Н., Борисевич С.В., Махлай А.А.* Вакцины на основе РНК-репликона вируса венесуэльского энцефаломиелита лошадей против вирусных геморрагических лихорадок. . . . . 14

### ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

- Карпова Л.С., Соминина А.А., Бурцева Е.И., Пелих М.Ю., Феодоритова Е.Л., Поповцева Н.М., Столярова Т.П., Киселев О.И.* Сравнение эпидемий гриппа в России, вызванных пандемическим вирусом гриппа A(H1N1)pdm09 в период с 2009 по 2013 г. . . . . 19
- Иванова В.Т., Иванова М.В., Сапурина И.Ю., Бурцева Е.И., Трушакова С.В., Исаева Е.И., Кириллова Е.С., Степанова Н.В., Оскерко Т.А., Маныкин А.А.* Сравнительное исследование углеродных нанотрубок и полимерных композитов, содержащих наночастицы серебра, в качестве сорбентов вирусов гриппа А и В. . . . . 25
- Лободанов С.А., Киселев И.С., Аммура Ю.И., Горбаленя А.Е., Клаас Е.С.Дж., Зверев В.В., Фаизулоев Е.Б.* Исследование видовой структуры риновирусов и коронавирусов, циркулировавших в Московском регионе в период с 2007 по 2012 г. . . . . 31
- Грибкова Н.В., Сивец Н.В., Шмелева Н.П., Чешенок Е.В., Лапо Т.П., Аношко О.Н.* Этиология ОРВИ среди госпитализированных детей в Республике Беларусь в 2011 и 2012 гг. . . . . 37
- Рыжов К.А., Носик М.Н., Кравченко А.В.* Изменчивость регуляторных генов ВИЧ-1, выявляемых с помощью полимеразной цепной реакции. . . . . 41
- Джигоев Ю.П., Парамонов А.И., Рева О.Н., Букин Ю.С., Козлова И.В., Демина Т.В., Ткачев С.Е., Злобин В.И.* Детекция потенциальных сайтов рекомбинации вируса клещевого энцефалита методами сравнительной геномики. . . . . 44

## CONTENTS

### REVIEW

- Smirnova K. V., Diduk S. V., Senyuta N. B., Gurtsevitch V.E.* Molecular biological properties of the Epstein-Barr virus LMP1 gene: structure, function, and polymorphism
- Petrov A. A., Plekhanova T. M., Sidorova O. N., Borisevich S. V., Makhlay A. A.* The vaccines based on the replicon of the venezuelan equine encephalomyelitis virus against viral hemorrhagic fevers

### ORIGINAL RESEARCH

- Karpova L. S., Sominina A. A., Burtseva E. I., Pelikh M. Yu., Feodoritova E. L., Popovtseva N. M., Stolyarova T. P., Kiselev O. I.* Comparison of the influenza epidemics in Russia caused by the pandemic virus A(H1N1)pdm09 within the period from 2009 to 2013
- Ivanova V. T., Ivanova M. V., Sapurina I. Yu., Burtseva E. I., Trushakova S. V., Isaeva E. I., Kirillova E. S., Stepanova H. V., Osцерко T. A., Manykin A. A.* Comparative study of carbon nanotubes and polymer composites with silver as sorbents of the influenza A and B viruses
- Lobodanov S. A., Kiselev I. S., Ammour Y. I., Gorbalenya A. E., Claas E. C. J., Zverev V. V., Faizuloev E. B.* The prevalence of the human rhinoviruses and coronaviruses circulating in the Moscow region during 2007-2012
- Gribkova N. V., Sivets N. V., Shmaliyova N. P., Cheshenok T. V., Lapo T. P., Anoshka V. M.* The ARI etiology among children in Belarus in 2011-2012
- Ryzhov K. A., Nosik M. N., Kravtchenko A. V.* A Study of the HIV-1 regulatory genes using the polymerase chain reaction
- Dzhigoev Yu. P., Paramonov A. I., Reva O. N., Bukin Yu. S., Kozlova I. V., Demina T. V., Tkachev S. E., Zlobin V. I.* Detection of potential sites of recombination in the tick-borne encephalitis virus by the methods of comparative genomics

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

Смирнова К.В., Дидук С.В., Сениута Н.Б., Гурцевич В.Э.

### Молекулярно-биологические свойства гена *LMP1* вируса Эпштейна–Барр: структура, функции и полиморфизм

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», 115478, г. Москва

Исследования последних лет свидетельствуют о том, что латентный мембранный белок 1 (*LMP1*), кодируемый одноименным геном вируса Эпштейна - Барр (ВЭБ), играет чрезвычайно важную роль в патогенезе ряда злокачественных неоплазий, что обусловлено свойствами этого вирусного онкобелка. В частности, *LMP1* обладает способностью трансформировать В-лимфоциты человека *in vivo* и *in vitro*, а также фибробласты грызунов (*Rat-1*) *in vitro*, введение которых бестимусным мышам приводит к возникновению опухолей. Кроме того, экспрессию онкобелка часто обнаруживают в ВЭБ-ассоциированных опухолях на уровне ДНК и постоянно на уровне РНК. *LMP1*, оказывая плейотропное действие, участвует в передаче многочисленных внутриклеточных сигналов, активируя многие из них. Он также участвует в ингибировании ключевых опухолевых супрессоров, оказывает существенное влияние на пролиферацию, апоптоз, морфологические изменения инфицированных клеток, приводя в конечном счете к их трансформации. В предлагаемом обзоре дана общая характеристика ВЭБ, кратко описаны заболевания человека, ассоциированные с этим вирусом, представлена общая характеристика гена *LMP1* и функциональная активность кодируемого им белка *LMP1*, подробно рассмотрен вопрос, касающийся полиморфизма *LMP1* при ВЭБ-ассоциированных патологиях.

Ключевые слова: вирус Эпштейна–Барр; белок *LMP1* ВЭБ; полиморфизм; сигнальные пути.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(3): 5–13.

K.V. Smirnova, S.V. Diduk, N.B. Senyuta, V.E. Gurtsevitch

### Molecular biological properties of the Epstein-Barr virus *LMP1* gene: structure, function and polymorphism

Federal State Budgetary Scientific Institution "N.N.Blokhin Cancer Research Center", 115478, Moscow, Russia

Recent studies indicate that the latent membrane protein 1 (*LMP1*) encoded by the same name gene of the Epstein-Barr virus (EBV) plays an extremely important role in the pathogenesis of a number of malignant neoplasia. Specifically, *LMP1* has the ability to transform human B-lymphocytes *in vivo* and *in vitro* and rodent fibroblasts (*Rat-1*) *in vitro*. The introduction of the latter into athymic mice leads to tumor development. In addition, expression of the oncoprotein has been often found in EBV-associated tumors at the DNA and constantly at the RNA levels. Having pleiotropic effects, *LMP1*, participates in the transmission and activation of multiple intracellular signals. It is also involved in the inhibition of key tumor suppressors, has significant influence on proliferation, apoptosis and morphological alteration of the infected cells finally resulting in their transformation. General characteristics of EBV and *LMP1* gene as well as functional activity of the encoded *LMP1* protein and a brief description of human pathologies associated with the virus have been discussed in this review. The questions concerning the polymorphism *LMP1* in EBV-associated pathologies have been also analyzed in details.

Key words: Epstein-Barr virus (EBV); *LMP1* protein; polymorphism; signaling pathways.

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(3): 5–13. (In Russ.)

For correspondence: Kseniya Smirnova, MD, PhD; e-mail: smirnovakv@rambler.ru

Received 13.03.14

---

#### Общая характеристика вируса Эпштейна–Барр

Открытие вируса Эпштейна–Барр тесно связано с изучением лимфомы Беркитта. В 1958 г. английский хирург Денис Парсон Беркитт, работая в странах Центральной Африки, впервые описал клинико-патологическую картину ранее неизвестной болезни, впоследствии названной лимфомой Беркитта. В 1961 г. в Мидлсекском госпитале (Middlesex Hospital) Лондона Д. Беркитт изложил свои наблюдения в докладе, заинтересовавшем английского вирусолога Энтони Эпштейна, что положило начало их сотрудничеству. В 1963 г. проф. Эпштейну и д-ру Барр удалось получить стабильную клеточную линию из биопсии опу-

холи, предоставленной Д. Беркиттом. В результате электронно-микроскопического исследования полученной клеточной линии Э. Эпштейн, И. Барр и Б. Ачонг (специалист по электронной микроскопии) обнаружили вирусные частицы. Дальнейшее изучение морфологических и биологических характеристик вируса позволило отнести его к семейству герпесвирусов человека, поскольку этот вирус не реагировал с антителами к уже известным на то время представителям других семейств герпесвирусов. Он также не оказывал цитопатического действия на содержащие его клетки, но при этом способствовал неограниченному росту В-лимфоцитов. Впоследствии этот вирус

был назван именами открывших его исследователей, т.е. вирусом Эпштейна - Барр (ВЭБ) [1].

В соответствии с данными Международного комитета по таксономии вирусов ВЭБ относится к семейству *Herpesviridae*, подсемейству *Gammaherpesvirinae*, роду *Lymphocryptovirus*, виду *Human herpesvirus 4*. Спектр хозяев для *Lymphocryptovirus* ограничивается отрядом приматов Старого Света, при этом единственным природным хозяином ВЭБ является человек. Сероэпидемиологические исследования выявили убиквитарный характер распространения ВЭБ в человеческой популяции. Известно также, что представители *Gammaherpesvirinae* способны реплицироваться в лимфобластоидных клеточных линиях, а некоторые из них, в том числе и ВЭБ, могут вызывать литическую инфекцию в эпителиальных клетках.

Инфицирование ВЭБ происходит в результате связывания вирусного мембранного гликопротеина gp350/220 с молекулой CD21, которая является поверхностным рецептором В-клеток, служащих мишенями для ВЭБ. Высокий уровень экспрессии CD21 на поверхности В-лимфоцитов и, вероятно, в меньшей степени на поверхности эпителиоцитов и некоторых Т-клеток объясняет тропизм вируса к этим типам клеток [1]. Проникновение ВЭБ в нормальные В-лимфоциты осуществляется путем рецепторного эндоцитоза. В результате слияния вирусной и эндосомной мембран происходит переход нуклеокапсида ВЭБ в цитоплазму клетки. В случае инфицирования эпителиальных клеток проникновение вирусного нуклеокапсида осуществляется, по-видимому, в результате непосредственного слияния вирусной мембраны с клеточной [1].

Подобно другим представителям семейства *Herpesviridae* ВЭБ характеризуется наличием непродуктивного (латентного) и продуктивного (литического) типов инфекции. Анализ экспрессии вирусного генома в ВЭБ-ассоциированных опухолях позволил выделить 3 основных типа латентной инфекции, каждый из которых играет критическую роль в клеточной трансформации. При этом обязательным условием опухолевой трансформации клетки является экспрессия части или всех вирусных латентных генов, кодирующих мембранные (LMP1, LMP2A, LMP2B) и ядерные (EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, EBNA-LP) белки [1].

#### **Заболевания человека, ассоциированные с ВЭБ**

ВЭБ обладает онкогенным потенциалом, что проявляется его способностью инфицировать и трансформировать В-лимфоциты и эпителиальные клетки хозяина. Инфицирование ВЭБ в раннем детском возрасте протекает бессимптомно, более поздний контакт с вирусом в ~50% случаев приводит к инфекционному мононуклеозу - доброкачественному лимфопрлиферативному заболеванию. ВЭБ также ассоциирован с рядом злокачественных неоплазий человека разного гистогенеза. К новообразованиям лимфоидного происхождения, ассоциированным с ВЭБ, относятся лимфома Беркитта, лимфома Ходжкина (ЛХ), В-клеточные лимфомы, в основе которых лежат врожденные или приобретенные иммунодефициты, а также В-лимфопрлиферативные посттрансплантационные лимфомы. Обнаружение генома вируса в эпителиоцитах рака носоглотки (РНГ) и рака желудка (РЖ) также указывает на причастность ВЭБ к возникновению этих патологий [1].

Большой неожиданностью явилось обнаружение связи между ВЭБ-инфекцией и Т-клеточными лимфомами. В настоящее время обнаружено, что ВЭБ ассоциирован по крайней мере с тремя типами Т-клеточных лимфом, включая: лимфомы, ассоциированные с так называемым гемофагоцитарным синдромом; группу назальных Т/НК-клеточных лимфом; периферические Т-клеточные лимфомы ангиоиммунобластического типа [2]. Есть также основания предполагать причастность ВЭБ к генезу кожных Т-клеточных лимфом, включая грибовидный микоз [2].

Особого внимания заслуживает связь ВЭБ с заболеваниями, в основе патогенеза которых лежит малигнизация эпителиальных клеток. К числу последних относятся не только РНГ и РЖ, но также рак миндалин, тимуса и некоторые другие опухоли эпителиального происхождения. В то же время сложный механизм проникновения, распространения и установления вирусной латентной инфекции в нормальных и патологически измененных клетках остается не до конца изученным. Широкое распространение вируса в сочетании с географической и расовой избирательностью для ряда ВЭБ-ассоциированных неоплазий, позволяет сделать вывод о необходимости присутствия дополнительных факторов в возникновении этих патологий.

#### **Общая характеристика, регуляция активности гена *LMP1***

*LMP1 (BNLF1)* - это ген ВЭБ, кодирующий поздний латентный трансмембранный белок 1 (*LMP1*), являющийся основным трансформирующим белком вируса. Транскрипция гена *LMP1* осуществляется в противоположном направлении по отношению к большинству других латентных генов ВЭБ. *LMP1* обладает тремя различными рамками считывания, локализованными в области BamHI-N вируса. Белок способен трансформировать различные культуры клеток грызунов (NIH/3T3, BALB/3T3, Rat-1 и др.), кератиноциты человека [3], а также играет ключевую роль в иммортализации и пролиферации В-лимфоцитов человека *in vitro* [4].

*LMP1* представляет собой белок массой 63 кДа, состоящий из 386 аминокислотных (а.к.) остатков (рис. 1). В состав молекулы белка входят 6 трансмембранных доменов (162 а.к.) и 2 цитоплазматических - короткий N-терминальный (24 а.к.) и длинный C-терминальный домены (200 а.к.). Каждый из доменов *LMP1* играет определенную структурно-функциональную роль. Так, трансмембранные гидрофобные домены белка не только участвуют в его закреплении в цитоплазматической мембране, но и влияют на олигомеризацию его молекул, что важно для процесса передачи внутриклеточных сигналов [5]. Кроме того, показано, что именно трансмембранный домен *LMP1* обуславливает цитостатическое/цитотоксическое воздействие на клетку [6]. Аминотерминальный цитоплазматический домен *LMP1* в большей степени, чем другие домены, причастен к локализации молекулы белка в мембране, а также участвует в процессе его убиквитинирования и последующей деградации [7]. В состав карбокситерминального цитоплазматического домена *LMP1* входят две C-терминальные трансактивирующие области (CTAR): и проксимальная CTAR1 (194 - 232 а.к.), и дистальная CTAR2 (351 - 386 а.к.) области ответственны за активацию целого

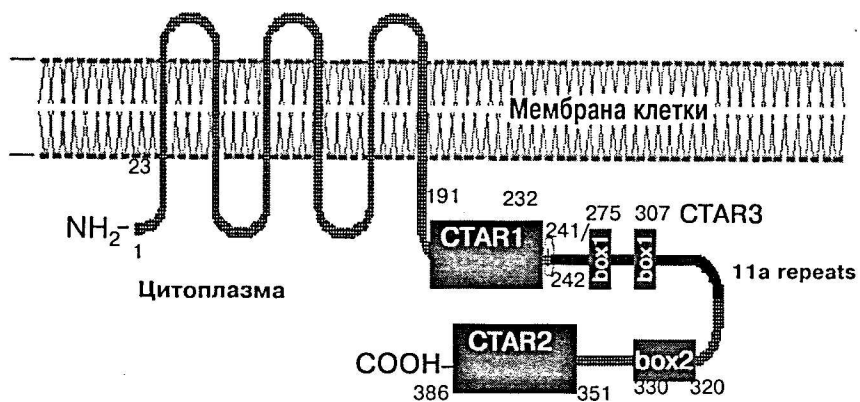


Рис. 1. Схематическое изображение структуры латентного мембранного белка 1 (LMP1) вируса Эпштейна-Барр.

STAR – С-терминальные трансактивирующие области LMP1. Проксимальная STAR1 (194–232 а.к.) и дистальная STAR2 (351–386 а.к.) трансактивируют целый спектр клеточных сигнальных каскадов, внося вклад в трансформирующий потенциал LMP1. STAR3 (275–330 а.к.) предположительно отвечает за активацию STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription) посредством привлечения нерецепторной Janus тирозинкиназы 3 (JAK3).

Два мотива box1 (275–280 и 302–307 а.к. соответственно) и один мотив box2 (320–330 а.к.) – консенсусные сайты LMP1, взаимодействующие с членами JAK семейства и, как предполагается, их активирующие.

ряда клеточных сигнальных каскадов, что определяет значение этих участков в трансформирующем потенциале LMP1 [1]. Ряд исследователей выделяет дополнительную область – STAR3 (275–330 а.к.), которая предположительно отвечает за активацию STAT3 посредством привлечения JAK3 [8]. Кроме того, недавно показано, что STAR3 посредством взаимодействия с Ubc9 может участвовать в LMP1-опосредованной миграции трансформированных клеток [9].

В регуляции транскрипции *LMP1* принимают участие многие белки ВЭБ. Так, EBNA2 (ядерный антиген 2 вируса ВЭБ) выполняет роль *транс*-активатора вирусных генов, включая *LMP1*, *LMP2A*, *LMP2B* и вирусный промотор Cp, а также клеточных протоонкогенов *c-fgr* и *c-myc*. Помимо EBNA2 в регуляции транскрипции LMP1 принимают участие и другие вирусные белки. На клеточной линии лимфомы Беркитта показано, что белок EBNA-LP может стимулировать EBNA2-опосредованную активацию *LMP1*. Другой латентный белок EBNA-3C также выступает в роли коактиватора транскрипции *LMP1* посредством его взаимодействия с транскрипционным фактором PU.1, что подтверждается активацией экспрессии репортерных генов с PU.1 связывающих сайтов [10].

При литическом типе инфекции наблюдается образование укороченной формы белка LMP1, что связано с экспрессией гена *LMP1* с промотора ED-L1A. Молекулярная масса образуемого так называемого литического белка LMP1 (lyLMP1, также известного как D1LMP1 или trLMP1) составляет 45 кДа. Промотор ED-L1A локализован в 1-м интроне гена *LMP1* и присутствует во всех вариантах ВЭБ [11]. Однако инициация трансляции lyLMP1 зависит от наличия метионина в стартовом кодоне в 129 положении в третьем экзоне открытой рамки считывания. Если в этом положении располагается изолейцин, трансляция lyLMP1 с промотора ED-L1A блокируется [12].

В настоящее время биологическая роль белка варианта lyLMP1 понятна не до конца. Установлено, что этот белок не активирует сигнальные пути, его

экспрессия не приводит к трансформации клетки, более того, он даже может ингибировать некоторую сигнальную активность LMP1 [12]. Эпидемиологические исследования гена *LMP1* показали, что его литический вариант присутствует у 60% изолятов ВЭБ, циркулирующих у больных с различными ВЭБ-ассоциированными патологиями, и совсем не выявляется среди изолятов *LMP1*, выделенных из опухолевой ткани недифференцированного РНГ носоглотки [13]. Подобные наблюдения наводят на мысль о том, что селективное эволюционное давление, возможно, направлено на подавление экспрессии литической формы белка при данной патологии. Этот эффект, по-видимому, связан с доминантно-негативной регуляцией онкогенной активности белка LMP1, вызванной молекулой lyLMP1 [14].

#### Функциональная активность белка LMP1

Молекула LMP1 по своим функциональным и структурным особенностям напоминает постоянно активированный лиганднезависимый рецептор. LMP1 способен взаимодействовать с адапторными молекулами TRAF, что позволяет сопоставлять этот белок с клеточными рецепторами TNFR1 (рецептором фактора некроза опухоли1) и CD40 [1]. Такая особенность LMP1 обуславливает его участие в передаче внутриклеточных сигналов (рис.2.). Белок LMP1 индуцирует по крайней мере 7 сигнальных путей, 5 из которых активируются карбоксильным цитоплазматическим доменом молекулы. Как упоминалось выше, в составе LMP1 выделяют несколько функционально активных областей, наиболее значимые из них (STAR1 и STAR2) ответственны за непосредственное взаимодействие со специфическими клеточными факторами и активацию ряда сигнальных путей, таких как NF-κB, JNK, p38 MAPK, JAK/STAT и PI3-K/Akt [1].

Наиболее значимым среди активируемых сигнальных каскадов является активация транскрипционного фактора (ТФ) NF-κB, который в свою очередь трансактивирует большое количество генов, играющих ключевую роль в иммунитете и воспалительных реакциях организма, а также в регуляции клеточной пролиферации, апоптоза и миграции клеток. Экспериментально подтверждено, что STAR2 является более сильным активатором NF-κB, чем STAR1, и ответственен примерно за 70–80% общей NF-κB-активности, опосредованной LMP1 [1].

Следует отметить характерные особенности LMP1 в рекрутировании адапторных молекул. В более ранних работах, исследовавших этот процесс, показано, что для активации NF-κB белок LMP1 рекрутирует TRADD- и TRAF2- молекулы аналогично рецептору TNFR1 [15, 16], хотя в работе L. Wu и соавт. установлено, что канонический путь активации ТФ NF-κB молекулой LMP1 осуществляется через взаимодействие STAR2-области с TRAF6-TAK1-IKKβ. При этом показано, что в отличие от рецептора TNFR1 молекулы TRADD, MyD88,



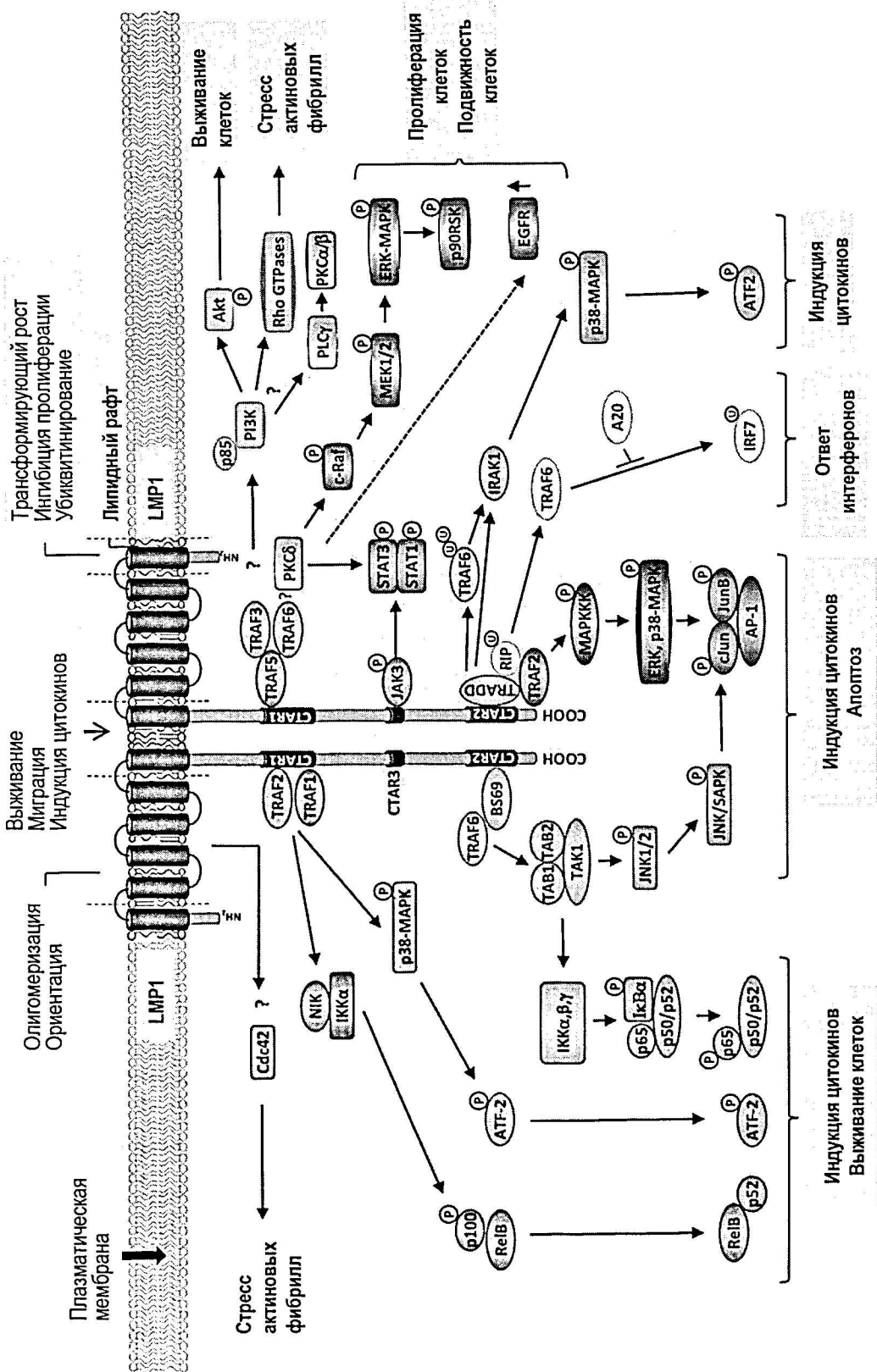


Рис. 2. Сигнальные пути онкобелка LMP1, кодируемого вирусом Эпштейна-Барр.

Представлены основные функциональные свойства N-терминальной, трансмембранной и C-терминальной областей LMP1 и активируемые ими клеточные сигнальные пути. C-терминальная область содержит 3 сигнальных домена (STAR1, STAR2 и STAR3), которые рекрутируют TNFR-ассоциированные сигнальные адапторы (TRAF, TRADD, RIP), BS69 и JAK-3 белки. Эти белки активируют такие сигнальные пути, как NF-κB, JNK/SAPK, PI3-K/Akt, ERK-MAPK, PLC/PKC, JAK/STAT, которые совместно индуцируют экспрессию антогенных расположенных ниже эффекторов, вносящих вклад в разнообразие клеточные процессы - пролиферацию и выживаемость, мобильность и инвазию.

U – убиквитинирование; P – фосфорилирование.

Модификация рис. 1 из статьи Dawson C.W. et al. Seminars in Cancer Oncology. 2012; 22:144–53.

IRAK1/4, TAB2 и MEK1 не являются необходимыми для активации ТФ NF-κB белком LMP1 [17]. Кроме того, неканонический (альтернативный) путь активации NF-κB осуществляется посредством взаимодействия STAR1-области с молекулами TRAF3-NIK-IKKα [18].

Интересной представляется созданная модель, объясняющая понижение чувствительности клеток, трансформированных LMP1, к ростиингибирующему сигналу. На данной модели показано, каким образом LMP1 может нарушать Smad-опосредованную транскрип-

цию через взаимодействие активированного ТФ NF- $\kappa$ B с гистоновой ацетил-трансферазой p300/CBP [19, 20].

При различных стрессовых воздействиях на клетку (УФ-радиация, тепловой шок) активируется другой (альтернативный NF- $\kappa$ B) сигнальный путь – JNK/AP-1 [21, 22]. Установлено, что при таких стрессовых состояниях в процессе передачи сигнала активное участие принимают члены семейства клеточных рецепторов фактора некроза опухоли TNFR (TNFR1, TNFR2) и CD40 [23, 24]. Активация JNK молекулой LMP1 также может представлять собой клеточный ответ на стресс, вызываемый этим белком. Несмотря на то что активация AP-1, вероятно, осуществляется через STAR2-домен, выявлены варианты LMP1, повышенная способность которых активировать этот транскрипционный фактор, не связана с какими-либо заменами аминокислот в доменах LMP1, в том числе в STAR2 [22]. Согласно данным, полученным рядом авторов, постоянная экспрессия некоторых вариантов LMP1 (LMP1-B95-8 и LMP1-Cao) в различных клеточных линиях сопровождается относительно низким уровнем конститутивной активации AP-1 [25, 26].

Обе области С-концевого цитоплазматического домена LMP1 (STAR1 и STAR2) участвуют в активации еще одного сигнального пути – p38 MAPK [27]. Результатом активации p38 MAPK является усиление экспрессии ИЛ-6 и ИЛ-8. Оба цитокина, как известно, играют важную роль в инициации и поддержании иммунного ответа и острой воспалительной реакции. ИЛ-8 также индуцирует ангиогенез и миграцию клеток и влияет на усиление метастатического потенциала в клетках меланомы [28]. Активация p38 MAPK, по-видимому, является важным событием и в жизненном цикле вируса, на что указывает участие этого сигнального пути в негативной регуляции репликации ВЭБ с Ogp [29].

Способность LMP1 активировать фосфатидилинозит-3-киназный сигнальный путь (PI3-K/Akt) позволяет объяснить многочисленные фенотипические изменения, связанные с экспрессией LMP1 в различных клеточных культурах. Ведущую роль в активации PI3-K/Akt белком LMP1, очевидно, играет домен STAR1. Результатом этой активации являются изменения в цитоскелете клетки, сопровождающиеся значительным увеличением количества актиновых филаментов [30].

Следует также отметить еще один так называемый JAK-STAT-сигнальный путь, в активации которого также принимает участие молекула LMP1. В составе С-концевого цитоплазматического домена LMP1 находятся два идентичных мотива box1 (275 - 280 и 302 - 307 а.к. соответственно) и 1 мотив box2 (320 - 330 а.к.). Мотивы box1 находятся в богатой пролином области повторов LMP1, которая, как полагают, необходима для активации JAK3-киназы [31]. Известно также, что разные варианты LMP1 имеют примерно одинаковый уровень активации этого сигнального пути [30].

Плейотропное действие LMP1 на клетку проявляется и его способностью влиять на активацию синтеза индуцибельной NO-синтазы (iNOS) и продукцию окиси азота (NO) [32]. NO представляет собой свободный короткоживущий радикал, образующийся во многих типах клеток и имеющий важное биологическое значение. В качестве одного из мессенджеров клетки NO участвует в регуляции систем внутри- и межклеточной сигнализации [33]. Являясь активной формой азота, NO наряду с цитокинами влияет на клеточные эффекторные

системы, контролирующие пролиферацию, апоптоз и дифференцировку клетки, а также ее устойчивость к стрессовым воздействиям. Внутриклеточный синтез NO осуществляется ферментом NO-синтазой (NOS). В настоящее время известно 3 изоформы NOS: нейрональная (nNOS, тип I), индуцибельная (iNOS, тип II) и эндотелиальная (eNOS, тип III). Две из них (nNOS и eNOS) конститутивно экспрессируются в клетке, iNOS образуется de novo как ответная реакция клетки на стресс или в результате действия разного рода клеточных цитокинов [34]. Показано, что уровни экспрессии iNOS и синтеза NO в клетке коррелируют со степенью туморогенности вариантов LMP1 и предположительно связаны с наличием Сао-специфической делеции, локализованной в области STAR2 LMP1 [35]. В работе J.Yu и соавт. были впервые выявлены функциональные различия между низкотуморогенным вариантом LMP1-B95-8 и тайваньским высокотуморогенным изолятом LMP1-1510, полученным из опухолевой ткани больного РНГ [35]. Последний из двух указанных вариантов характеризовался неспособностью вызывать индукцию синтазы окиси азота (iNOS) и соответственно синтезировать это химическое соединение (NO). Низкий уровень продукции NO непосредственно коррелировал не только со способностью клеток мышей, трансформированных LMP1-1510, расти в среде без подложки, но и с туморогенностью, тогда как клетки, трансформированные LMP1-B95-8, продуцировали значительные количества NO и не обладали туморогенными свойствами [35].

Известно также, что LMP1 участвует в ингибировании ключевых опухолевых супрессоров (p53 и RASS-F1A), в результате чего обеспечивается резистентность инфицированных ВЭБ клеток к апоптозу [36]. Под влиянием LMP1 p53, действуя как ТФ, стимулирует транскрипционную активность сурвивина, что приводит к быстрому прохождению G1/S-фаз клеточного цикла, не влияя при этом на апоптотический процесс [37]. Кроме того, активность LMP1 играет важную роль в индукции эпителиально-мезенхимального перехода (EMT), усилении клеточной подвижности, связанной с инвазией и метастазированием. EMT сопровождается экспрессией маркеров клеток-предшественников рака и приобретением стволовыми клетками свойств клеток-предшественников [38].

Следует отметить, что за последние годы в изучении функций LMP1 достигнут значительный прогресс. Данные, полученные в результате проведенных исследований позволяют нам приблизиться к пониманию роли LMP1 в целом ряде важных процессов, нарушение которых оказывает существенное влияние на пролиферацию, апоптоз, морфологические изменения клеток, что в конечном счете предопределяет способность нормальной клетки превращаться в злокачественную. Углубленное изучение механизмов трансформации клетки, связанных с нарушением белком LMP1 нормальной работы определенных клеточных сигнальных путей, - основное направление современных исследований.

#### Полиморфизм LMP1 при ВЭБ-ассоциированных патологиях

Интерес к изучению генетической неоднородности LMP1 появился после обнаружения варианта Сао, который был амплифицирован из опухолевой ткани больного РНГ [39]. Указанный вариант гена в основ-

ном обнаруживается в эндемичных для этого заболевания регионах: южных провинциях Китая и странах Юго-Восточной Азии. Для варианта LMP1-Сао и схожих с ним вариантов (1510 и C15) характерно наличие большого числа мутационных изменений [40]. Это и Сао-специфическая делеция 10 а.к., и 3 повтора 11 а.к., локализованные между STAR1- и STAR2-доменами, а также многочисленные точечные мутации. Обнаруженные генетические изменения в LMP1-Сао нашли отражение не только в изменении молекулярной массы этой молекулы, увеличив ее за счет повторов до 66 кДа, но и в увеличении периода полу-жизни белка. Высокая эффективность в активации ряда ТФ и способность трансформировать трансфецированные этим белком клетки также являются отличительными признаками Сао варианта LMP1 [41].

Обнаружение высокотрансформирующих вариантов LMP1, подобных китайскому Сао, тайванскому 1510 и средиземноморскому C15, послужило важным стимулом к проведению серии аналогичных исследований в различных регионах мира. Так, в опухолевой ткани больных ЛХ были обнаружены различающиеся трансформирующие варианты LMP1 [42]. Аналогичные различия были выявлены и в патологических тканях больных острым лимфобластным лейкозом и полицитемией [43]. Данные варианты LMP1 характеризовались отсутствием делеции 30 п.н., а точечные замены а.к. в его белковой молекуле имели уникальный характер, отличный от Сао и других высокотрансформирующих прототипов LMP1. Более того, вариант LMP1-S от больного ЛХ является единственным в настоящий момент вариантом LMP1, имеющим, кроме точечных замен а.к., дополнительную нуклеотидную вставку в 132 п.н. между а.к. 276 и 277 прототипа B95-8; данная вставка кодирует мотив PSQQS, который является потенциальным сайтом связывания для TRAF-молекул.

Результаты первых поисков Сао-подобных изолятов LMP1 при различных ВЭБ-ассоциированных патологиях были весьма многообещающими. Такие изоляты были обнаружены в 10–30% случаев ЛХ в Европе [44], почти во всех случаях РНГ и Т-клеточных лимфом на Тайване [45], в 93% случаев РНГ, лимфом желудка и РЖ в Южном Китае (Гонконг) [46], в 65% случаев в европейских Т-клеточных периферических лимфомах, в 100% малазийских аналогичных лимфом [47], в 100% случаев ЛХ у больных СПИДом, в 90–100% случаев назальных Т/НК-клеточных лимфом в Японии, в ряде случаев ангиоиммунобластических лимфоаденопатий [48, 49], у 43,2% здоровых носителей ВИЧ [50] и т. д. Однако одновременно было показано, что Сао-делеция 30 п.н. обнаруживается и в 85–90% генов LMP1, выделенных от здоровых лиц в тех же самых географических регионах: в эндемичных по РНГ районах южного Китая [46, 51], в Европе [52], Японии и Бразилии [53]. Выявление Сао-подобных генов LMP1 у здоровых лиц как в эндемичных, так и в неэндемичных по ВЭБ-ассоциированным заболеваниям регионам, свидетельствует об отсутствии четкой корреляции между персистенцией штаммов ВЭБ, несущих такие гены, и возникновением этих заболеваний [51].

В настоящее время предполагается, что образование Сао-подобных делеционных мутантов может возникать de novo [54]. При этом в ряде работ высказывается предположение, что процент выявления Сао-вариантов LMP1 выше при условиях, способству-

ющих активной репликации ВЭБ (инфаркт миокарда, хроническая ВЭБ-инфекция, ВЭБ-ассоциированный гемофагоцитарный синдром, посттрансплантационный синдром, различные лимфаденопатии, ротовые волосковые лейкоплакии при СПИДе) [55, 56]. Корреляция между наличием делеции в 30 п.н. и активной репликацией генома ВЭБ хорошо согласуется с моделью, предложенной К. Sandvej и соавт., в соответствии с которой присутствие глициновых повторов R1 и R2 в С-концевой области LMP1 приводит к их неправильному спариванию и в конечном счете к появлению одной делеционной и одной исходной цепей ДНК [52]. Необходимо отметить, что в редких случаях выявляются Сао-подобные мутанты с более обширной делецией данной области в 64 и 69 п.н. [51, 57].

Изучение полиморфизма гена LMP1 и его возможной связи с ВЭБ-ассоциированными заболеваниями позволило получить важную информацию о существовании различных изоформ этого гена и классифицировать их по группам. Такая классификация была предложена К. Sandvej и соавт. на основании анализа изолятов LMP1 из 62 лимфобластоидных клеточных линий, полученных от 34 лиц европейского происхождения без каких-либо признаков ВЭБ-ассоциированного заболевания. Все исследуемые ими образцы изолятов гена были разделены на 4 основные группы, обозначенные как А, В, С и D [52]. Группа А характеризовалась 6 единичными заменами в гене и единичной заменой в промоторе, т.е. образцы LMP1 этой группы были идентичными прототипному варианту LMP1-B95-8. Группа В включала изоляты гена с 4 мутациями в промоторе, 19 единичными заменами в гене, делецией в 15 п.н. и 6 повторами в 33 п.н., но без делеции в 30 п.н., которая была характерна для образцов группы С. Из 44 единичных замен, обнаруженных в этой группе, 35 оказались общими для высокотуморогенного LMP1-Сао и 36 – с клоном 1510. В группу D вошли изоляты, характеризующиеся потерей сайта рестрикции Xho I, а также наличием 35 единичных нуклеотидных замен в области промотора и 66 единичных замен в гене. Важно отметить, что транслированные а.к. варианты группы А, а также представители остальных групп содержат несколько Сао-специфических замен а.к.: I85L (изолейцин на лейцин), F106Y (фенилаланин на тирозин), G212S (глицин на серин) и S366T (серин на треонин). Кроме того, большинство изолятов, относящиеся к любым группам, содержали дополнительные случайные мутации.

#### Классификация гена LMP1

На основании генетически однотипных образцов LMP1, амплифицированных от больных с ВЭБ-ассоциированной патологией и здоровых лиц из различных географических регионов, R. Edwards и соавт. предложили классификацию, составленную с учетом результатов исследования более 400 вариантов последовательностей гена [58]. В этой классификации в основу обозначения вариантов LMP1, таких как Alaskan, China 1(Ch1), China 2 (Ch2), China 3 (Ch3), Mediterranean + (Med+), Mediterranean – (Med-), New York City (NC), легла частота их географической встречаемости. Последующие исследования показали, что частота обнаружения этих вариантов для раз-

личных патологий, ассоциированных с ВЭБ, также существенно варьирует.

Относительно недавно в работе D. Walling и соавт. на основе сиквенсного анализа определенных участков С-концевой области *LMP1* были выделены 22 сиквенсных варианта/генотипа *LMP1*. Эти же авторы предположили, что, по-видимому, существует 3 основных молекулярных механизма, обеспечивающих генетическое разнообразие *LMP1*, а именно: возникновение точечных мутаций, ведущих к замене отдельных аминокислот; образование делеций и дупликаций; гомологичная рекомбинация как следствие ко-инфекции лимфоидных или эпителиальных клеток двумя различными штаммами ВЭБ, причем, по мнению авторов, эволюция гена *LMP1* ускоряется в результате ко-инфицирования человека множественными штаммами ВЭБ, содержащими соответствующие генетические варианты *LMP1* [54].

Другая группа исследователей под руководством N. Raab-Traub охарактеризовала 6 групп изолятов гена *LMP1*, выделенных из клинического материала в различных регионах мира. Белковые варианты этих групп, известные как Ch1, Ch2, Med+, Med-, а также North Carolina (NC) и Alaskan (согласно классификации, предложенной в работе Edwards [58]), отличаются наличием так называемых ключевых аминокислотных замен по сравнению с *LMP1* прототипного штамма вируса B95-8. Однако эти замены не обнаружены ни в STAR1, ни в STAR2 регионах белка. Как известно, между этими областями у вариантов Ch1 и Med+ имеется Cao-подобная делеция 10 а.к., с которой связывают усиленный трансформирующий потенциал. Каждый представитель из 6 указанных выше вариантов *LMP1* был детально охарактеризован по его способности трансформировать клетки млекопитающих (Rat-1), вызывать активацию ТФ NF- $\kappa$ B, а также связывать один из клеточных белков из семейства Е3-убиквитинлигаз (HOS/ $\beta$ -TrCP). Хотя по полученным результатам не удалось выявить, по мнению авторов, прямой корреляции между наличием мутаций в сайтах связывания HOS/ $\beta$ -TrCP в различных изолятах *LMP1* и усилением трансформирующей активности *in vitro*, было показано, что варианты Ch1 и Alaskan, которые в меньшей степени связывали комплекс Е3-убиквитинлигазы, персистируют в регионах, высоко эндемичных по РНГ человека. У этих же вариантов обнаружен и наиболее высокий уровень активации NF- $\kappa$ B [8]. Нужно тем не менее отметить, что данные этой работы находятся в противоречии с результатами работы W. Tang и соавт., обнаруживших четкую корреляцию между понижением способности вариантов *LMP1* связывать HOS/ $\beta$ -TrCP и их трансформирующей активностью в культуре клеток [59]. Дальнейший функциональный анализ различных сочетаний часто встречающихся точечных мутаций STAR-регионов *LMP1*, нарушающих HOS-мотивы (а именно G212S, S350A и S366T), выявил повышение уровня активации ТФ NF- $\kappa$ B и протеинкиназы-B (PKB/Akt), но только при наличии двойных (G212S/S350A, G212S/S366T) и тройной (Triple) (G212S/S350A/S366T) мутаций. Обнаружено также отсутствие влияния указанных мутаций на уровень активации ТФ AP-1 [60]. При этом показано, что мутантные варианты *LMP1* вызывают активацию индуцибельной формы NO-синтазы (iNOS). В частности, при экспрессии в фибробластах Rat-1 вариантов *LMP1*-Cao и *LMP1*-Triple

(с нарушениями в обоих HOS-мотивах) наблюдалось снижение уровня NO, что, вероятно, способствует выживаемости и усилению туморогенных свойств трансформированных ими клеток.

Необходимо отметить, что персистенция ВЭБ с мутантными вариантами *LMP1* в любом географическом регионе не исключает возможной этиологической роли этих вариантов гена в возникновении ВЭБ-ассоциированных неоплазий в определенных случаях у определенных лиц. Учитывая, однако, что латентный период при многих ВЭБ-ассоциированных патологиях занимает десятки лет, а также необходимость участия в этом процессе многих кофакторов, сложно осуществить длительный мониторинг группы лиц, инфицированных определенным штаммом ВЭБ с соответствующим ему геном *LMP1*, чтобы доказать этиологическую роль этого штамма в возникновении опухоли.

На основании анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP) эндонуклеазами рестрикции BamHI и XhoI выделяют 3 основных варианта ВЭБ. Прототип F с BamHI-областью широко распространен во всех странах мира, а вариант "f", характеризующийся наличием внешнего BamHI сайта, обнаруживается только у жителей южных провинций Китая, где выявлена его ассоциация с РНГ. На основе полиморфизма BamHI W1/I1 регионов выделяют 2 типа — "I" и "i". Тип "I" характеризуется отсутствием BamHI-сайта и доминирует среди здоровых людей и больных с ВЭБ-ассоциированными патологиями в Японии и Китае. Тип "i", содержащий BamHI-рестрикционный сайт, преобладает в странах Западной Европы. Наконец, отсутствие в 1-м экзоне гена *LMP1* рестрикционного сайта XhoI определяет генотип XhoI\*, который часто встречается в Азии, в то время как вариант XhoI\* преобладает среди жителей стран Запада. Так, в работе Corvalan и соавт. показано, что среди ВЭБ-ассоциированных случаев РЖ доминируют определенные варианты ВЭБ (а именно тип "i"/XhoI\*), но у здоровых доноров этот вариант встречается с той же частотой, что и остальные типы. Полученные данные прототипическую существование определенной гипотезе, согласно которой распространение определенных штаммов ВЭБ, а соответственно и вариантов *LMP1* связано с географическими регионами, а не с конкретной ВЭБ-ассоциированной патологией.

### Заключение

В настоящее время имеются убедительные данные, подтверждающие важную роль ВЭБ в патогенезе ряда злокачественных новообразований. Показано, что *LMP1*, являющийся основным онкобелком ВЭБ, оказывает существенное влияние на поведение как лимфоидных, так и эпителиальных клеток, стимулируя различные клеточные процессы, такие как пролиферация, выживание, подвижность и инвазия. В то же время многие вопросы до сих пор остаются без ответа. В частности, неизвестны условия и механизмы возникновения ВЭБ-ассоциированных неоплазий у вирусоносителей, особенно вне эндемичных зон. До сих пор окончательно не выяснено, как ВЭБ инфицирует клетки слизистой оболочки носоглотки. Не изученным остается и существование расовой/этнической предрасположенности к определенным ВЭБ-ассоциированным опухолям, и вклад в ВЭБ-ассоциированный канцерогенез многих факторов

окружающей среды. Кроме хорошо известных рост-стимулирующих свойств LMP1, этот белок модулирует и иммунные ответы. В этой связи представляется актуальным выяснение роли LMP1 в уклонении ВЭБ от иммунного воздействия, а также вопрос о том, как эта стратегия, приводящая к установлению персистенции вируса в организме, вносит свой вклад в ускользание ВЭБ-положительных опухолей от иммунного ответа.

Поскольку клеточное окружение является важным фактором при определении биологического влияния LMP1 на клеточные сигнальные процессы, будущие исследования, видимо, следует фокусировать на идентификации опухолевых клеток-предшественников, изучении ключевых сигнальных путей, а также нижерасположенных эффекторов, подвергающихся воздействию LMP1. Используя современные методы исследования (микрочиповый, протеомный, мРНК и другие анализы), можно сравнить уровни экспрессии клеточных генов на белковом и РНК-уровнях в присутствии или в отсутствии гена *LMP1*. Эти исследования позволят получить важную информацию о кластерах генов, выборочно экспрессированных или репрессированных в присутствии *LMP1*, которые могут стать потенциальными объектами терапевтического воздействия при опухолях, ассоциированных с этим вирусом.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 14-04-01810а, № 12-04-00805а и № 10-04-00060а.

#### ЛИТЕРАТУРА (П. 1–59 СМ. REFERENCES)

60. Смирнова К.В., Дидук С.В., Гурцевич В.Э. Функциональный анализ вариантов латентного мембранного белка 1 (LMP1) вируса Эпштейна-Барр у больных лимфопролиферативными заболеваниями. *Биомедицинская химия*. 2011; 57(1): 114–26.

#### REFERENCES

1. Young L.S., Rickinson A.B. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer*. 2004; 4(10): 757–68.
2. Shimakaze M., Sasagawa T., Kawahara K., Yutsudo M., Kusuoka H., Kozuka T. Expression of Epstein-Barr virus in cutaneous T-cell lymphoma including mycosis fungoides. *Int. J. Cancer*. 2001; 92: 226–31.
3. Fraeuer R., Rymo L., Rhim J. S., Klein G. Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus. *Nature*. 1990; 345: 447–9.
4. Kaye K., Izumi K., Kieff E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993; 90: 9150–4.
5. Mosialos G., Birkenbach M., Yalamanchili R., Van Arsdale T., Ware C., Kieff E. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell*. 1995; 80(3): 389–99.
6. Nitta T., Chiba A., Yamashita A., Rowe M., Israel A., Reth M. et al. NF- $\kappa$ B is required for cell death induction by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *Cell. Signal*. 2003; 15: 423–33.
7. Aviel S., Winberg G., Massucci M., Ciechanover A. Degradation of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem*. 2000; 275(31): 23491–9.
8. Mainou B.A., Raab-Traub N. LMP1 strain variants: biological and molecular properties. *J. Virol*. 2006; 80: 6458–68.
9. Bentz G.L., Whitehurst C.B., Pagano J.S. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) C-terminal-activating region 3 contributes to LMP1-mediated cellular migration via its interaction with Ubc9. *J. Virol*. 2011; 85(19): 10144–53.
10. Jime'nez-Ramirez C., Brooks A.J., Forshell L.P., Yakimchuk K., Zhao B., Fulgham T.Z. et al. Epstein-Barr virus EBNA-3C is targeted to and regulates expression from the bidirectional LMP-1/2B promoter. *J. Virol*. 2006; 80(22): 11200–8.
11. Erickson K.D., Berger C., Coffin W.F., Schiff E., Walling D.M.,

- Martin J.M. Unexpected absence of the Epstein-Barr virus (EBV) lyLMP-1 open reading frame in tumor virus isolates: lack of correlation between Met129 status and EBV strain identity. *J. Virol*. 2003; 77(7): 4415–22.
12. Erickson K.D., Martin J.M. The late lytic LMP-1 protein of Epstein-Barr virus can negatively regulate LMP-1 signaling. *J. Virol*. 2000; 74(2): 1057–60.
13. Martel-Renoir D., Grunewald V., Touitou R., Schwaab G., Joab I. Qualitative analysis of the expression of Epstein-Barr virus lytic genes in nasopharyngeal carcinoma biopsies. *J. Gen. Virol*. 1995; 76(Pt 6): 1401–8.
14. Pandya J., Walling D.M. Oncogenic activity of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP-1) is down-regulated by lytic LMP-1. *J. Virol*. 2006; 80(16): 8038–46.
15. Kaye K.M., Devergne O., Harada J.N., Izumi K.M., Yalamanchili R., Kieff E. et al. Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF- $\kappa$ B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996; 93: 11085–90.
16. Kieser A., Kaiser C., Hammerschmidt W. LMP1 signal transduction differs substantially from TRAF receptor 1 signaling in the molecular functions of TRADD and TRAF2. *EMBO J*. 1999; 18(9): 2511–21.
17. Wu L., Nakano H., Wu Z. The C-terminal activating region 2 of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activates NF- $\kappa$ B through TRAF6 and TAK1. *J. Biol. Chem*. 2006; 281(4): 2162–9.
18. Luftig M., Yasui T., Soni V., Kang M.-S., Jacobson N., Cahir-McFarland E. et al. Epstein-Barr virus latent infection membrane protein 1 TRAF-binding site induces NIK/IKK $\alpha$ -dependent noncanonical NF- $\kappa$ B activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101(1): 141–6.
19. Takahashi M., Li J., Shirakata M., Mori S., Hirai K. Tumorigenicity of mouse BALB/c 3T3 fibroblast cells which express Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and show normal growth phenotypes in vitro is correlated with loss of transforming growth factor- $\beta$ 1-mediated growth inhibition. *Arch. Virol*. 1999; 144: 241–57.
20. Prokova V., Mosialos G., Kardassis D. Inhibition of transforming growth factor  $\beta$  signaling and Smad-dependent activation of transcription by the latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *J. Biol. Chem*. 2002; 277(11): 9342–50.
21. Zanke B.W., Rubie E.A., Winnett E., Tibbles L.A., Zon L., Kyriakis J. et al. The stress-activated protein kinase pathway mediates cell death following injury induced by cis-platinum, UV irradiation or heat. *Curr. Biol*. 1996; 6: 606–13.
22. Fritz G., Kaina B. Activation of c-Jun N-terminal kinase 1 by UV irradiation is inhibited by wortmannin without affecting c-jun expression. *Mol. Cell. Biol*. 1999; 19(3): 1768–74.
23. Berberich L., Shu G., Siebelt F., Woodgett J.R., Kyriakis J.M., Clark E.A. Cross-linking CD40 on B cells preferentially induces stress-activated protein kinases rather than mitogen-activated protein kinases. *EMBO J*. 1996; 15(1): 92–101.
24. Reinhard C., Shamoon B., Shyamala V., Williams L.T. Tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced activation of c-jun N-terminal kinase is mediated by TRAF2. *EMBO J*. 1997; 16(5): 1080–92.
25. Kieser A., Kilger E., Gires O., Ueffing M., Kolch W., Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. *EMBO J*. 1997; 16: 6478–85.
26. Dawson C.W., Port R.J., Young L.S. The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Semin. Cancer Biol*. 2012; 22: 144–53.
27. Eliopoulos A.G., Gallagher N.J., Blake S.M.S., Dawson C.V., Young L.S. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J. Biol. Chem*. 1999; 274(23): 16085–96.
28. Luka J., Kallin B., Klein G. Induction of Epstein-Barr virus (EBV) cycle in latently infected cells by n-butyrate. *Virology*. 1979; 92: 228–31.
29. Shirakata M., Imadome K.-I., Okazaki K., Hirai K. Activation of TRAF5 and TRAF6 signal cascades negatively regulates the latent replication origin of Epstein-Barr virus through p38 mitogen-activated protein kinase. *J. Virol*. 2001; 75(11): 5059–68.
30. Fielding C.A., Sandvej K., Mehl A., Brennan P., Jones M., Rowe M. Epstein-Barr virus LMP-1 natural sequence variants differ in their potential to activate cellular signaling pathways. *J. Virol*. 2001; 75(19): 9129–41.
31. Gires O., Kohlhuber F., Kilger E., Baumann M., Kieser A., Kaiser C. et al. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J*. 1999; 18(11): 3064–73.

32. Riches D.W.H., Chan E.D., Zahradka E.A., Winston B.W., Remigio L.K., Lake F.R. Cooperative signaling by tumor necrosis factor receptors CD120a (p55) and CD120b (p75) in the expression of nitric oxide and inducible nitric oxide synthase by mouse macrophages. *J. Biol. Chem.* 1998; 273(35): 22800–6.
33. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992; 6: 3051–64.
34. Kleinert H., Euchenhofer C., Ihrig-Biedert I., Forstermann U. In murine 3T3 fibroblasts, different second messenger pathways resulting in the induction of NO synthase II (iNOS) converge in the activation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* 1996; 271(11): 6039–44.
35. Yu J.S., Tsai H.C., Wu C.C., Weng L.P., Li H.P., Chung P.J. et al. Induction of inducible nitric oxide synthase by Epstein-Barr virus B95-8-derived LMP1 in Balb/3T3 cells promotes stress-induced cell death and impairs LMP1-mediated transformation. *Oncogene.* 2002; 14(21): 8047–61.
36. Li L., Li W., Xiao L., Xu J., Chen X., Tang M. et al. Viral oncoprotein LMP1 disrupts p53-induced cell cycle arrest and apoptosis through modulating K63-linked ubiquitination of p53. *Cell Cycle.* 2012; 11: 2327–36.
37. Guo L., Tang M., Yang L., Xiao L., Bode A.M., Li L. et al. Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1 mediates survivin upregulation by p53 contributing to G1/S cell cycle progression in nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* 2012; 29: 574–80.
38. Horikawa T., Yoshizaki T., Kondo S., Furukawa M., Kaizaki Y., Pagano J.S. Epstein-Barr Virus latent membrane protein 1 induces Snail and epithelial-mesenchymal transition in metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Br. J. Cancer.* 2011; 104(7): 1160–7.
39. Edwards R.H., Sitki-Green D., Moore D.T., Raab-Traub N. Potential selection of LMP1 variants in nasopharyngeal carcinoma. *J. Virol.* 2004; 78(2): 868–81.
40. Hu L.-F., Zabarovsky E.R., Chen F., Cao S.-L., Ernberg I., Klein G. et al. Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J. Genet. Virol.* 1991; 72: 2399–400.
41. Blake S.M., Eliopoulos A.G., Dawson C.W., Young L.S. The transmembrane domains of the EBV-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) variant Cao regulate enhanced signalling activity. *Virology.* 2001; 282: 278–87.
42. Johnson R.J., Stack M., Hazlewood S.A., Jones M., Blackmore C.G., Hu L.-F. et al. The 30-base-pair deletion in chinese variants of the Epstein-Barr virus LMP1 gene is not the major effector of functional differences between variant LMP1 genes in human lymphocytes. *J. Virol.* 1998; 72(5): 4038–48.
43. Fischer N., Kopper B., Graf N., Schlehofer J., Grässer F., Mueller-Lantzsch N. Functional analysis of different LMP1 proteins isolated from Epstein-Barr virus-positive carriers. *Virus Res.* 1999; 60: 41–54.
44. Knecht H., Bachmann E., Brousset P., Sandvej K., Nadal D., Bachmann F. et al. Deletions within the LMP1 oncogene of Epstein-Barr virus are clustered in Hodgkin's disease and identical to those observed in nasopharyngeal carcinoma. *Blood.* 1993; 82(10): 2937–42.
45. Chang Y.-S., Su I.-J., Chung P.-J., Shu Ch.-H., Ng Ch.-K., Wu S.-J. et al. Detection of an Epstein-Barr virus variant in T-cell-lymphoma tissues identical to the distinct strain observed in nasopharyngeal carcinoma in the Taiwanese population. *Int. J. Cancer.* 1995; 62: 673–7.
46. Cheung S.-T., Lo K.-W., Leung S., Chan W.-Y., Choi P., Johnson P. et al. Prevalence of LMP1 deletion variant of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma and gastric tumors in Hong Kong. *Int. J. Cancer.* 1996; 66: 711–2.
47. Sandvej K., Peh S., Andresen B., Pallesen G. Identification of potential hot spots in the carboxy-terminal part of the Epstein-Barr virus (EBV) BNLF-1 gene in both malignant and benign EBV-associated diseases: high frequency of a 30-bp deletion in Malaysian and Danish peripheral T-cell lymphomas. *Blood.* 1994; 84: 4053–60.
48. Knecht H., Bachmann E., Brousset P., Rothenberger S., Einsele H., Lestou V. et al. Mutational hot spots within the carboxy terminal region of the LMP1 oncogene of Epstein-Barr virus are frequent in lymphoproliferative disorders. *Oncogene.* 1995; 10: 523–8.
49. Knecht H., Martius F., Bachmann E., Hoffman T., Zimmermann D., Rothenberger S. et al. A deletion mutant of the LMP-1 oncogene of Epstein-Barr virus is associated with evolution of angioimmunoblastic lymphadenopathy into B immunoblastic lymphoma. *Leukemia.* 1995; 9: 458.
50. Dolcetti R., Zancai P., de Re V., Gloghini A., Bigoni B., Pivetta B. et al. Epstein-Barr virus strains with latent membrane protein-1 deletions: prevalence in the Italian population and high association with human immunodeficiency virus-related Hodgkin's disease. *Blood.* 1997; 89: 1723–31.
51. Khanim F., Yao Q.-Y., Niedobitek G., Sihota S., Rickinson A.B., Young L.S. Analysis of Epstein-Barr virus gene polymorphisms in normal donors and in virus-associated tumors from different geographic locations. *Blood.* 1996; 88(9): 3491–501.
52. Sandvej K., Gratama J.W., Munch M., Zhou X.G., Bolhuis R.L., Andersen B.S. et al. Sequence analysis of the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 gene and promoter region: identification of 4 variants among wild-type EBV isolates. *Blood.* 1997; 90: 323–30.
53. Hayashi K., Chen W.-C., Chen Y.-Y., Murakami I., Chen H.-L., Ohara N. et al. Deletion of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 gene in Japanese and Brazilian gastric carcinomas, metastatic lesions, and reactive lymphocytes. *Am. J. Pathol.* 1998; 152(1): 191–8.
54. Walling D., Shebib N., Weaver S., Nichols M., Flaitz C., Webster-Cyriaque J. The molecular epidemiology and evolution of Epstein-Barr virus: sequence variation and genetic recombination in the latent membrane protein-1 gene. *J. Infect. Dis.* 1999; 179: 763–74.
55. Itakura O., Yamada S., Narita M., Kikuta H. High prevalence of a 30-base pair deletion and single-base mutations within the carboxy terminal end of the LMP-1 oncogene of Epstein-Barr virus in the Japanese population. *Oncogene.* 1996; 13: 1549–53.
56. Palefsky J., Berline J., Penaranda M., Lennette E., Greenspan D., Greenspan J. Sequence variation of latent membrane protein-1 of Epstein-Barr virus strains associated with hairy leukoplakia. *J. Infect. Dis.* 1996; 173: 710–4.
57. Rothenberger S., Bachmann E., Knecht H. Molecular and functional analysis of the Epstein-Barr virus LMP1 oncogene promoter in lymphoproliferative diseases. *Exp. Hematol.* 1997; 25: 1326.
58. Edwards R., Seillier Moisewitsch F., Raab-Traub N. Signature amino acids changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein-Barr virus strains. *Virology.* 1999; 261: 79–95.
59. Tang W., Pavlish O.A., Spiegelman V.S., Parkhitko A.A., Fuchs S.Y. Interaction of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 with SCF<sup>F1053D-TICP</sup> E3 ubiquitin ligase regulates extent of NF- $\kappa$ B activation. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(49): 48942–9.
60. Smirnova K.V., Diduk S.V., Gurtsevich V.E. Functional analysis of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) in patients with lymphoproliferative diseases. *Biomeditsinskaya Khimiya.* 2011; 57(1): 114–26. (in Russian)

*Петров А.А., Плеханова Т.М., Сидорова О.Н., Борисевич С.В., Махлай А.А.*

## **Вакцины на основе РНК-репликона вируса венесуэльского энцефаломиелиита лошадей против вирусных геморрагических лихорадок**

ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, 141306, г. Сергиев Посад

В данном обзоре рассмотрены различные рекомбинантные ДНК- и РНК-кандидаты в вакцины против арена- и филовирусных геморрагических лихорадок, в том числе и на основе РНК-репликона вируса венесуэльского энцефаломиелиита лошадей (ВЭЛ). Репликационно-дефектные репликоны вируса ВЭЛ обладают такими важными качествами, как безопасность, высокий уровень экспрессии гетерологичных генов, тропизм к дендритным клеткам, сбалансированный иммунный ответ, защитная эффективность, резистентность к антивекторному иммунитету и возможность конструирования мультивалентных вакцин. Эти свойства обуславливают перспективность разработки на основе репликоновой системы вируса ВЭЛ вакцин нового поколения против арена- и филовирусных геморрагических лихорадок.

**Ключевые слова:** *аренавирусы; вирус венесуэльского энцефаломиелиита лошадей; вирусные геморрагические лихорадки; рекомбинантные вакцины; РНК-репликоны; филовирусы.*

*Для цитирования:* Вопросы вирусологии. 2015; 60(3): 14–18.

*Petrov A. A., Plekhanova T. M., Sidorova O. N., Borisevich S. V., Makhlay A. A.*

### **The vaccines based on the replicon of the venezuelan equine encephalomyelitis virus against viral hemorrhagic fevers**

Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation, 141306, Sergiev Posad – 6, Russia

The status of the various recombinant DNA and RNA-derived candidate vaccines, as well as the Venezuelan equine encephalomyelitis virus (VEEV) replicon vaccine system against extremely hazardous viral hemorrhagic fevers, were reviewed. The VEEV-based replication-incompetent vectors offer attractive features in terms of safety, high expression levels of the heterologous viral antigen, tropism to dendritic cells, robust immune responses, protection efficacy, low potential for pre-existing anti-vector immunity and possibility of engineering multivalent vaccines were tested. These features of the VEEV replicon system hold much promise for the development of new generation vaccine candidates against viral hemorrhagic fevers.

**Key words:** *arenaviruses, venezuelan equine encephalitis virus; hemorrhagic fevers; recombinant vaccines; RNA- replicons; filoviruses.*

*Citation:* Voprosy virusologii. 2015; 60(3): 14–18. (In Russ.)

*For correspondence:* Aleksandr Petrov, MD, PhD; e-mail: petrov\_a\_a@rambler.ru

Received 11.09.13

Филовирусы Марбург и Эбола, а также аренавирусы Ласса, Хунин и Мачупо являются возбудителями тяжелых и, как правило, смертельных геморрагических лихорадок [1–6].

Отсутствие в настоящее время безопасных и эффективных средств профилактики и лечения геморрагических лихорадок I группы патогенности свидетельствует об актуальности разработки эффективных вакцин нового поколения.

Традиционные подходы при создании вакцин против геморрагических лихорадок на основе живых аттенуированных вирусов или инактивированных препаратов возбудителя не оправдали себя, так как живые вакцины реактогенны, и есть вероятность реверсии к вирулентному варианту [7]. Инактивированные вакцины более безопасны, но слабо индуцируют клеточный иммунитет, необходимый для защиты от вирусной инфекции, и должны, как правило, использоваться совместно с адьювантами для повышения иммуногенности [8, 9].

Современные подходы к разработке вакцин нового поколения против вирусных геморрагических лихорадок I группы патогенности обещают решить неко-

торые из этих серьезных вопросов и найти оптимальный баланс между эффективностью, безопасностью и стоимостью защитных препаратов. В целом такие вакцины должны обеспечивать протективный эффект при 1–2-кратном введении, в том числе и против нескольких патогенов, быть устойчивыми к предшествующему иммунитету организма, вызванному неспецифическими компонентами вакцины.

Одним из направлений развития вакцин нового поколения является система обратной генетики арена- и филовирусов [2, 9]. Эта система дает возможность получать информацию о вирусной репликации, функции белков и патогенезе, что со временем может дать инструмент для создания специфических генов, требуемых для аттенуации, и, возможно, позволит разработать рациональную конструкцию безопасной живой вакцины против вирусных геморрагических лихорадок.

В последние годы активно развиваются альтернативные направления разработки вакцин. К их числу относится множество рекомбинантных векторов, ко-

*Для корреспонденции:* Петров Александр Анатольевич, канд. мед. наук; e-mail: petrov\_a\_a@rambler.ru

торые уже были исследованы на этапе доклинических испытаний. Как следует из данных, представленных в табл. 1, для целого ряда векторов была доказана профилактическая эффективность в отношении экспериментальных арена- и филовиральных инфекций, в том числе и на нечеловекообразных приматах (рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, ДНК-рекомбинантный аденовирус типа 5, вирусоподобные частицы, рекомбинантный вирус вакцины, репликоны вируса ВЭЛ) [4, 10–14]. Но только тривалентная ДНК-вакцина, включающая векторы, кодирующие гены нуклеопротеина (NP) и гликопротеина (GP) двух вирулентных штаммов вируса Эбола, продолжила проверку в I фазе клинических испытаний [15]. Однако иммуногенность этой вакцины оказалась ниже требуемого уровня и для создания протективного иммунитета была необходима многократная иммунизация в течение длительного времени [15].

Другая рекомбинантная вакцина, на основе рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, вызывала полную защиту против всех потенциально опасных штаммов вируса Марбург [10, 16]. Система рекомбинантного вируса везикулярного стоматита

продемонстрировала удивительную эффективность в преclinical испытаниях на моделях животных не только как превентивная вакцина, но и как постинфекционное средство профилактики [9].

С помощью комплексной аденовирусной технологии на основе репликационно-дефектного вируса (CAdVax) была разработана панфиловиральная векторная вакцина (CAdVax-Panfilo) против пяти различных филовиралов [14]. Вакцинация низших приматов вызывала 100% защиту при последующем инфицировании двумя вирулентными штаммами вируса Эбола и тремя вирулентными штаммами вируса Марбург. Эта работа доказала возможность создания вакцины против всех известных особо опасных филовиралов. И, хотя в результате разработки CAdVax-Panfilo был решен вопрос предшествующего иммунитета, связанный с тем, что свыше 60% населения имеют антитела к человеческому серотипу 5 аденовируса, а в Африке эта величина составляет 85% [11], для выработки долговременного протективного иммунитета необходимо праймирование ДНК-вакциной с последующей иммунизацией аденовирусным вектором [17].

Одним из самых современных и перспективных на-

Таблица 1

Рекомбинантные вакцины против геморрагических лихорадок I группы патогенности, протестированные на животных или человеке

Вирус(ы)	Ген	Вектор(ы)	Экспериментальные животные	Литературный источник
Ласса	gpc, np	Репликационно-компетентный вектор вируса вакцины	Морские свинки, макаки-резус	[4]
	gpc	Репликационно-компетентный вектор ВВС	Зеленые мартышки	[8, 28]
	gpc, gp1, gp2	Репликационно-компетентный химерный вектор ВЖЛ	Мыши, морские свинки	[29, 30]
	gpc, np	Репликационно-дефектный вектор РНК-репликона вируса ВЭЛ	Морские свинки	[21]
	gpc, np, z np/gpc	Вирусоподобные частицы Плазмидная ДНК	Мыши Мыши/морские свинки, мартышки	[31] [10, 32]
Хуниин	gpc	Репликационно-дефектный вектор РНК-репликона вируса ВЭЛ	Морские свинки	[33]
Ласса, Эбола	gpc, gp	Репликационно-дефектный вектор РНК-репликона вируса ВЭЛ	Морские свинки	[21]
Эбола	gp, np	Плазмидная ДНК	Мыши, морские свинки, зеленые мартышки, *человек	[11, 13, 15, 34, 35]
	gp, np, vp40	Вирусоподобные частицы	Мыши, морские свинки, мартышки	[36–38]
Эбола	gp, np	Плазмидная ДНК (праймирование)/РДА	Мыши, морские свинки, мартышки	[35]
	gp, np	Репликационно-дефектный вектор РНК-репликона вируса ВЭЛ	Мыши, морские свинки, мартышки	[21, 39, 40]
	gp	Репликационно-компетентный вектор вируса вакцины	Морские свинки, зеленые мартышки	[39]
	gp, np	Репликационно-дефектный аденовирусный вектор	Мыши, морские свинки, мартышки	[34, 35, 41, 42]
	gp	Репликационно-компетентный вектор ВВС	Мыши, морские свинки, мартышки	[16, 28]
	gp	Комплексная аденовирусная вакцина (CAdVax)	*Зеленые мартышки	[14]
	Марбург	gp, vp40	Вирусоподобные частицы	Морские свинки
Марбург, Эбола	gp	Репликационно-компетентный вектор ВВС	Зеленые мартышки	[10, 16]
	gp, np	Плазмидная ДНК	Морские свинки, **зеленые мартышки	[12, 13]
	gp, np, vp35	Репликационно-дефектный вектор РНК-репликона вируса ВЭЛ	Морские свинки, зеленые мартышки	[19, 25, 26]
	gp	Комплексная аденовирусная вакцина (CAdVax)	**Зеленые мартышки	[11, 14]
gp	Репликационно-дефектный вектор РНК-репликона вируса ВЭЛ	Морские свинки, макаки-резус	[26, 27]	

Примечание. ВВС – вирус везикулярного стоматита; ВЖЛ – вирус желтой лихорадки; РДА – репликационно-дефектный аденовирус; \* – защищала против вируса Эбола, штамм Судан; \*\* – защищала против вируса Марбург, штамм Рави.



Сравнительная оценка свойств вакцин на основе репликона вируса ВЭЛ с рекомбинантными вакцинами против геморрагической лихорадки Ласса

Параметр	ДНК-вакцины	Репликационно-компетентные вирусекторные ДНК-вакцины на основе			Репликационно-дефектные вирусекторные вакцины на основе	
		вируса вакцины	вируса везикулярного стоматита	вируса желтой лихорадки	РНК-репликонов вируса ВЭЛ	вирусоподобных частиц
Реактогенность	Низкая	Средняя	Низкая	Низкая	Низкая	Низкая
Индукция гуморального иммунитета	+/-	+	+	+/-	+	+
Индукция клеточного иммунитета	+	+	+/-	+/-	+	+/-
Иммунная память	Долговременная	Долговременная	Долговременная	Кратковременная	Долговременная	Кратковременная
Вирусемия	+	+	+	+	+/-	+/-
Безопасность	Риск интеграции в геном клетки-хозяина	Риск реверсии или интеграции в геном клетки-хозяина	Риск реверсии или интеграции в геном клетки-хозяина	Риск реверсии или интеграции в геном клетки-хозяина	Высокая	Риск интеграции в белки или геном клетки-хозяина
Уровень защиты от аденовирусной инфекции, %:						
мышей и морских свинок	100	100	100	100	100	100
НП	100	Менее 100	100	Н. д.	100	100
Предшествующий иммунитет	-	+	+	-	-	-

Примечание. Здесь и в табл. 3: НП – низшие приматы (зеленые мартышки, макаки-резус); Н. д. – нет данных.

правлений разработки вакцин следующего поколения являются РНК-репликоны. Об этом косвенно свидетельствует контракт на 12 млн долларов в 2012 г. между Министерством обороны США и фирмой Paragon Bioservices о разработке и производстве тривалентной филловирусной вакцины на основе репликоновых частиц ВЭЛ [18].

РНК-репликоны – это производные плюс- и минус-нитевых РНК-вирусов (РНК<sup>+</sup> и РНК<sup>-</sup> соответственно), у которых самое меньшее один ген, кодирующий структурный белок, делетирован. Несмотря на такие делеции, вирусная РНК реплицируется и транскрибируется с помощью РНК-полимеразы. При совместной трансфекции эукариотических клеток полнценной репликоном и двумя хелперными РНК, кодирующими структурные белки альфавируса (гликопротеины и нуклеокапсид), происходит упаковка репликона РНК в вирусоподобные частицы [19, 20].

В хелперных РНК отсутствуют «пакующие сигналы», необходимые для дальнейшей репродукции репликона, поэтому инфекционный период ограничен одним циклом репликации. Следовательно, РНК-репликоновые частицы, в том числе и на основе вируса ВЭЛ, структурно идентичны вирусу, но в отличие от реплицирующихся вирусных векторов являются одноцикловыми векторами и не реплицируются в соседних клетках. Высокий уровень экспрессии генов РНК<sup>+</sup>-репликонов обусловлен двумя раундами геновой амплификации: первый – за счет репликации РНК-вектора, второй – за счет геновой транскрипции с 26S-промотора [9].

Гетерологичные гены РНК-репликонов экспрессируются в цитоплазме клетки, что исключает вероят-

ность их сплайсинга или интеграции в геном клетки-хозяина в отличие от ДНК-вакцин [21, 22].

Кроме того, установлено, что клетками-мишенями репликонов вируса ВЭЛ *in vivo* являются антиген презентующие дендритные клетки [23], что способствует индукции иммунного ответа широкого спектра и во многом определяет эффективность репликонов. Это свойство РНК-репликонов наряду с высоким уровнем экспрессии гетерологичных генов, обусловленным двумя раундами геновой амплификации, сближает их с живыми аттенуированными вакцинами, но в отличие от них репликоны безопасны.

К преимуществам вакцин на основе РНК-репликонов по сравнению со многими другими рекомбинантными векторами относится то, что при их применении не требуется использования адьювантов, так как с целью повышения их иммуногенности возможна коэкспрессия генов интереса и цитокинов, в частности интерферона I типа и интерлейкина-4 [24]. Более того, сами репликоны вируса ВЭЛ могут быть использованы в качестве адьювантов, так как способны индуцировать сбалансированный и усиленный ответ IgG-антител, а также мукозальный антигенспецифический CD8<sup>+</sup> T-клеточный ответ [24].

Одним из достоинств этой векторной системы является возможность индукции иммунитета к двум патогенам и более при иммунизации комбинацией репликонов или двухэкспрессирующим репликоном вируса ВЭЛ (табл. 2, 3). К тому же репликоны не токсичны, что определено на грызунах, включая интрацеребральное введение новорожденным мышам [25].

В исследованиях, проведенных на морских свинках и нечеловекообразных приматах, доказана 100% про-

Сравнительная оценка свойств вакцины на основе репликона вируса ВЭЛ с рекомбинантными вакцинами против геморрагических лихорадок Марбург и Эбола

Параметр	ДНК-вакцины	ДНК + РДАВ	Репликационно-компетентные вирусекторные ДНК-вакцины на основе			Репликационно-дефектные вирусекторные вакцины на основе			
			аденоассоциированного вируса	вируса вакцины	вируса вензюлярного стоматита	аденовируса		РНК-репликонов вируса ВЭЛ	вирусоподобных частиц
						РДАВ	CAAdVax		
Реактогенность	Низкая	Низкая	Низкая	Средняя	Низкая	Низкая	Средняя	Низкая	Низкая
Индукция ГИ	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+
Индукция КИ	+	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+/-
Иммунная память	Долговременная	Долговременная	Долговременная	Долговременная	Долговременная	Кратковременная	Долговременная	Долговременная	Кратковременная
Необходимость в адьювантах	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Вирусемия	+	+	+	+	+	+/-	+	-	+/-
Уровень защиты от филовиральной инфекции, %:									
мышей, морских свинок	100	100	100	100	100	Н.д.	Н.д.	100	100
НП	100	100	100	Менее 100	100	100	100	100	100
человек	Менее 100	Менее 100	Н. д.	Н. д.	Н. д.	Н. д.	Н. д.	Н. д.	Н. д.
Безопасность	Риск интеграции в ГКХ	Риск интеграции в ГКХ	Высокая	Риск реверсии или интеграции в ГКХ	Риск реверсии или интеграции в ГКХ	Риск интеграции в ГКХ	Риск реверсии или интеграции в ГКХ	Высокая	Риск интеграции в белки или ГКХ

Примечание. РДАВ – репликационно-дефектный аденовирусный вектор; CAAdVax – комплексная аденовирусная вакцина; ГИ – гуморальный иммунитет; КИ – клеточный иммунитет; ГКХ – геном клетки-хозяина.

тективная эффективность репликоновых частиц ВЭЛ, экспрессирующих гликопротеин вируса Марбург, в отношении экспериментальной инфекции при отсутствии вирусемии у инфицированных животных [26].

При изучении защитных свойств репликона вируса ВЭЛ, экспрессирующего белки GP возбудителей лихорадки Эбола и Марбург, также выявлена 100% защитная эффективность и безопасность вакцины при парентеральном и аэрозольном инфицировании нечеловекообразных приматов этими вирусами [27].

Полученные результаты согласуются с оценкой РНК-репликонов как кандидатов в вакцины против лихорадки Ласса и Эбола, а также предполагают развитие мультивалентной вакцины и против других лихорадок, в частности боливийской геморрагической лихорадки [21]. Необходимость создания бивалентной вакцины против лихорадок Ласса и Эбола обусловлена тем, что, хотя вирусы, их вызывающие, принадлежат к различным семействам, эти заболевания имеют перекрывающиеся ареалы в странах экваториальной Африки [1, 2].

В работе Р. Pushko и соавт. были изучены защитные свойства бивалентной вакцины на основе репликона вируса ВЭЛ против лихорадок Ласса и Эбола, вакцин против каждой из этих инфекций, а также смеси из этих двух вакцин, экспрессирующих гликопротеины вирусов, которая вызвала 100% протективный иммунитет у морских свинок, инфицированных летальными дозами обоих патогенов [21]. Результаты исследований показали, во-первых, наличие экспрессии и процессинг гликопротеинов обоих вирусов. Во-вторых,

на продукты экспрессии двойного репликона вырабатывались антитела, связывающиеся с полноценными гликопротеинами вирусов. В-третьих, несмотря на то, что у морских свинок, иммунизированных вакциной на основе репликона ВЭЛ, отсутствовали нейтрализующие антитела к данному вирусу, животные были невосприимчивы к экспериментальной инфекции ВЭЛ. При этом доказано, что с этих репликонов никогда, даже после слепых пассажей в культуре клеток, не регенерируется живой вирус ВЭЛ [21]. Это свойство, а также отсутствие у большинства людей предшествующего иммунитета к ВЭЛ свидетельствуют об отсутствии ограничений для первичной также повторной иммунизации вакциной на основе РНК-репликона вируса ВЭЛ [21, 24].

Таким образом, основными преимуществами альфа-вирусных репликонов в целом и РНК-репликонов вируса ВЭЛ в частности как вакцинной векторной системы являются: 1) длительная высокоэффективная экспрессия гетерологических белков; 2) индукция длительного протективного иммунного ответа широкого спектра, обусловленная тропизмом репликонов *in vivo* к клеткам лимфондной ткани, включая антигенпрезентирующие дендритные клетки; 3) отсутствие полного набора вирусных генов, необходимых для образования вирусных частиц, которые способны вызвать генерализованную инфекцию в других тканях; т. е. они могут удовлетворять строгом требованиям безопасности; 4) из-за небольшого размера РНК-репликонов и отсутствия экспрессии структурных белков практически отсутствует ответ иммунной системы на вектор; благо-

даря этому продолжительная экспрессия чужеродных белков не вызывает цитолитиз клеток; 5) в результате утраты РНК-вирусами ДНК-фазы они не могут интегрировать чужеродные гены в хромосомную ДНК; это делает невозможной трансформацию клеток векторами на основе РНК-вирусов, что также свидетельствует о высоком уровне их безопасности.

Следовательно, несмотря на то, что потенциал вакцин на основе репликационно-дефектных РНК-репликонов альфа-вирусов до конца не раскрыт, репликоны вируса ВЭЛ можно рассматривать в качестве одной из самых безопасных и перспективных векторных систем при создании нового поколения вакцин против вирусных геморрагических лихорадок I группы патогенности.

#### ЛИТЕРАТУРА (П. 2–42 СМ. REFERENCES)

1. Борисевич И.В., Маркин В.А., Фирсова И.В., Хамитов Р.А., Максимов В.А., Евсеев А.А. Эпидемиология, профилактика и лечение геморрагических лихорадок. *Вопросы вирусологии*. 2006; 5: 8–17.

#### REFERENCES

1. Borisevich I.V., Markin V.A., Firsova I.V., Khamitov R.A., Maksimov V.A., Evseev A.A. Hemorrhagic (Marburg, Ebola, Lassa, and Bolivian) fevers: epidemiology, clinical pictures, and treatment. *Voprosy virusologii*. 2006; 5: 8–17. (in Russian)
2. Bausch, D.G. Ebola, Marburg, Lassa, and other hemorrhagic fevers. In: Lashley F.R., Durham J.D., eds. *Emerging infectious diseases*. New York: Springer Publishing Co.: New York; 2007: 133–57.
3. Burnett J.C., Henchal E.A., Schmaljohn A.L., Bavari S. The evolving field of biodefence: therapeutic developments and diagnostics. *Nat. Rev. Drug Disc.* 2005; 4: 281–97.
4. Fisher-Hoch S.P., Hutwagner L., Brown B., McCormick J.B. Effective vaccine for Lassa fever. *J. Virol.* 2000; 74: 6777–83.
5. Lassa fever imported case United Kingdom. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2000; 75 (11): 85.
6. Outbreak of Marburg hemorrhagic fever – Angola. October 1, 2004–March 29, 2005. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2005; 54 (12): 308–9.
7. Maiztegui J.I., McKee K.T.Jr., Oto B.J.G., Harrison L.H., Gibbs P.H., Feuillade M.R. et al. Protective efficacy of a live attenuated vaccine against Argentine hemorrhagic fever. AHF Study Group. *J. Infect. Dis.* 1998; 177 (2): 277–83.
8. Geisbert T.W., Jones S., Fritz E.A., Shurtleff A.C., Geisbert J.B., Liebscher R. et al. Development of a new vaccine for the prevention of Lassa fever. *PLoS Med.* 2005; 2 (6): 537–45.
9. Grant-Klein R.J., Altamura L.A., Schmaljohn C.S. Progress in recombinant DNA-derived vaccines for Lassa virus and filoviruses. *Virus Res.* 2001; 162: 148–61.
10. Bausch D.G., Geisbert T.W. Development of vaccines for Marburg hemorrhagic fever. *Expert Rev. Vaccines.* 2007; 6 (1): 57–74.
11. Geisbert T.W., Bailey M., Hensley L., Asiedu C., Geisbert J., Stanley D., et al. Recombinant adenovirus serotype 26 (Ad26) and Ad35 vaccine vectors bypass immunity to Ad5 and protect nonhuman primates against ebolavirus challenge. *J. Virol.* 2011; 85 (9): 4222–33.
12. Hevey M., Negley D., VanderZanden L., Tammariello R.F., Geisbert J., Schmaljohn C. et al. Marburg virus vaccines: comparing classical and new approaches. *Vaccine.* 2001; 20 (3–4): 586–93.
13. Riemenschneider J., Garrison A., Geisbert J., Jahrling P., Hevey M., Negley D. et al. Comparison of individual and combination DNA vaccines for B. anthracis, Ebola virus Marburg virus and Venezuelan equine encephalitis virus. *Vaccine.* 2003; 21 (25–26): 4071–80.
14. Swenson D.L., Wang D., Luo M., Warfield K.L., Woraratanadham J., Holman D.H. et al. Vaccine to confer to nonhuman primates complete protection against multistrain Ebola and Marburg virus infections. *Clin. Vaccine Immunol.* 2008; 15 (3): 460–7.
15. Martin J.E., Sullivan N.J., Enama M.E., Gordon I.J., Roederer M., Koup R.A. et al. A DNA vaccine for Ebola virus is safe and immunogenic in a phase I clinical trial. *Clin. Vaccine Immunol.* 2006; 13 (11): 1267–77.
16. Jones S.M., Feldmann H., Stroher U., Geisbert J.B., Fernando L., Grolla A. et al. Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat. Med.* 2005; 11 (7): 786–90.
17. Santra S., Seaman M.S., Xu L., Barouch D.H., Lord C.I., Lifton M.A. et al. Replication-defective adenovirus serotype 5 vectors elicit durable cellular and humoral immune responses in nonhuman primates. *J. Virol.* 2005; 79 (10): 6516–22.
18. DoD selects Paragon Bioservices for Filovirus vaccine contract – See more at: <http://www.centerwatch.com/news-online/article/2775/> (Wednesday, January 18, 2012 12:15 PM).
19. Davis N.L., West A., Reap E., MacDonald G., Collier M., Dryga S. et al. Alphavirus Replicon Particles As Candidate HIV vaccines. *IUBMB Life.* 2002; 53 (4–5): 209–11.
20. Zimmer G. RNA Replicons – a new approach for influenza virus immunoprophylaxis. *Viruses.* 2010; 2: 413–34.
21. Pushko P., Geisbert J., Parker M., Jahrling P., Smith J. Individual and bivalent vaccines based on alphavirus replicons protect guinea pigs against infection with Lassa and Ebola viruses. *J. Virol.* 2001; 75 (23): 11677–85.
22. Vander Veen R.L., Harris D.L.H., Kamrud K.I. Alphavirus replicon vaccines. *Animal Health Res. Rev.* 2012; 13 (1): 1–9.
23. MacDonald G.H., Johnston R.E. Role of dendritic cell targeting in Venezuelan equine encephalitis virus pathogenesis. *J. Virol.* 2000; 74 (2): 914–22.
24. Lundstrom K. Alphavirus vectors in vaccine development. *J. Vaccines Vaccination.* 2012; 3 (3): 139–47.
25. Lee J.S., Groebner J.L., Hadjipanayis A.G., Negley D.L., Schmaljohn A.L., Welkos S.L. et al. Multiagent vaccines vectored by Venezuelan equine encephalitis virus replicon elicits immune responses to Marburg virus and protection against anthrax and botulinum neurotoxin in mice. *Vaccine.* 2006; 24 (47–48): 6886–92.
26. Hevey M., Negley D., Pushko P., Smith J., Schmaljohn A. Marburg virus vaccines based upon alphavirus replicons protect guinea pigs and nonhuman primates. *Virology.* 1998; 251 (1): 28–37.
27. Friedrich B.M., Trefry J.C., Biggins J.E. Potential vaccines and post-exposure treatments for filovirus infections. *Viruses.* 2012; 4: 1619–50.
28. Garbutt M.R., Liebscher R., Wahl-Jensen V., Jones S., Möller P., Wagner R. et al. Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses. *J. Virol.* 2004; 78 (10): 5458–65.
29. Bredenbeek P.J., Molenkamp R., Spaan W.J., Daubel V., Marianneau P., Salvato M.S. et al. A recombinant Yellow Fever 17D vaccine expressing Lassa virus glycoproteins. *Virology.* 2006; 345 (2): 299–304.
30. Jiang X., Dalebout T.J., Bredenbeek P.J., Carrion R.Jr., Brasky K., Patterson J. et al. Yellow fever 17D-vectored vaccines expressing Lassa virus GP1 and GP2 glycoproteins provide protection against fatal disease in guinea pigs. *Vaccine.* 2011; 29 (6): 1248–57.
31. Branco L.M., Grove J.N., Geske F.J., Boisen M.L., Muncy I.J., Magliato S.A. et al. Lassa virus-like particles displaying all major immunological determinants as a vaccine candidate for Lassa hemorrhagic fever. *J. Virol.* 2010; 7: 279–83.
32. Rodriguez-Carreno M.P., Nelson M.S., Botten J., Smith-Nixon K., Buchmeier M.J., Whitton J.L. Evaluating the immunogenicity and protective efficacy of a DNA vaccine encoding Lassa virus nucleoprotein. *Virology.* 2005; 335 (1): 87–98.
33. Seregin A.V., Yun N.E., Poussard A.L., Peng B.H., Smith J.K., Smith J.N. et al. TC83 replicon vectored vaccine provides protection against Junin virus in guinea pigs. *Vaccine.* 2010; 28 (30): 4713–8.
34. Sullivan N.J., Geisbert T.W., Geisbert J.B., Xu L., Yang Z.Y., Roederer M. et al. Accelerated vaccination for Ebola virus haemorrhagic fever in non-human primates. *Nature.* 2003; 424 (6949): 681–4.
35. Sullivan N.J., Sanchez A. Development of preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature.* 2000; 408 (6812): 605–9.
36. Swenson D.L., Warfield K.L., Negley D.L. Virus-like particles exhibit potential as a panfilovirus vaccine for both Ebola and Marburg viral infections. *Vaccine.* 2005; 23 (23): 3033–42.
37. Warfield K.L., Aman M.J. Advances in virus-like particle vaccines for filoviruses. *J. Infect. Dis.* 2011; 204: 1053–9.
38. Warfield K.L., Swenson D.L., Olinger G.G., Kalina W.V., Javad A.M., Bavari S. Ebola virus-like particle-based vaccine protects nonhuman primates against lethal Ebola virus challenge. *J. Infect. Dis.* 2007; 196 (2): 430–7.
39. Geisbert T.W., Pushko P., Anderson K., Smith J., Davis K.J., Jahrling P.B. Evaluation in nonhuman primates of vaccines against Ebola virus. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8 (5): 503–7.
40. Pushko P., Bray M., Ludwig G.V., Parker M., Schmaljohn A., Sanchez A. et al. Recombinant RNA replicons derived from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus protect guinea pigs and mice from Ebola hemorrhagic fever virus. *Vaccine.* 2000; 19 (1): 142–53.
41. Kobinger G.P., Feldmann H., Zhi Y., Schumer G., Gao G., Feldmann F. et al. Chimpanzee adenovirus vaccine protects against Zaire Ebola virus. *Virology.* 2006; 346 (2): 394–401.
42. Richardson J.S., Yao M.K., Tran K.N., Croyle M.A., Strong J.E., Feldman H. et al. Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine. *PLoS One.* 2009; 4 (4): 5308–10.

# ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.921.5-022:578.832.01]-036.22(470+571)

*Карпова Л.С.<sup>1</sup>, Сомнина А.А.<sup>1</sup>, Бурцева Е.И.<sup>2</sup>, Пелих М.Ю.<sup>1</sup>, Феодоритова Е.Л.<sup>2</sup>, Поповцева Н.М.<sup>1</sup>,  
Столярова Т.П.<sup>1</sup>, Киселев О.И.<sup>1</sup>*

## Сравнение эпидемий гриппа в России, вызванных пандемическим вирусом гриппа А(H1N1)pdm09 в период с 2009 по 2013 г.

<sup>1</sup>ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург; <sup>2</sup>Институт вирусологии им. Д.И. Иванковского ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалея» Минздрава России, 123098, г. Москва

Проведен сравнительный анализ трех прошедших эпидемий с участием пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09 по результатам эпидемиологического надзора двух Национальных центров по гриппу ВОЗ за заболеваемостью, госпитализацией и летальными исходами от гриппа в 59 городах России за период с 2009–2013 гг.

Показано, что наиболее интенсивной была первая волна пандемии 2009 г. По сравнению с ней, в последующие эпидемии 2011 и 2013 г. уменьшилась вовлеченность городов; заболеваемость в отдельных возрастных группах населения 15–64 лет и школьников 7–14 лет, продолжительность эпидемии среди взрослого населения, летальность при гриппе. Напротив, увеличилась заболеваемость среди детей дошкольного возраста и лиц преклонного возраста, продолжительность эпидемии среди детей дошкольного возраста, доля среди умерших лиц старше 65 лет и детей 0–2 лет, а также больных с сопутствующей сердечно-сосудистой патологией до 33,6%.

Ключевые слова: *грипп; ОРВИ; заболеваемость; летальность; пандемия; дети; взрослые; хроническая патология.*

*Для цитирования:* Вопросы вирусологии. 2015; 60(3): 19–24.

*Karpova L. S.<sup>1</sup>, Sominina A. A.<sup>1</sup>, Burtseva E. I.<sup>2</sup>, Pelikh M. Yu.<sup>1</sup>, Feodoritova E. L.<sup>2</sup>, Popovtseva N. M.<sup>1</sup>,  
Stolyarov T. P.<sup>1</sup>, Kiselev O. I.<sup>1</sup>*

## Comparison of the influenza epidemics in Russia caused by the pandemic virus A(H1N1)pdm09 within the period from 2009 to 2013

<sup>1</sup>Federal State Research Institute of influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, 197376, St. Petersburg, Russia; <sup>2</sup>The D.I. Ivanovsky Institute of Virology Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia;

Comparative analysis of the three past epidemics with the participation of the pandemic influenza A(H1N1)pdm09 was conducted according to the results of the epidemiological trials of two WHO National influenza centers for the morbidity, hospitalization, and mortality of the influenza in 59 cities of Russia for the period from 2009 to 2013.

The first wave of the pandemic of 2009 was the most severe. Compared with this wave, during the next epidemics of 2011 and 2013, the involvement of urban population in the epidemic was reduced, as well as the morbidity in the people 15-64 years old and schoolchildren 7-14 years old. The duration of the epidemic among the adult population, the mortality rate of the total population, and the mortality rates in all age groups were also decreased. Vice versa, the incidence in the children of preschool age and the elderly people and the duration of the epidemic among children (especially preschool children) were increased. The share of patients 65 years and older, children 0-2 years old, and patients with pathology of the cardiovascular systems among the deceased patients increased to 33.6%.

Key words: *influenza; acute respiratory viral infections; morbidity; mortality; pandemic; children; adults; chronic pathology.*

*Citation:* Voprosy virusologii. 2015; 60(3): 19–24. (In Russ.)

*For correspondence:* Lyudmila Karpova, MD, PhD, DSc; e-mail: epidlab@influenza.spb.ru

Received 29.05.14

### Введение

События последних лет в мире, имевшие отношение к гриппу, были связаны с распространением пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09. По-

явление в 2009 г. нового антигенного варианта вируса гриппа свиной А(H1N1)pdm09, его способность инфицировать людей и активно передаваться от человека к человеку стали причиной первой пандемии XXI

*Для корреспонденции:* Карпова Людмила Серафимовна, д-р мед. наук, e-mail: epidlab@influenza.spb.ru

века. Вирус не только стойко «закрепился» в качестве эпидемического штамма в человеческой популяции, но и вытеснил из активной циркуляции эпидемический вирус гриппа А(Н1N1). В России первую волну пандемии наблюдали в сезон 2009–2010 гг. [1–5], вторую – в 2010–2011 гг. [6–9] и третью – в 2012–2013 гг. [10]. При этом характер эпидемического процесса имел особенности, которые определялись прежде всего долевым участием пандемического вируса и направлением его распространения в последующие сезоны.

В настоящей работе проведен сравнительный анализ эпидемий в России, этиологически связанных с пандемическим вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09, в период 2009–2013 гг.

### Материалы и методы

Представлены результаты эпидемиологического надзора двух Национальных центров по гриппу ВОЗ в соответствии с приказом Роспотребнадзора от 31.03.2005 № 373 «О совершенствовании системы эпидемиологического надзора и контроля за гриппом и острыми респираторными вирусными инфекциями» [11]. Использована база данных НИИ гриппа о еженедельной заболеваемости, госпитализации, летальных исходах гриппа и выделении вирусов гриппа за период с 2009 по 2013 г. в различных возрастных группах населения 59 городов, расположенных в 7 федеральных округах (ФО) Российской Федерации. Оценка ситуации по гриппу, основанная на сравнении текущей заболеваемости гриппом и ОРВИ с недельными эпидемическими порогоми для возрастных групп населения городов, проведена в соответствии с ранее описанной методикой [12]. Анализ распространения гриппа в мире с 2009 по 2013 г. проведен по официальным еженедельным сводкам региональных бюро ВОЗ.

### Результаты и обсуждение

Впервые рост гриппоподобной заболеваемости неясной этиологии был зафиксирован в феврале 2009 г. в Мексике, в апреле вирус был выделен и идентифицирован в Центрах по контролю и профилактике заболеваний (Атланта, США). Вирус отличался высокой способностью к трансмиссии, и к концу мая он был выявлен в различных странах мира [13]. Первый подъем заболеваемости гриппом зарегистрирован в США и Канаде и продолжался в различных странах мира в мае–июне с последующим снижением в летний период [14, 15]. В России, несмотря на регистрацию спорадических завозных случаев пандемического гриппа в Москве, Санкт-Петербурге, Екатеринбурге и на Дальнем Востоке, эпидемии в этот период зарегистрировано не было [16–19].

Вторая волна пандемического гриппа распространилась в странах Северного полушария во второй половине 2009 г.: в США – в августе, в Канаде – в сентябре, в Европе – в октябре. Эта волна пандемии была моноэтиологичной с увеличением, по сравнению с первой заболеваемостью, частотой госпитализации и летальными исходами от гриппа. В этот же период (октябрь–декабрь 2009 г.) в России развилась первая волна пандемии.

Вторая волна пандемии в России пришлось на сезон 2010–2011 гг. В это время в странах Северной и Южной Америки заболеваемость была вызвана преимущественно гриппом А(Н3N2) и В. Для них этот сезон

оказался постпандемическим. Напротив, в странах Европейского региона, в том числе и России, преобладали вирусы гриппа А(Н1N1)pdm09 при некоторой вовлеченности вируса гриппа типа В.

В сезон 2011–2012 гг. пандемический вирус гриппа получил распространение в странах Северной и Южной Америки в отличие от России, где рост заболеваемости был вызван вирусами гриппа А(Н3N2) и В.

В сезон 2012–2013 гг. вирус гриппа А(Н1N1)pdm09 вызвал подъем заболеваемости в разных странах мира (кроме Северной Америки), составив в Азии 35% и в Европе 27% от всех выявленных вирусов гриппа. Рост заболеваемости в Европе начался в декабре 2012 г. Среди выявленных вирусов гриппа преобладал тип А, но в период максимального подъема заболеваемости – подтип А(Н1N1)pdm09, который распространялся с запада на восток. В России в конце декабря 2012 г. заболеваемость превысила недельный эпидемический порог и базовую линию. Этот рост, как обычно, был прерван в новогоднюю неделю, но с 7 по 13 января заболеваемость вновь достигла недельного эпидемического порога с последующим развитием эпидемии.

Сравнение динамики заболеваемости в период трех сравниваемых эпидемий, вызванных преимущественно вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09, показало, что первая волна пандемического гриппа началась необычно рано (с 39-й календарной недели 2009 г.), вторая – в 1-ю неделю 2011 г. и третья – на 2-й неделе 2013 г. т. е. значительно позже, чем первая, но раньше, чем предшествующие сезонные эпидемии гриппа (см. таблицу). Нарастание эпидемий по стране продолжалось в период первой пандемической волны в течение 8 нед, второй и третьей – в течение 7 нед. Пик заболеваемости отмечен на 47, 8 и 9-й календарных неделях соответственно. Заболеваемость на пике второй волны в 2011 г. была наибольшей (1,43%) и наименьшей на пике третьей в 2013 г. (1,07%). Общая продолжительность этих эпидемий по стране составила 17, 14 и 16 нед, соответственно.

Первая волна пандемии 2009 г. была вызвана вирусом гриппа А(Н1N1)pdm09. Распространялась по территории России с Дальнего Востока в западном направлении. Вторая волна пандемии в сезон 2010–2011 гг. была вызвана вирусом гриппа подтипа А(Н1N1)pdm09 и типа В с преобладанием вируса гриппа А(Н1N1)pdm09. При этом пандемический вирус гриппа распространялся по территории России с европейской части в восточном направлении на Урал и Сибирь, А(Н3N2) – на Дальнем Востоке, а вирусы гриппа В циркулировали повсеместно.

В сезон 2011–2012 гг. эпидемия имела смешанную этиологию А(Н3N2) и В, при этом А(Н3N2) распространялся с запада на восток, а пандемический вирус гриппа в эту эпидемию в России не получил широкого распространения, и регистрировались только спорадические случаи заболеваний.

В сезон 2012–2013 гг. вирусы гриппа В циркулировали на протяжении всего сезона, вплоть до 22-й недели (в конце мая 2013 г.), но в период эпидемии в европейской части России преобладал пандемический вирус А(Н1N1)pdm09. Вирус А(Н1N1)pdm09 из Европы распространялся по территории России в восточном направлении, а А(Н3N2) – с востока на запад.

В каждую из трех эпидемий, вызванных пандемическим вирусом, отмечали различия в интенсивности эпидемического процесса между ФО (по заболе-

Параметры трех эпидемий гриппа с участием пандемического вируса гриппа А(Н1N1)рdт09 в 59 городах России в период 2009–2013 гг.

Сравниваемые показатели	Эпидемические сезоны, годы		
	2009–2010	2010–2011	2012–2013
Сроки эпидемий в стране, календарные недели года (продолжительность, нед)	39-2009–03-2010 (17)	01-2011– 14-2011 (14)	02-2013–17-2013 (16)
Заболееваемость гриппом и ОРВИ населения (на неделе пика эпидемии) %	1,38 (47-я неделя)	1,43 (8-я неделя)	1,07 (9-я неделя)
Процент городов, вовлеченных в эпидемию, по возрастным группам, годы			
Все население	98,3	96,6	88,1
0–2	89,8	74,6	64,4
3–6	91,5	91,5	86,4
7–14	100	93,2	84,7
≥ 15	98,3	94,9	72,9
Средняя продолжительность эпидемий в городах, нед			
Все население	6,8	5,4	7,0
Возрастные группы, годы			
0–2	4,4	5,0	6,2
3–6	5,0	4,8	7,0
7–14	6,7	5,0	6,9
≥ 15	6,7	4,8	6,3
Средняя заболеваемость гриппом и ОРВИ за период эпидемии, %			
Все население	8,5	7,0	8,1
Возрастные группы, годы			
0–2	32,6	32,4	41,2
3–6	36,0	33,2	46,7
7–14	29,0	20,2	22,8
15–64	5,0	3,8	3,9
≥ 65	0,9	1,1	1,6
Процент госпитализированных с гриппом и ОРВИ от числа заболевших			
Все население	2,6/0,2	2,4/0,2	2,5/0,2
Возрастные группы, годы			
0–2	5,3/1,5	5,7/1,7	5,1/2,1
3–6	1,9/0,6	2,0/0,6	2,3/0,9
7–14	1,5/0,4	1,4/0,3	1,4/0,3
15–64	2,4/0,1	2,2/0,1	1,7/0,05
≥ 65	1,4/0,01	2,4/0,2	2,5/0,03
Доля госпитализированных с диагнозом гриппа от госпитализированных с гриппом и ОРВИ, %	14,1	12,9	6,6
Число летальных исходов			
Все население	645	264	125
Летальность при гриппе от заболевших гриппом и ОРВИ, %			
Все население	0,03	0,003 < в 10 раз	0,002 < в 15 раз
Возрастные группы, годы			
0–2	0,002	0,0004 < в 5 раз	0,0002 < в 10 раз
3–6	0,001	0,0002 < в 5 раз	0,0001 < в 10 раз
7–14	0,002	0,0002 < в 10 раз	0,0003 < в 6,7 раза
15–64	0,06	0,008 < в 7,5 раз	0,005 < в 12 раз
≥ 65	0,05	0,013 < в 3,8 раз	0,006 < в 8,3 раза

ваемости и продолжительности эпидемии) (рис. 1). В эпидемию 2009–2010 гг. максимальные средние показатели заболеваемости населения (10,3 и 10,2%) и продолжительности эпидемии (8 и 7,8 нед) отмечены в городах Дальнего Востока и Сибири и минимальны-

ми были в городах Южного ФО. В сезон 2010–2011 гг. заболеваемость была наиболее высокой в Северо-Западном, Приволжском и Южном ФО (8,5, 7,7 и 7,0%), а в сезон 2012–2013 гг. – в Северо-Западном, Уральском и Приволжском (13,3, 12,1 и 8,5%).

## Эпидемии

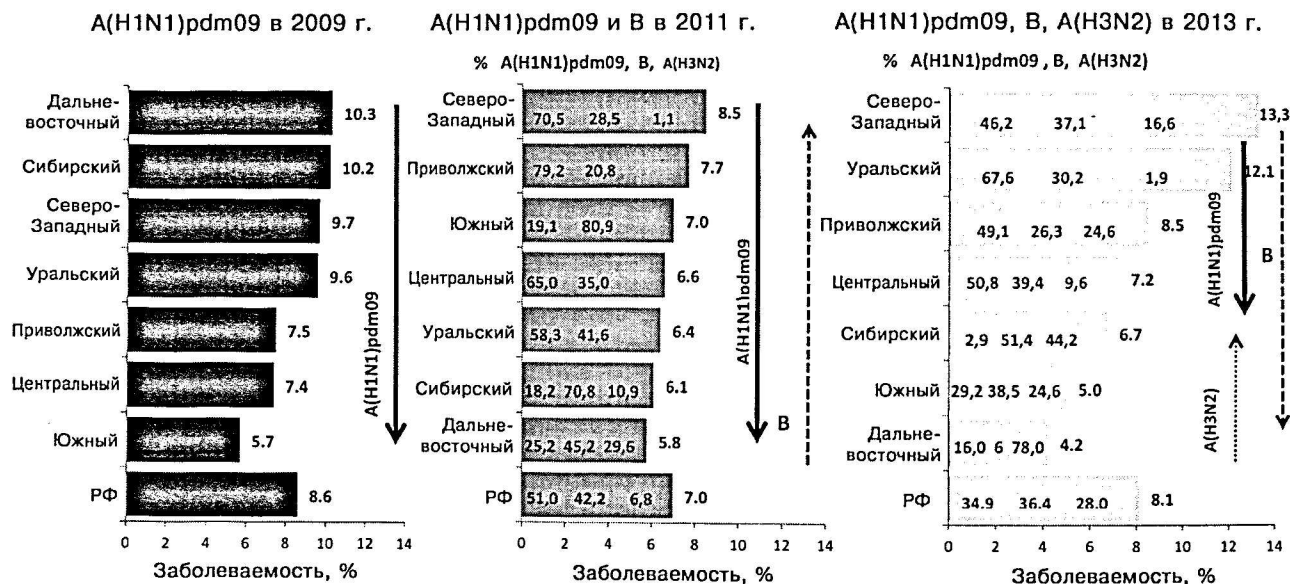


Рис. 1. Пути распространения эпидемий, этиология возбудителя и заболеваемость гриппом и ОРВИ по федеральным округам РФ во время эпидемий 2009, 2011 и 2013 гг.

Во вторую волну пандемии по сравнению с первой, заболеваемость гриппом и ОРВИ в Дальневосточном, Сибирском и Уральском округах, наиболее пораженных в эпидемии 2009 г., снизилась до 5,8, 6,1 и 6,4%, т. е. в 1,8, 1,7 и 1,5 раза соответственно. В Южном ФО, где она была ниже в первую эпидемию, увеличилась в 1,2 раза. В 3-ю волну пандемии по сравнению с первой, заболеваемость уменьшилась в Дальневосточном (до 4,2%) и Сибирском (6,7%) округах, т. е. в 2,4 и 1,5 раза, но увеличилась в Уральском (до 12,1%) и Северо-Западном (до 13,3%), т. е. в 2,3 и 1,4 раза.

Выявлены различия в этиологии заболеваний по данным выделения вирусов гриппа. Вирус А(H1N1)pdm09 преобладал в эпидемии 2011 года в Приволжском (79,2%), Северо-Западном (70,5%), Центральном (65,0%) и Уральском ФО (58,3%). В эпидемии 2013 г. его было больше, чем В или А(H3N2), в тех же окр-

гах: Приволжском (49,1%), Северо-Западном (46,2%), Центральном (50,9%) и Уральском (67,9%).

Отмечены различия в распространении отдельных подтипов вируса гриппа А и типа В по возрастным группам населения. Пандемический вирус А(H1N1)pdm09 преобладал среди взрослого населения, грипп В – среди детей, особенно школьного возраста.

Интенсивность эпидемий по округам зависела от географического распространения гриппа по территории России и была выше на стартовых территориях, с преимущественной циркуляцией вируса пандемического гриппа А(H1N1)pdm09. Так, в эпидемии 2009 г., при распространении пандемического гриппа с востока на запад максимальные показатели заболеваемости отмечены в Дальневосточном (10,3%) и Сибирском (10,2%) округах. При распространении эпидемии с запада на восток максимальные показатели заболеваемости в 2011 г. зарегистрированы в Северо-Западном (8,5%) и Приволжском (7,7%) округах, где удельный вес гриппа А(H1N1)pdm09 составил 70,5 и 79,2% соответственно, и в 2013 г. – в Северо-Западном (13,3%) и Уральском (12,1%) при удельном весе пандемического гриппа 46,2 и 67,6%.

Число зарегистрированных летальных исходов лабораторно подтвержденного гриппа в наблюдаемых городах снизилось с 645 случаев (в пандемию 2009 г.) до 264 (2011 г.) и 125 (2013 г.). В возрастной структуре умерших от гриппа в первую волну пандемии преобладали лица в возрасте от 18 до 53 лет (78,8%), при этом доля каждой из трех возрастных категорий (18–31, 32–41, 42–53 года) была приблизительно

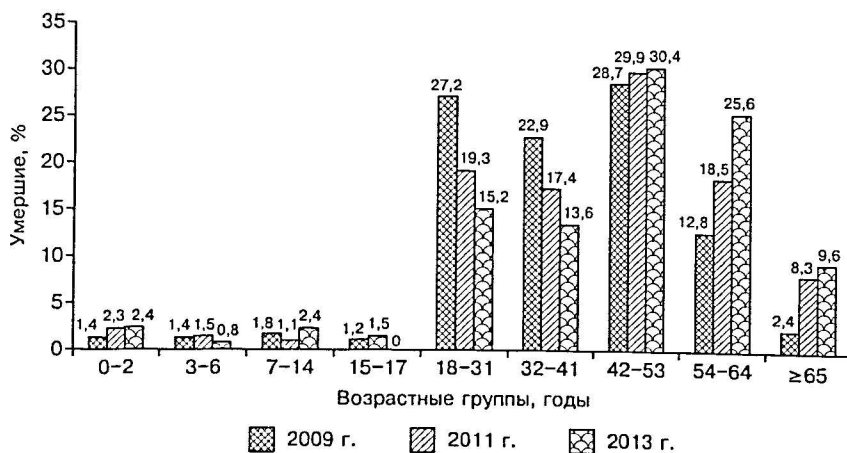


Рис. 2. Возрастная структура умерших от лабораторно подтвержденного гриппа во время эпидемий с участием вируса пандемического гриппа А(H1N1)pdm09 (2009, 2011 и 2013 гг.).

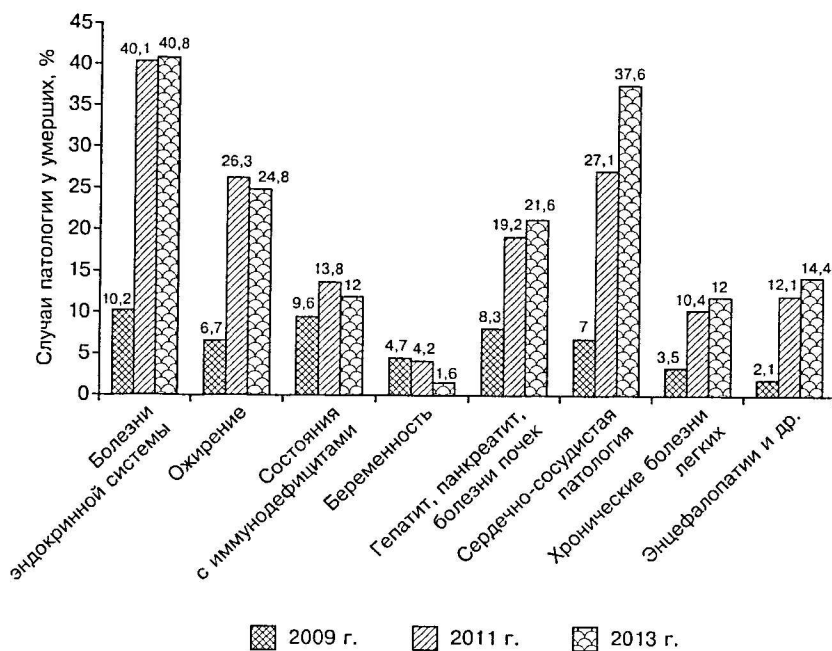


Рис. 3. Структура фоновой патологии при летальных исходах от гриппа А(H1N1)pdm09 во время эпидемий 2009, 2011 и 2013 гг.

одинаковой (от 22,9 до 28,7%) (рис. 2). Лиц в возрасте от 54 до 64 лет было приблизительно в 2 раза меньше (12,8%), а старше 65 лет – в 10 раз меньше (2,4%).

В эпидемии 2011 и 2013 гг. в возрастной структуре умерших отмечено некоторое увеличение числа детей раннего возраста (2,4%), школьников (до 2,4%), лиц от 42 лет до 64 лет (56,0%) и старше 65 лет (9,6%). Возможно, это связано с увеличением заболеваемости в этих возрастных группах. Фактором риска смертельных исходов в период циркуляции пандемического вируса А(H1N1)pdm09 являлось наличие хронической патологии. В пандемию 2009 г. среди умерших наиболее часто встречались метаболический синдром (ожирение, диабет и гипертоническая болезнь) – у 8,1%, в том числе ожирение – у 6,5%, и диабет – у 3,4%; болезни желудочно-кишечного тракта (гепатит, панкреатит, болезни почек) – у 7,1% и иммунодефицитные состояния (ВИЧ-инфекция, гепатиты В и С, болезни крови, новообразования) – у 5,7% (рис. 3). Другие виды патологии встречались реже, в том числе и сердечно-сосудистая патология (5,0%), которая была на 4-м месте, затем следовали болезни легких (4,0%) и энцефалопатии (2,4%).

В следующие 2 волны пандемии среди умерших больных хроническую патологию выявляли значительно чаще (в 2013 г. в 1,7–6,7 раза), а также произошли изменения в структуре фоновой патологии: 2-е место заняла сердечно-сосудистая патология (в 2011 г. – 18,9%, в 2013 г. – 33,6%). Уменьшился процент беременных среди умерших с 5,0 до 1,6%. Это обусловлено сдвигом в возрастной структуре заболевших и умерших в сторону старших возрастных групп и детей раннего возраста.

Сравнение трех эпидемий, параметры которых приведены в таблице, показало, что наиболее интенсивной была первая волна пандемии 2009 г. По сравнению с ней в последующие эпидемии (2011 и 2013 гг.) уменьшилась вовлеченность городов в эпидемию

по возрастным группам (86,4–64,4% городов), заболеваемость лиц в возрасте 15–64 лет и школьников 7–14 лет (в 1,3 раза), продолжительность эпидемии среди взрослого населения (до 6,3 нед) и летальность населения в целом (в 15 раз) и во всех возрастных группах (от 6,7 до 12 раз). Наоборот, увеличилась заболеваемость детей дошкольного возраста (в 1,4 раза) и лиц преклонного возраста (в 1,8 раза), а также продолжительность эпидемии среди детей, особенно дошкольного возраста (на 2 нед). Среди умерших увеличилась доля лиц старше 65 лет (в 4 раза) и детей 0–2 года (в 1,7 раза), а также лиц с метаболическим синдромом (до 34,4%) и сердечно-сосудистой патологией (до 33,6%).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Карпова Л.С., Маринич И. Г., Столярова Т.П., Поповцева Н.М. Анализ эпидемии гриппа А/Калифорния/07/2009 (H1N1)<sub>v</sub> в России в сезон 2009-2010 гг. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2010; 52 (3): 23–30.
2. Карпова Л.С., Маринич И.Г., Поповцева Н.М., Столярова Т.П. Эпидемиология гриппа А(H1N1) Калифорния/07/09 среди населения 49 городов России в сезон 2009–2010 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2011; 3: 14–20.
3. Киселев О.И., Ершов Ф.И., Быков А.Т., Покровский В.И., ред. *Пандемия гриппа 2009/2010: противовирусная терапия и тактика лечения*. СПб.: 2010.
4. Киселев О.И., Цыбалова Л.М., Покровский В.И., ред. *Грипп: эпидемиология, диагностика, лечение, профилактика*. М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство»; 2012.
5. Соминина А.А., Грудинин М.П., Еропкин М.Ю., Карпова Л.С., Писарева М.М., Комиссаров А.Б. и др. Анализ пандемии гриппа в России как части глобального процесса по материалам референс-центра по мониторингу гриппа. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011; 3: 20–6.
6. Бурцева Е.И., Львов Д.К., Щелканов М.Ю., Колобухина Л.В., Прилипов А.Г., Альховский С.В. и др. Особенности социркуляции вирусов гриппа в постпандемический период 2010–2011 гг. по итогам деятельности центра экологии и эпидемиологии гриппа ФГУ НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздравсоцразвития России. *Вопросы вирусологии*. 2012; 1: 20–8.
7. Карпова Л.С., Бурцева Е.И., Поповцева Н.М., Столярова Т.П. Сравнение эпидемий гриппа в России 2009 и 2011 годов, вызванных пандемическим вирусом гриппа А(H1N1). *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2011; 60 (5): 6–15.
8. Соминина А.А., Грудинин М.П., Еропкин М.Ю., Смородинцева Е.А., Писарева М.М., Комиссаров А.Б. и др. Развитие надзора за гриппом в России в системе национального центра ВОЗ по гриппу. *Вопросы вирусологии*. 2012; 6: 17–21.
9. Somnina A.A., Burtseva E.I., Eroplkin M.Yu., Karpova L.S., Zarubaev V.V., Smorodintseva E.A. et al. Influenza surveillance in Russia based on epidemiological and laboratory data for the period from 2005 to 2012. *Am. J. Infect. Dis.* 2013; 9 (3): 77–93.
10. Карпова Л.С., Соминина А.А., Пелих М.Ю., Поповцева Н.М., Столярова Т.П., Бурцева Е.И. и др. Эпидемия гриппа в России в сезон 2012–2013 годов. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*. 2013; 71 (4): 7–13.
11. Приказ Роспотребнадзора от 31.03.2005 № 373. "О совершенствовании системы эпидемиологического надзора и контроля за гриппом и острыми респираторными вирусными инфекциями". М.: 2005.
12. Методические рекомендации по оперативному анализу и прогнозированию эпидемиологической ситуации по гриппу и острым респираторным вирусным инфекциям (ОРВИ) (ГУ НИИ гриппа СЗО). Москва, Санкт-Петербург; 2006.
13. Human infection with new influenza A(H1N1) virus: Mexico update March–May 2009. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2009; 84(23): 213–20.



14. Карпова Л.С., Пелих М.Ю., Маринич И.Г. Эпидемиология гриппа А(H1N1) Калифорния/07/09 в зарубежных странах в сезон 2009–2010 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2011; 4: 20–4.
15. Карпова Л.С., Пелих М.Ю., Столяров К.А., Поповцева Н.М., Столярова Т.П. Пандемия гриппа в России как часть глобального распространения гриппа А(H1N1)pdm 09 в 2009–2011 годах. *Вопросы вирусологии*. 2012; 6: 26–30.
16. Коновалова Н.И., Еропкин М.Ю., Гудкова Т.М., Григорьева В. А., Даниленко Д. М., Иванова А. В. и др. Этиологическая характеристика эпидемий гриппа 2006–2009 гг. в РФ (по данным НИИ гриппа СЗО РАМН). *Вопросы вирусологии*. 2010; 4: 9–16.
17. Львов Д.К., Бурцева Е.И., Прилипов А.Г., Базарова М. В., Колобухина Л. В., Меркулова Л. Н. и др. Изоляция 24.05.2009 и депонирование в Государственную коллекцию вирусов (ГКВ № 2452 от 24.05.2009) первого штамма А/IV-Moscow/01/2009 от больного в Москве. *Вопросы вирусологии*. 2009; 5: 10–4.
18. Щелканов М.Ю., Львов Д.К., Шелканов М.Ю., Прилипов А. Г., Колобухина Л. В., Малышев Н. А. и др. Распространение нового пандемического вируса гриппа А(H1N1)v в России. *Вопросы вирусологии*. 2010; 5(3): 4–9.
19. Щелканов М.Ю., Львов Д.К., Федякина И.Т., Баранов Н. И., Гореликов В. Н., Резник В. Я. и др. Динамика распространения пандемического гриппа А/H1N1swI на Дальнем Востоке в 2009 г. *Вопросы вирусологии*. 2010; 55(3): 10–8.
- Ivanovo health Ministry of Russia. *Voprosy Virusologii*. 2012; 1: 20–8. (in Russian)
7. Karpova L.S., Burtseva E.I., Popovtseva N.M., Stolyarova T.P. Comparison of influenza epidemics in Russia 2009 and 2011, caused by pandemic influenza A(H1N1)v. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika*. 2011; 60 (5): 6–15. (in Russian)
8. Sominina A.A., Grudin M.P., Erokin M.Yu., Smorodintseva E.A., Pisareva M.M., Komissarov A.B. et al. Development of influenza Surveillance in Russia in the System of the WHO National Influenza Center. *Voprosy Virusologii*. 2012; 6: 17–21. (in Russian)
9. Sominina A.A., Burtseva E.I., Erokin M.Yu., Karpova L.S., Zarubaev V.V., Smorodintseva E.A. et al. Influenza surveillance in Russia based on epidemiological and laboratory data for the period from 2005 to 2012. *Am. J. Infect. Dis.* 2013; 9 (3): 77–93.
10. Karpova L.S., Sominina A.A., Pelikh M.Yu., Popovtseva N.M., Stolyarova T.P., Burtseva E.I. et al. Influenza epidemic in Russia in season 2012–13 гг. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika*. 2013; 71 (4): 7–13. (in Russian)
11. Order of Rospotrebnadzor №373 from 31.03.2005. «About improvement of system of epidemiological surveillance and control for influenza and acute respiratory virus diseases» Moscow; 2005. (in Russian)
12. Methodical Guidelines for operative analysis and prognosis of epidemiological situation for influenza and acute respiratory viral infections (ARVI) (Research Institute of Influenza NWB). Moscow, St. Petersburg; 2006. (in Russian)
13. Human infection with new influenza A(H1N1) virus: Mexico, update, MrcH–May 2009. *Wkly Epidemiol. Rec.* 2009; 84(23): 213–20.
14. Karpova L.S., Pelikh M.Yu., Marinich I.G. Epidemiology of influenza A(H1N1) California/07/09 in foreign countries in the 2009–2010 season. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunologii*. 2011; 4: 20–4. (in Russian)
15. Karpova L.S., Pelikh M.Yu., Stolyarov K.A., Popovtseva N.M., Stolyarova T.P. An influenza pandemic in Russia as part of a global the spread of the influenza A(H1N1)pdm 09 in 2009–2011y. *Voprosy Virusologii*. 2012; 6: 26–30. (in Russian)
16. Konovalova N.I., Erokin M.Ju., Gudkova T.M., Grigor'eva V. A., Danilenko D. M., Ivanova A. V. et al. Etiological characterization of influenza epidemics 2006–2009 in the Russian Federation (according to the Institute of influenza NWB RAMS). *Voprosy Virusologii*. 2010; 4: 9–16. (in Russian)
17. Lvov D.K., Burtseva E.I., Prilipov A.G., Bazarova M. V., Kolobukhina L. V., Merkulova L. N. et al. Isolation 24.05.2009 and deposition in the State collection of viruses (SCV № 2452 or 24.05.2009) of the first strain of the A/IV-Moscow/01/2009 from the patient in Moscow. *Voprosy Virusologii*. 2009; 5: 10–4. (in Russian)
18. Lvov D.K., Burtseva E.I., Shchelkanov M.Yu., Prilipov A. G., Kolobukhina L. V., Malyshev N. A. et al. The spread of a new pandemic influenza virus A(H1N1)v in Russia. *Voprosy Virusologii*. 2010; 55(3): 4–9. (in Russian)
19. Shchelkanov M.Yu., Lvov D.K., Fedyakina I.T., Baranov N. I., Gorelikov V. N., Reznik V. Ya. et al. The dynamics of the spread of the pandemic influenza A/H1N1swI in the Far East in 2009. *Voprosy Virusologii*. 2010; 55(3): 10–8. (in Russian)

#### REFERENCE

Поступила 29.05.14

Иванова В.Т.<sup>1</sup>, Иванова М.В.<sup>1</sup>, Сапурина И.Ю.<sup>2</sup>, Бурцева Е.И.<sup>1</sup>, Трушакова С.В.<sup>1</sup>, Исаева Е.И.<sup>1</sup>, Кириллова Е.С.<sup>1</sup>, Степанова Н.В.<sup>1</sup>, Оскерко Т.А.<sup>1</sup>, Манькин А.А.<sup>1</sup>

## Сравнительное исследование углеродных нанотрубок и полимерных композитов, содержащих наночастицы серебра, в качестве сорбентов вирусов гриппа А и В

<sup>1</sup>ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва; <sup>2</sup>ФГБУН «Институт высокомолекулярных соединений» РАН, 199004, г. Санкт-Петербург

Проведено сравнительное исследование сорбции вирусов гриппа и фрагментов ДНК на углеродные и полианилиновые (ПАНИ) нанотрубки, композиты – ПАНИ-нанотрубки и гранулы с добавлением серебра (Ag) и без него. Установлено повышение сорбционной способности ПАНИ трубок при включении в них серебра в случае аллантаоисных вирусов гриппа А(H1N1), А(H3N2). Исследование сорбции вирусов гриппа в зависимости от параметров среды показало, что на процесс сорбции мало влияет температура среды в диапазоне 4–36°C. Наиболее активно процесс сорбции происходил в первые 15 мин контакта вируса с сорбентами в растворе. По совокупности свойств наиболее перспективным материалом для сорбции вирусов в водных растворах являются композиты ПАНИ-нанотрубок с содержанием серебра 30%.

Ключевые слова: сорбция вирусов гриппа; ДНК; углеродные нанотрубки; композиты полианилиновых нанотрубок и гранул с серебром.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(3): 25–30.

Ivanova V. T.<sup>1</sup>, Ivanova M. V.<sup>1</sup>, Sapurina I. Yu.<sup>2</sup>, Burtseva E. I.<sup>1</sup>, Trushakova S. V.<sup>1</sup>, Isaeva E. I.<sup>1</sup>, Kirillova E. S.<sup>1</sup>, Stepanova N. V.<sup>1</sup>, Oskerco T. A.<sup>1</sup>, Manykin A. A.<sup>1</sup>

### Comparative study of carbon nanotubes and polymer composites with silver as sorbents of the influenza A and B viruses

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Institution «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya», Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia; <sup>2</sup> Institute of Macromolecular Compounds, 199004, St. Petersburg, Russia

The comparative examination of the interaction of the influenza A and B viruses and fragments of DNA with the carbon nanotubes – composites of polyaniline (PANI) nanotubes and granules containing Ag and without Ag was performed. The increased absorption of the allantois viruses and DNA was demonstrated in composites with Ag. The influence of temperature in the range of 4–36°C was not found to be essential. The intensive absorption took place within the first 15 min of the contact with the sorbents. In total, the properties of the composites of PANI nanotubes + Ag 30% are the most promising for the influenza viruses and DNA absorption in water solutions.

Key words: influenza viruses; DNA; carbon nanotubes; composites of PANI nanotubes and granules with Ag.

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(3): 25–30. (In Russ.)

For correspondence: Valeriya Ivanova, ScD; e-mail: valivanova1946@mail.ru

Received 23.05.13

Разработка новых сорбентов вирусов гриппа, позволяющих контролировать их распространение, в том числе водным путем, является актуальной задачей. С этой целью тестируются новые наноструктурированные материалы. Данное исследование является продолжением серии работ, посвященных созданию эффективных сорбентов для деконтаминации растворов от вирусов. Установлено, что представитель класса электропроводящих полимеров – полианилин (ПАНИ) способен сорбировать вирусы гриппа из водной среды [1]. Это подтверждается также результатами работы, в которой ПАНИ на магнитном носителе ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) использовали в качестве сенсора для детекции гемагглютинина вирусов гриппа А/Н5N1 [2]. Для селективного концентрирования при выявлении вирусов гриппа птиц А/Н5N1 предложен сложный композит, в состав которого наряду с полимерами входят несколько ионов металлов [3]. Поиск новых сорбентов идет в направлении модификации полимерных материалов наночастицами различных металлов и их

солей: никеля (Ni), золота (Au), титана (Ti) и серебра (Ag) [4–8].

В данной работе сопоставляется сорбционная способность различных наноструктурированных материалов по отношению к вирусам гриппа А и В. К ним относятся инертный углеродный материал в форме углеродных нанотрубок (УНТ), ПАНИ, состоящий из наночастиц со структурой трубок и гранул, а также тот же ПАНИ, модифицированный наночастицами серебра (ПАНИ-Ag). Все сорбенты состояли из наночастиц близких размеров. Выбор ПАНИ обусловлен обнаруженной ранее сорбционной активностью полимера по отношению к вирусам [1]. Представляло интерес выяснить влияние серебра, обладающего антибактериальными и антигрибковыми свойствами, на сорбционную способность ПАНИ, а также сопоставить свойства первых двух материалов с сорбционной активностью УНТ, имеющих аналогичную форму частиц, что и нанотрубки ПАНИ, но другую химическую природу.

## Материалы и методы

**Вирусы.** Использовали эталонные штаммы вирусов гриппа А/Южная Каролина/02/2010 (H1N1)pdm09, антигенно родственных вирусу гриппа свиней; А/Висконсин/67/05(H3N2), А/Виктория/361/11(H3N2), А/Утка/Приморье/2621/01(H5N2), В/Малайзия/2506/04, В/Флорида/04/06 эволюционной линии В/Виктория/2/87 и В/Ямагата/16/88 соответственно из коллекции вирусов гриппа Центра экологии и эпидемиологии гриппа ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Очищенные вирусы получали после концентрации аллантоисной вирусосодержащей жидкости путем центрифугирования при 24 000 тыс. об/мин в течение 1 ч и последующей очистки также центрифугированием при 24 000 тыс. об/мин в градиенте концентрации сахарозы 20–40% (центрифуга L5-50 фирмы «Бекман»). Вирусы определяли в растворах по реакции гемагглютинации (РГА) с использованием взвеси 0,75% эритроцитов человек группы крови 0(I). Титры вирусов выражали в гемагглютинирующих единицах (ГАЕ). В работе исследовали также сорбцию альбумина сыворотки крови рогатого скота и фрагменты нуклеиновых кислот. Ампликоны – фрагменты ДНК получены при амплификации участков РНК генов современных штаммов вирусов гриппа А и В в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием диагностических тест-систем ООО «ДНК-технология», Москва «Пан H1N1», «Influenza A virus», «Influenza B virus». Электрофорез фрагментов кДНК проводили в 2% агарозном геле в течение 1,5 ч при напряжении 80В; в качестве положительного контроля применяли контрольные образцы, входящие в тест-системы. Гели фотографировали и анализировали, используя трансиллюминатор ультрафиолетового света с длиной волны  $\lambda = 254$  нм.

**Сорбенты.** Многостенные УНТ, полученные методом каталитического пиролиза углеводородов и очищенные от катализатора, приобретены у фирмы «ТАУНИТ» (Тамбов). УНТ имели диаметр 50–100 нм и длину несколько микрон, трубки использовали без дальнейшей очистки и модификации.

Нанотрубки ПАНИ, впервые описанные в работе [9], с наружным диаметром 100–200 нм и длиной несколько микрон получены методом окислительной полимеризации анилина под действием пероксида сульфата аммония в присутствии уксусной кислоты [10].

Композиционный сорбент ПАНИ-Ag получен путем модификации нанотрубок ПАНИ либо ПАНИ гранулярной морфологии с частицами серебра [11]. Нанесение серебра происходило в результате взаимодействия ПАНИ с азотнокислым серебром  $\text{AgNO}_3$  в водной среде. Серебро восстанавливалось на поверхности ПАНИ в виде частиц диаметром 30–50 нм либо более крупных образований. Содержание серебра определялось по приросту массы композита и составляло 30 и 70% ПАНИ-Ag массы сорбента (ПАНИ-Ag(30%) и ПАНИ-Ag(70%).

Электронно-микроскопические исследования выполняли с помощью сканирующего и просвечивающего микроскопов SUPR-55VP от «Zeiss» (Германия) и JSPM-5400 от «JEOL» (Япония).

Исследование адсорбции биологического материала (вирусов, альбумина, антител и кДНК) на сорбенты проводили по методу, разработанному и описанному в

публикации [1]. Параметры сорбции: навеска сорбента – 4–5 мг, объем раствора с образцом 200–300 мкл. Начальный гемагглютинирующий титр вируса в вирусосодержащей жидкости, разведенной в физиологическом растворе (ФР), варьировал от 64 до 16 000 ГАЕ. Контакт биологических образцов с сорбентами длился от 10 до 60 мин при перемешивании на шейкере в диапазоне температур от 4 до 37°C. Сформированные комплексы, содержащие сорбенты и биологические объекты, центрифугировали при 2000 тыс. об/мин в течение 4 мин; надосадочную жидкость исследовали на наличие несвязанного биологического объекта, в случае вируса – в РГА. Осадок, содержащий сорбент с иммобилизованным вирусом, исследовали в экспериментах по десорбции вируса. Емкость сорбентов определяли как общее количество сорбированного на носителе вируса и выражали в ГАЕ на 1 мг носителя.

Десорбцию вируса с иммуносорбента проводили в ФР. Иммуносорбенты смешивали с растворами и инкубировали при 4 и 22°C в течение 1, 24, 48 ч. Затем иммуносорбенты осаждали и центрифугировали в течение 5 мин. Надосадочную жидкость исследовали на наличие вируса в РГА. В опытах по десорбции использовали концентрированные при ультрацентрифугировании и разведенные в ФР вирусы гриппа.

При исследовании сорбции сывороточных белков-антител сорбенты смешивали с раствором иммунной сыворотки в ФР. Контакт белков с сорбентом осуществлялся в течение 16 ч при 4°C, затем смесь центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 мин. Титр антител в растворе иммунной сыворотки до сорбции и после контакта с сорбентами (в надосадочной жидкости после центрифугирования) проверяли в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с гомологичным вирусом.

## Результаты и обсуждение

**Морфология используемых сорбентов.** На рис. 1 (а–г) приведены фотографии используемых в работе сорбентов, полученные методом электронной микроскопии. Частицы УНТ имеют диаметр 50–100 нм и длину несколько микрон. По данным производителя, удельная площадь поверхности материала составляет 300–600 м<sup>2</sup>/г. Материал пористый и поверхность частиц хорошо доступна для реагентов (см. рис. 1, а). Нанотрубки ПАНИ представляют собой частицы несколько большего диаметра 100–200 нм и микронной длины (см. рис. 1, б). Видно, что поверхность ПАНИ более шероховатая, чем поверхность УНТ, помимо этого, в отличие от гидрофобного углерода ПАНИ – гидрофильный материал, который хорошо смачивается водой, что может улучшать контакт сорбента с биологическим материалом. При взаимодействии восстановленной формы ПАНИ с  $\text{AgNO}_3$  ион серебра  $\text{Ag}^+$  восстанавливается до металлического состояния. Поскольку восстановление происходит на поверхности ПАНИ, частицы металла стабилизируются полимерной матрицей и отсутствует дальнейшее интенсивное слипание, что позволяет получать частицы нано- и субмикронных размеров. На фотографиях просвечивающей электронной микроскопии металл обнаруживается в виде темных точек и пятен. Пятна представляют собой более крупные агломераты частиц серебра, размеры которых составляют сотни нанометров. ПАНИ гранулярной структуры с частицами диаметром 100–150 нм представлен на рис. 1, г. В композите с

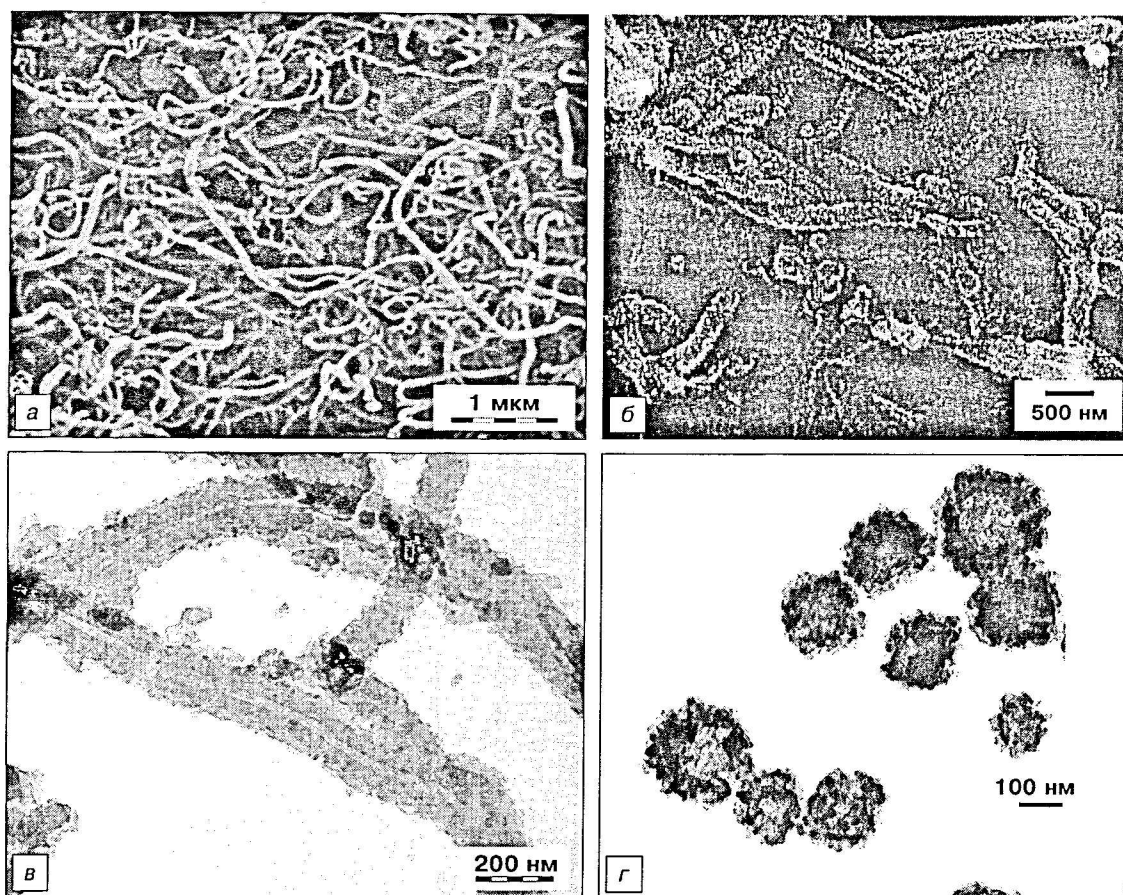


Рис. 1. Электронная микроскопия сорбентов УНТ (а), нанотрубки ПАНИ (б), нанотрубки ПАНИ-Ag(30%) (в), гранулы ПАНИ-Ag(70%) (г).

частицами ПАНИ в виде гранул ПАНИ-Ag(70%) серебра заметно больше, чем в ПАНИ-Ag(30%) в виде нанотрубок (см. рис. 1, в) и оно обнаруживается в виде сферических частиц на поверхности полимерных гранул. Во всех случаях частицы металла локализуются на поверхности ПАНИ, находясь в контакте с электропроводящим полимером.

Следует отметить, что в настоящее время в разных лабораториях разработано достаточное количество наноразмерных частиц различной структуры (органической и неорганической природы) и формы. Они могут быть представлены в виде шариков, дендритных структур, палочек, одно- и многостенных трубок и т. д.

*Исследование сорбции вирусов.* Для изучения активности сорбентов был использован широкий набор вирусов: вирусы гриппа человека А и В с разной антигенной формулой, а также вирусы гриппа птиц А/НСN2. Выбор вирусов был обусловлен их широким распространением в человеческой популяции, высокой изменчивостью генома вирусов, возникновением эпидемий и пандемий с поражением животных и птиц, а также многообразными способами передачи вирусов, в том числе водным путем.

В таблице представлены результаты сорбции различных типов вирусов четырьмя видами сорбентов. Были использованы как очищенные вирусы, так и аллантоиновые вирусы без очистки, содержащие большое количество аллантоиновых белков в растворе. Показателем сорбционной активности сорбента слу-

жил остаточный ГАЕ-титр вируса в растворе после контакта с сорбентом. Он уменьшался в 4–512 раз в зависимости от пары сорбент – вирус, начального титра и степени очистки вируса. Сорбция не зависела от антигенных свойств вирусов гриппа. Введение серебра в частицы ПАНИ приводило к увеличению их сорбционной активности.

Для всех видов сорбентов проведено исследование сорбции вирусов гриппа в зависимости от разных условий эксперимента: массы сорбента, температуры сорбции в диапазоне 4–36°C, времени контакта сорбента с вирусом. Изучена также возможность десорбции вирусов. Результаты эксперимента представлены на рис. 2.

Результаты исследования указывали на влияние массы взятого сорбента при использовании УНТ и ПАНИ-Ag(70%) (см. рис. 2, а). Так, использование концентрации УНТ 1 мг/мл приводило лишь к двукратному снижению начального титра 120 (РГА), а с увеличением концентрации УНТ до 4 мг/мл титр уменьшался в 6 раз. В случае ПАНИ титр снижался в 6 раз уже при концентрации 1 мг/мл сорбента, а для нанотрубок ПАНИ-Ag(30%) в этих условиях наблюдалась практически полная сорбция вируса. Далее была отмечена независимость титра от увеличения содержания сорбента.

Для всех сорбентов не выявлено различий в сорбции вирусов при разных температурах – 4, 22, 34°C (см. рис. 2, б).

Как показали исследования (см. рис. 2, в), сорбция

вирусов наиболее активна в первые 15 мин контакта с сорбентом. При этом наблюдалось наибольшее падение титра вируса в растворе (примерно в 8 раз), далее в течение 60 мин процесс шел не столь активно и титр снижался еще в 2 раза. Отдельный вопрос представляет собой десорбция вирусов с сорбентов. Исследование показывает, что она слабая или вообще отсутствует (см. рис. 2, з).

*Взаимодействие сорбентов с белками невирусной природы.* Для определения возможности взаимодействия сорбентов с белками невирусной природы был проведен эксперимент с альбумином, выделенным из бычьей сыворотки, который активно используется в иммунологических реакциях. В эксперименте сорбенты предварительно помещали в отдельные флаконы, содержащие препараты альбумина с концентра-

цией от 1 до 4 мг/мл, после чего проводился эксперимент по сорбции на контактировавший с альбумином сорбент вируса гриппа по той же схеме с методикой определения ГАЕ-титров. Как показали исследования, в случае ПАНИ предварительная сорбция альбумина не влияла на сорбцию вирусов, т. е. функциональных групп на поверхности ПАНИ и нанотрубок ПАНИ-Аг было достаточно для взаимодействия и с альбумином, и с вирусами. Ситуация была иная с УНТ: на УНТ вирус мог сорбироваться только при концентрации альбумина ниже или равной 1 мг/мл (см. рис. 2, д). Это говорит о низкой емкости УНТ по отношению к сорбции биологических объектов. При повышении концентрации белка УНТ уже не способны связывать вирусы.

По степени активности исследуемые сорбенты

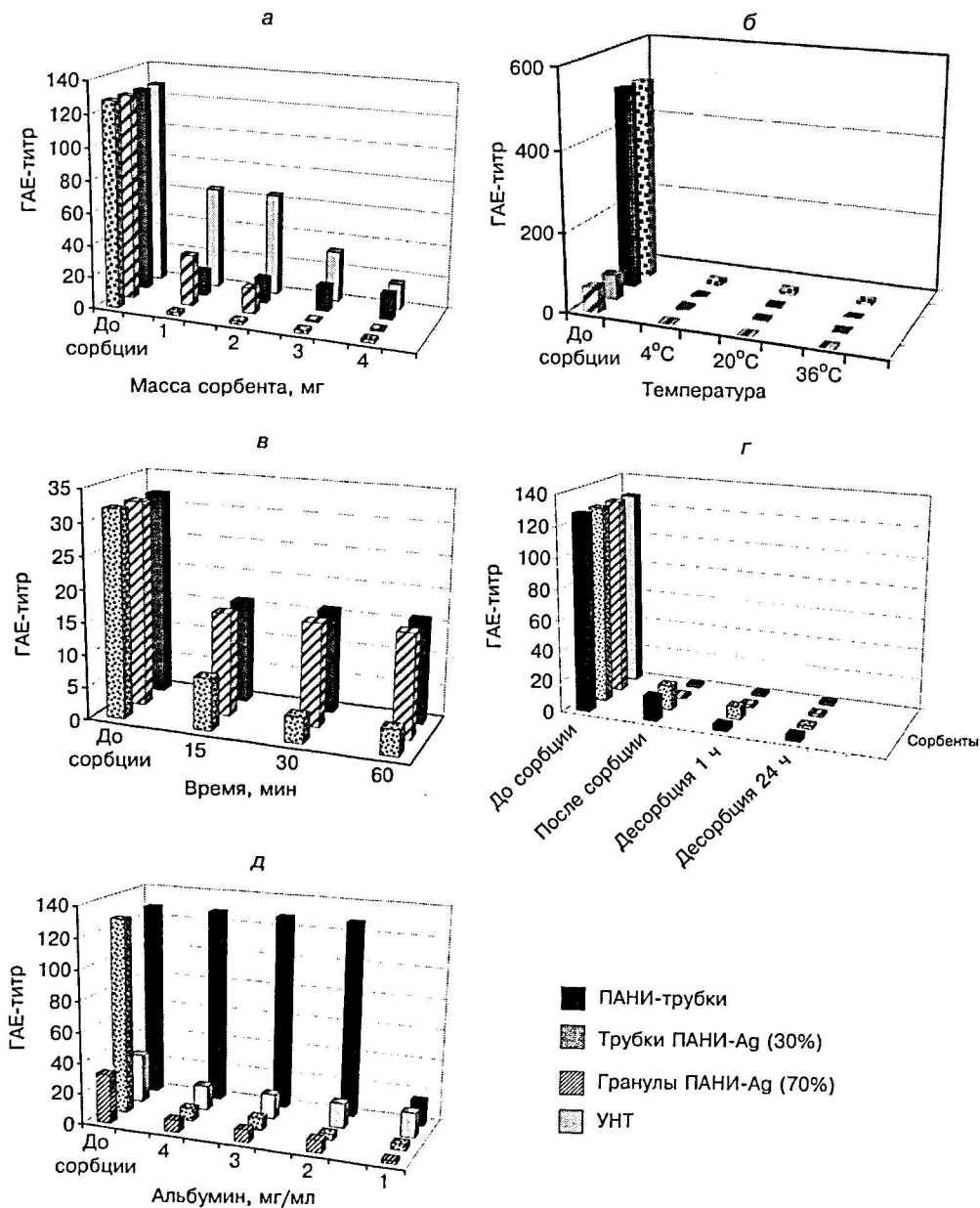


Рис. 2. Сорбция вирусов гриппа А и В на сорбенты в зависимости от массы сорбентов (а), температуры среды (б), времени контакта вируса с сорбентами (в), сорбция и десорбция вирусов в ФР с ПАНИ и ПАНИ-Аг(30%)-нанотрубок (г), зависимость от концентрации альбумина (д).

Адсорбция вирусов гриппа на полимерные и углеродные сорбенты

Сорбент	Вирус	Титр вируса ГАЕ в растворе		Титр вируса после десорбции при комнатной t
		до сорбции	после сорбции	
ПАНИ-трубки	В/Флорида 04/06 концентрированный	128	2	2
ПАНИ-Ag(30%)-трубки		128	4	2
ПАНИ-трубки	А/Ожняя Кароллина/02/2010 (H1N1)pdm09 концентрированный	128	8	н.и.
ПАНИ-Ag(30%)-трубки		128	8	н.и.
ПАНИ-трубки	А/Приморье/2621/01 (H5N2)	128	64-128	н.и.
ПАНИ-Ag(30%)-трубки	Аллантоисный 1:2	128	4	н.и.
ПАНИ-трубки	А/Висконсин 67/05 (H3N2) (очищенный)	2048	< 2	н.и.
ПАНИ-Ag(30%)-трубки		2048	16	н.и.
ПАНИ-трубки		256	< 2	н.и.
ПАНИ-Ag(70%)-гранулы		256	< 2	н.и.
УНТ (Тамбов)		256	< 2	н.и.
То же	В/Малайзия/2506/04 очищенный	4096	128	н.и.
" "	А/Москва/01/2009 А(H1N1)sw аллантоисный	64	16	н.и.
" "	А/Виктория/361/11 (H3N2) аллантоисный	512	256	н.и.
ПАНИ-трубки		512	128-256	н.и.
ПАНИ-Ag(30%)-трубки		512	8	н.и.
ПАНИ-Ag(70%)-гранулы		512	128-256	н.и.

Примечание. н.и. – не исследовали, масса сорбента в опыте составляла 4 мг.

могут быть расположены в следующем порядке: ПАНИ-Ag(30%), > ПАНИ-Ag(70%) ~ ПАНИ > УНТ. Наибольшей активностью обладал ПАНИ-Ag(30%), эффективность ПАНИ и ПАНИ-Ag(70%) была примерно равной.

*Определение способности иммобилизованных сорбентом вирусов связываться с антителами.* Помимо исследования сорбции вирусов была изучена способность вируса, сорбированного на трубчатые сорбенты, связываться с антителами. Для этого вначале вирус был иммобилизован на сорбент, затем по аналогии с иммуноферментным методом к нему был добавлен 1% раствор альбумина и раствор гомологичной сыворотки 1:10. После контакта компонентов в течение 1 ч при 22°C иммуносорбент осаждали из раствора методом центрифугирования. Надосадочная жидкость и раствор иммунной сыворотки до сорбции были исследованы на наличие антител в РТГА. Исследования показали, что в случае нанотрубок ПАНИ-Ag(30%) титр антител уменьшается в 2 раза, для гранул ПАНИ-Ag(70%) – в 4 раза, а для нанотрубок ПАНИ и УНТ падения титра не наблюдалось. Это можно объяснить более низкой сорбционной способностью ПАНИ и УНТ в сравнении с композициями, содержащими серебро.

*Исследование сорбции к ДНК вирусов гриппа А и В.* На рис. 3 представлены данные электрофоретического анализа об обнаружении фрагментов ДНК вирусов гриппа А и В. Сопоставляются результаты до и после сорбции ДНК всеми ти-

пами сорбентов. В случае ПАНИ-трубок снижение содержания ДНК в растворе достигало 8%. Наибольшей сорбционной способностью (до 44%) обладали нанотрубки ПАНИ-Ag(30%). С повышением концентрации серебра в гранулах до 70% наблюдалось уменьшение связывания ДНК до 5%. Возможно, это объясняется разным содержанием во фрагментах ДНК гуанина и аденина. Как показали спектроскопические исследования [12], в водных растворах с рН 7,1–6,6 при постоянной концентрации ДНК или РКН и различных концентрациях серебра Ag (I) формирует с ДНК комплексы связывания катиона с гуанином (при низкой концентрации) и аденином (при более высоких концентрациях), но не с боковыми фосфатными группами.

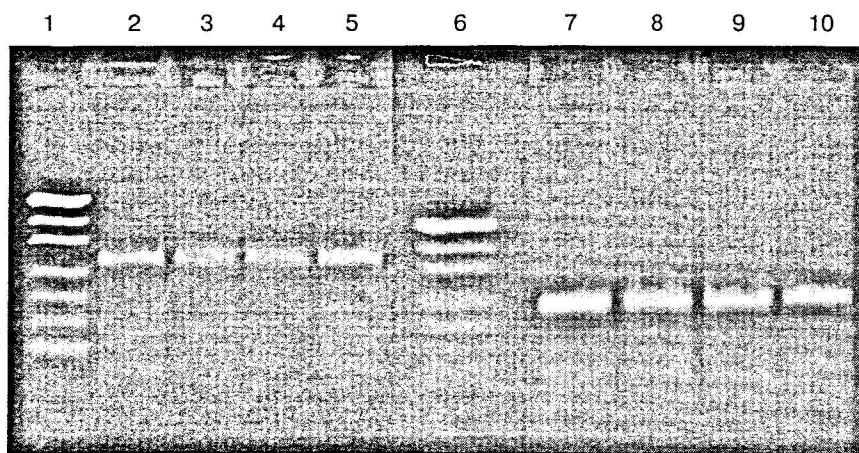


Рис. 3. Электрофорез фрагментов ДНК, амплифицированных участков РНК эпидемических штаммов вирусов гриппа А и В сезона 2011–2012 гг. на ПАНИ-нанотрубки и композиты с ПАНИ-Ag.

Дорожки: плазмиды РUC 19 – 1, 6; ДНК до сорбции – 2, 7; ДНК после сорбции на ПАНИ-трубки – 3, 8; ДНК после сорбции на ПАНИ-Ag(30%) – 4, 9; ДНК после сорбции на ПАНИ-Ag(70%) – 5, 10.

По результатам исследования сорбционной способности вирусов гриппа А и В композит ПАНИ-Аg(30%) лидирует. Он демонстрирует более полное извлечение не только очищенных вирусов из водных растворов, но также вирусов из аллантоисной жидкости, разведенной ФР. Введение 30% массы наночастиц серебра улучшило характеристики ПАНИ-трубок. В то же время повышение массовой доли серебра в композите до 70% отрицательно сказалось на сорбционных характеристиках материала. Таким образом, можно говорить о синергическом эффекте двух материалов - ПАНИ и серебра. Однако в настоящее время не представляется возможным обсуждать сорбционный механизм нанотрубок ПАНИ-Аg(30%), поскольку, по-видимому, он достаточно сложен.

Хорошо известно, что серебро оказывает сильное бактерицидное действие и используется как для лечения грибковых заболеваний, бактериальных инфекций, так и для дезинфекции медицинского оборудования [13]. Недавние исследования подтверждают противовирусную активность наночастиц серебра. Показана сорбция его наночастиц на ВИЧ-1, которая приводила к утрате вирусом способности связываться с клеткой рецептором [14]. Наблюдалось ингибирующее действие наночастиц серебра по отношению к клеткам организма (Hut/CCR5), инфицированным ВИЧ-1. Показано также, что композиты серебра с соединениями, содержащими тиоловые группы, снижают активность цитомегаловирусов в клетках HeLa [15].

### Заключение

Использование нанотрубок ПАНИ-Аg(30%) открывает возможность создания универсальных фильтров для очистки воды от бактерий, грибковых инфекций и вирусов. Продемонстрированная нами ранее сорбционная способность ПАНИ по отношению к вирусам гриппа А и В усиливается в присутствии серебра. Одновременно наличие наночастиц серебра в материале фильтра обеспечивает противогрибковый и бактерицидный эффекты.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Иванова В.Т., Иванов В.Ф., Курочкина Я.Е., Грибкова О.Л., Ильина М.В., Машькин А.А. Взаимодействие вирусов гриппа А и В с наноразмерными комплексами полианилина. *Вопросы вирусологии*. 2009; 3: 21–5.
2. Kamikawa T. L., Mikolajczyk M.G., Kennedy M., Zhang P., Wang W., Scott D.E. et al. Nanoparticle-based biosensor for the detection of emerging pandemic influenza strains. *Biosens Bioelectron*. 2010; 26(4): 1346–52.
3. Ефременко В.И., Львов Д.К., Дерябин П.Г., Левченко Н.В., Жарникова И.В., Василенко Н.О. и др. Экспериментальные данные по выявлению вирусов гриппа птиц с помощью магнитных иммуносорбентов. *Вопросы вирусологии*. 2008; 3: 43–5.
4. Asghari F., Jahanshahi M., Ghoreyshi A.A., Rad A.S. Fabrication and evaluation of nickel-agarose nanoporous adsorbents for nanobio-separation purification: The influences of preparation agitating speed on the adsorbent hydrodynamic behaviour. In: *Conference materials «Colloids and Nanomedicine», 15–17 July 2012*. Amsterdam, The Netherlands; 2012.
5. Blakey I., Thurecht K.J., Fredericks P.M. Constructs for optical biomedical imaging agents: Controlling the optical properties of polymer stabilized gold nanoparticle aggregates. In: *Conference materials «Colloids and Nanomedicine», 15–17 July 2012*. Amsterdam, The Netherlands; 2012; P2.116.
6. Talom R. Mayap, Boudon J., Denat F. et al. Functionalized titanate nanotubes as a potential versatile platform for theranostic. In: *Conference materials «Colloids and Nanomedicine», 15–17 July 2012*. Amsterdam, The Netherlands; 2012; P1.115.

7. Щербakov Ф.Б. и др. Препараты серебра: вчера, сегодня и завтра. *Фармацевтический журнал (Укр)*. 2006; 5: 45–57.
8. Prodan A.M., Ciobanu C.S., Iconaru S.L. et al. Antibacterial activity of silver doped hydroxyapatite nanoparticles. In: *Conference materials «Colloids and Nanomedicine», 15–17 July 2012*. Amsterdam, The Netherlands; 2012; P2.47.
9. Wei Z.X., Zhang Z.M., Wan M.X. Formation mechanism of self-assembled polyaniline micro/nanotubes. *Langmuir*. 2002; 18: 917–21.
10. Сапурина И.Ю., Стрейскал Я. Влияние pH на курс окислительной полимеризации анилина, морфологию и свойства продуктов. *Успехи химии*. 2010; 79(12): 1218–39.
11. Stejskal J., Prokeš J., Sapurina I. The reduction of silver ions with polyaniline: The effect of the type of polyaniline and the mole ratio of the reagents. *Mater. Lett*. 2009; 63: 709–11.
12. Arakava H., Neault J.F., Tajmir-Riahi H.A. Complex with DNA and PNA studied by Fourier transform infrared Spectroscopy and Capillary electrophoresis. *Biophys. J*. 2001; 81: 1580–7.
13. Capelli, Christopher C. Silve – based pharmaceutical compositions. Patent US № 5 744151, 1998.
14. Elechiguerra J. L., Burt J.L., Morones J.R., Camacho-Bragado A., Gao X., Lara H.H. et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J. Nanobiotechnology*. 2005; 3: 6.
15. Oda M., Itoh H., et al. Antibacterial, antifungal and antiviral agent. Patent US № 5, 792, 793, 1998.

### REFERENCE

1. Ivanova V.T., Ivanov V.F., Kurochkina Ya.E., Gribova O.L., Il'ina M.V., Manykin A.A. Influenza virus interaction with nanocomplex of polyaniline. *Voprosy Virusologii*. 2009; 3: 21–6. (in Russian)
2. Kamikawa T. L., Mikolajczyk M.G., Kennedy M., Zhang P., Wang W., Scott D.E. et al. Nanoparticle-based biosensor for the detection of emerging pandemic influenza strains. *Biosens Bioelectron*. 2010; 26(4): 1346–52.
3. Efrementko V.I., L'vov D.K., Deryabin P.G., Levchenko N.V., Zharnikova I.V., Vasilenko N.O. et al. Experimental data on avian influenza virus detection using magnetic immunosorbents. *Voprosy Virusologii*. 2008; 3: 43–5. (in Russian)
4. Asghari F., Jahanshahi M., Ghoreyshi A.A., Rad A.S. Fabrication and evaluation of nickel-agarose nanoporous adsorbents for nanobio-separation purification: The influences of preparation agitating speed on the adsorbent hydrodynamic behaviour. In: *Conference materials «Colloids and Nanomedicine», 15–17 July 2012*. Amsterdam, The Netherlands; 2012.
5. Blakey I., Thurecht K.J., Fredericks P.M. Constructs for optical biomedical imaging agents: Controlling the optical properties of polymer stabilized gold nanoparticle aggregates. In: *Conference materials «Colloids and Nanomedicine», 15–17 July 2012*. Amsterdam, The Netherlands; 2012; P2.116.
6. Talom R. Mayap, Boudon J., Denat F. et al. Functionalized titanate nanotubes as a potential versatile platform for theranostic. In: *Conference materials «Colloids and Nanomedicine», 15–17 July 2012*. Amsterdam, The Netherlands; 2012; P1.115.
7. Shcherbakov F.B. et al. Silver products: yesterday, today, and tomorrow. *Farmatsevticheskiy Zhurnal (Ukr)*. 2006; 5: 45–57. (in Russian)
8. Prodan A.M., Ciobanu C.S., Iconaru S.L. et al. Antibacterial activity of silver doped hydroxyapatite nanoparticles. In: *Conference materials «Colloids and Nanomedicine», 15–17 July 2012*. Amsterdam, The Netherlands; 2012; P2.47.
9. Wei Z.X., Zhang Z.M., Wan M.X. Formation mechanism of self-assembled polyaniline micro/nanotubes. *Langmuir*. 2002; 18: 917–21.
10. Sapurina I.Yu., Steyskal Ya. The effect of pH on the oxidative polymerization of aniline and the morphology and properties of products. *Uspekhi Khimii*. 2010; 79(12): 1–22. (in Russian)
11. Stejskal J., Prokeš J., Sapurina I. The reduction of silver ions with polyaniline: The effect of the type of polyaniline and the mole ratio of the reagents. *Mater. Lett*. 2009; 63: 709–11.
12. Arakava H., Neault J.F., Tajmir-Riahi H.A. Complex with DNA and PNA studied by Fourier transform infrared Spectroscopy and Capillary electrophoresis. *Biophys. J*. 2001; 81: 1580–7.
13. Capelli, Christopher C. Silve – based pharmaceutical compositions. Patent US № 5 744151, 1998.
14. Elechiguerra J. L., Burt J.L., Morones J.R., Camacho-Bragado A., Gao X., Lara H.H. et al. Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *J. Nanobiotechnology*. 2005; 3: 6.
15. Oda M., Itoh H., et al. Antibacterial, antifungal and antiviral agent. Patent US № 5, 792, 793, 1998.

Лободанов С.А.<sup>1,2</sup>, Киселев И.С.<sup>1</sup>, Аммури Ю.И.<sup>1</sup>, Горбаленя А.Е.<sup>3,4</sup>, Клаас Е.С.Д.<sup>3</sup>, Зверев В.В.<sup>1</sup>, Файзулов Е.Б.<sup>1</sup>

## Исследование видовой структуры риновирусов и коронавирусов, циркулировавших в Московском регионе в период с 2007 по 2012 г.

<sup>1</sup>ФГБУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва; <sup>2</sup>ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва; <sup>3</sup>Отдел медицинской микробиологии, Медицинский центр Лейденского университета, г. Лейден, 2314ЕВ, Нидерланды; <sup>4</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ им. М. В. Ломоносова, 119991, г. Москва

Риновирусы (РВ) и коронавирусы (КВ) являются основными возбудителями острых заболеваний верхних отделов дыхательных путей. Вместе с тем они могут вызывать и более тяжелые заболевания респираторного тракта, а их виды различаются по патогенности. В данной работе изучали видопринадлежность РВ и КВ в 92 клинических образцах, положительных на эти вирусы, которые были собраны на территории Московского региона в период с 2007 по 2012 г. С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) установлена циркуляция всех видов РВ (РВ-А, РВ-В и РВ-С) и КВ (КВ-NL63, КВ-229Е, КВ-OC43 и КВ-НКУ1). Выборочное секвенирование и филогенетический анализ фрагмента 5'-нетранслируемого района (5'-НТР) 8 изолятов риновирусов выявили 4 случая РВ-С, 3 – РВ-А и 1 – РВ-В.

Ключевые слова: риновирусы; коронавирусы; видопринадлежность; патогенность.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(3): 31–36.

Lobodanov S. A.<sup>1,2</sup>, Kiselev I. S.<sup>1</sup>, Ammour Y. I.<sup>1</sup>, Gorbalenya A. E.<sup>3,4</sup>, Claas E. C. J.<sup>3</sup>, Zverev V. V.<sup>1</sup>, Faizuloev E. B.<sup>1</sup>

### The prevalence of the human rhinoviruses and coronaviruses circulating in the Moscow region during 2007-2012

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Institution «I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera», 105064, Moscow, Russia; <sup>2</sup>Federal Budget Institution of Science «Central Research Institute of Epidemiology» of the Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-Being Surveillance, 111123, Moscow, Russia; <sup>3</sup>Department of Medical Microbiology, Leiden University Medical Center, Leiden, Netherlands; <sup>4</sup> Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, Russia

The rhinoviruses and coronaviruses are the most common causative agents of the acute upper respiratory tract infection in humans. They include several species that vary in the pathogenicity, some causing severe respiratory tract diseases. In this work, the species prevalence of rhinoviruses and coronaviruses was studied in 92 virus-positive clinical patients that were collected at the area of the Moscow region during the period from 2007 to 2012. Using the real-time PCR the virus circulation has been established for all species common in humans, including three rhinoviruses, HRV A, HRV B, and HRV C, and four coronaviruses, HCoV-NL63, HCoV-229E, HCoV-OC43, and HCoV-NKU1. For eight patients, the identity of the rhinoviruses, including 4 cases of HRV-C, 3 cases of HRV-A, and a single case of HRV-B, was corroborated using partial sequencing of the 5 non-coding regions and phylogenetic analysis. The viruses of HRV-C, HCoV-NL63, and HCoV-OC43 were prevalent in children with severe respiratory diseases.

Key words: rhinoviruses; coronaviruses; species prevalence; pathogenicity.

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(3): 31–36. (In Russ.)

For correspondence: Sergey Lobodanov, MD, PhD; e-mail: lobodanov84@gmail.com

Received 11.03.14

### Введение

Риновирусы (РВ) и коронавирусы (КВ) являются основными возбудителями так называемых простудных заболеваний (англ. common cold), для которых характерно поражение верхних отделов респираторного тракта и легкое либо среднетяжелое течение [1]. По данным Национального института аллергии и инфекционных болезней (г. Бетесда, США), эти вирусы ответственны как минимум за половину всех случаев простуды у детей и взрослых [2]. Однако анализ новых научных данных свидетельствует о все возрастающей роли этих патогенов в этиологии тяжелых заболеваний дыхательных путей вплоть до развития пневмонии [3, 4]. Следует отметить, что такие современные молекулярно-биологические методы анализа

вирусных геномов, как полимеразная цепная реакция (ПЦР) с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и секвенирование, позволяют осуществлять тонкую генетическую характеристику различных возбудителей. Благодаря таким методам стало возможным дифференциальное выявление видов РВ и КВ, циркулирующих в человеческой популяции [5, 6].

Патогенными для человека являются все 3 известных вида РВ человека – *rhinovirus A* (РВ-А), *rhinovirus B* (РВ-В) и *rhinovirus C* (РВ-С) (род *Enterovirus*, семейство *Picornaviridae*) [7], а также 6 видов коронавирусов человека (подсемейство *Coronavirinae*, семейство *Coronaviridae*) – *Human coronavirus 229E* (КВ-229Е), *Human coronavirus NL63* (КВ-NL63) (род *Alphacoronavirus*), *Human coronavirus OC43* (КВ-



OC43), *Human coronavirus HKU1* (KB-HKU1), *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* (KB-TOPC), а также вирус – возбудитель ближневосточного респираторного синдрома (англ. Middle East respiratory syndrome coronavirus – MERS-CoV), вид которого еще формально не определен и который условно обозначен как KB-БВРС (род *Betacoronavirus*) [7, 8]. KB-TOPC, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (англ. SARS), и KB-БВРС являются наиболее патогенными для человека. В 2003 г., когда мир столкнулся с эпидемией атипичной пневмонии, вызванной KB-TOPC зоонозного происхождения, было зарегистрировано около 8000 случаев заболевания, при этом летальность составила примерно 10%. Начиная с 2012 г. наблюдается ограниченная циркуляция KB-БВРС на Аравийском полуострове; инфицирование этим вирусом, который, вероятно, также зоонозного происхождения, приводит к развитию не только пневмонии, но и острой почечной недостаточности [9]. Зарегистрировано более 170 лабораторно подтвержденных случаев инфекции KB-БВРС, большинство из которых имели место в Саудовской Аравии и сопровождались крайне высокой смертностью – до 40% [10]. В связи с высокой патогенностью за циркуляцией KB-TOPC и KB-БВРС в соответствии с рекомендациями ВОЗ установлен специальный эпидемиологический надзор, поэтому в данной работе анализ на наличие этих вирусов в клинических образцах не проводился.

Цель настоящей работы – определить видовую структуру РВ и KB, циркулирующих на территории Московского региона, и оценить их роль в развитии респираторных заболеваний различной степени тяжести. В работе проводили дифференциальное выявление 3 видов РВ человека – РВ-А, РВ-В и РВ-С и 4 видов KB человека – KB-229Е, KB-NL63, KB-HKU1 и KB-OC43.

### Материалы и методы

В работе были использованы 63 клинических образца, содержащие РНК РВ и 29 образцов, содержащих РНК KB. Эти образцы были охарактеризованы на наличие указанных вирусов с использованием лабораторного набора реагентов для дифференциального выявления 12 групп различных респираторных вирусов методом ПЦР-РВ в ходе предварительных исследований [11, 12]. Образцы от пациентов разных возрастов с симптомами ОРВИ собирали в различных лечебно-профилактических учреждениях Москвы и Московской области в период с 2007 по 2012 г. Вирусную РНК выделяли, используя набор реагентов «ZR Viral RNA Kit» («Zymo Research», США) в соответствии с рекомендациями производителя. В основе этого набора лежит модификация метода выделения нуклеиновых кислот, предложенная R. Boom и соавт. [13]. В качестве контрольных в работе использованы образцы РНК РВ серотипов 2, 8, 14, 15, 17, 20, 59, 70, 72, 86, а также РНК лабораторных штаммов KB-229Е, KB-OC43 из клинических образцов, охарактеризованных на наличие РНК KB.

Анализ вирусных геномов, подбор нуклеотидных последовательностей праймеров и зондов проводили с помощью компьютерных программ FastPCR Professional v. 6.1.32. beta 3 («Primer Digital Ltd.», Финляндия) и Vector NTI Advance v. 9.0 («InforMax Inc.», США), а также интернет-программы BLAST

(«NCBI», США). Праймеры и меченные флюоресцентными красителями зонды были синтезированы в ЗАО «Синтол» (Россия).

При постановке реакции обратной транскрипции (ОТ) 12 пмоль праймера для ОТ смешивали с 10 мкл РНК и прогревали в течение 5 мин при 65°C. Далее в 25 мкл реакционной смеси, содержащей, помимо смеси праймеров и РНК, 10 мкл «Реакционной смеси 2,5<sup>x</sup> для проведения ПЦР-РВ», 25 ед. ревертазы MMLV (ЗАО «Синтол», Россия) в течение 30 мин при 42°C получали кДНК. Фермент инактивировали нагреванием при 95°C в течение 5 мин.

При постановке моноспецифической ПЦР-РВ (при исследовании кДНК РВ) амплификацию выполняли в 50 мкл реакционной смеси, которая содержала 10 мкл «Реакционной смеси 2,5<sup>x</sup> для проведения ПЦР-РВ», смесь соответствующих наборов праймеров (12 пмоль каждого праймера), соответствующий флюоресцентно-меченный зонд TaqMan (5 пмоль), 2,5 ед. Hot Start Taq-ДНК-полимеразы (ЗАО «Синтол», Россия) и 25 мкл кДНК. Реакцию проводили в детектирующем термоциклере ДТ-96 (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Россия). Программа ПЦР: 95°C – 120 с – 1 цикл; 95°C – 20 с, 64°C – 40 с – 45 циклов.

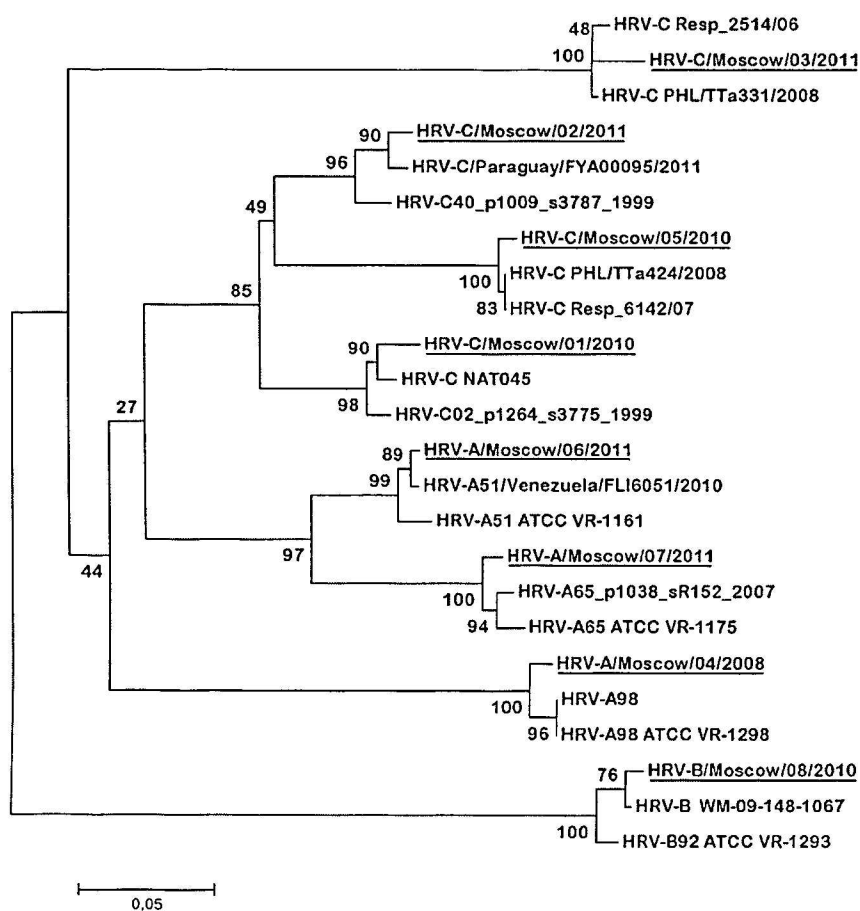
Вид KB определяли одновременно в двух пробирках в мультиплексном формате ПЦР-РВ. Первая реакционная смесь содержала набор праймеров и зондов для выявления альфа-KB – KB-229Е и KB-NL63, а вторая – для выявления бета-KB – KB-HKU1 и KB-OC43 [6]. Температурно-временной режим амплификации был следующим: 95°C – 120 с – 1 цикл; 95°C – 20 с, 57°C – 40 с – 45 циклов. Концентрации компонентов реакционных смесей были такими же, как при выявлении РВ.

Филогенетический анализ проводили в программе Mega 5, используя метод максимального правдоподобия – ML (maximum likelihood) и 3-параметрическую эволюционную модель Тамуры. Для построения филогенетического дерева выполняли множественное выравнивание фрагмента (примерно 350 нуклеотидов) 5'-нетранслируемого района (5'-НТР) генома исследуемых и референсных штаммов РВ. Надежность внутренних узлов дерева оценивали с помощью бутстреп-анализа путем построения 500 альтернативных деревьев. В качестве референсных использовали штаммы РВ (источник – «NCBI», GenBank), имеющие наибольшее сходство с исследуемыми штаммами по результатам BLAST-анализа секвенированных последовательностей. В число использованных последовательностей вошли 8 РВ-С (коды GenBank JQ245968.1, EF077280.1, JX129428.1, JQ245963.1, AB683912.1, HM581808.1, AB683913.1, HM581888.1), 6 РВ-А (FJ445173.1, EU096084.1, JX129434.1, FJ445136.1, JQ245966.1, FJ445147.1) и 2 РВ-В (KF555347.1, FJ445169.1). Названия референсных штаммов, вид и тип (если известно) представлены на рисунке.

### Результаты и обсуждение

Для дифференциального выявления 4 видов KB (KB-229Е, KB-OC43, KB-NL63 и KB-HKU1) в исследованных образцах были использованы видоспецифические праймеры и зонды, синтезированные в соответствии с последовательностями, приведенными в статье E.R. Gaunt и соавт. [6].

Для дифференциального выявления видов РВ использовали праймеры и зонды собственного дизайна,



Филогенетический анализ участка 5'-нетранслируемой области генома РВ, выявленных в клинических образцах.

Названия РВ, выявленных в клинических образцах, подчеркнуты и включают указание вида, который установлен в ходе настоящей работы, место (Moscow) изоляции образца, его номер (от 01 до 08) и год изоляции. Для референсных последовательностей приведены полные названия штаммов РВ с указанием вида (база данных – GenBank, «NCBI»). Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на каждые 100 нуклеотидов.

направленные к 5'-концевому региону риновирусного генома. Описание праймеров и зондов, включая их видовую специфичность, приведено в табл. 1. Видоспецифические праймеры были направлены на участки вирусного генома, консервативные для представителей одного вида, но имеющие максимальное расхождение по нуклеотидной последовательности между разными видами.

Для выявления РВ-А и РВ-В кДНК получали с помощью панриновирусного праймера для ОТ (pPrt). Для получения кДНК с последующим ПЦР-анализом для выявления РВ-С использовали отдельный, «вынесенный» праймер для ОТ – PrtC. Всего было сформировано 4 реакционных смеси РВ для моноспецифической ПЦР-РВ. Первая реакционная смесь содержала панриновирусные праймеры для одновременного выявления РВ А, В и С, вторая – для выявления РВ-А, третья – РВ-В, четвертая – РВ-С.

На препаратах РНК, выделенной из лабораторных штаммов РВ-А (серотипы 2, 14, 15, 20, 59) и РВ-В (серотипы 14, 17, 70, 72, 86), была оценена аналитическая специфичность выявления РВ разных видов, а также определены оптимальные концентрации компонентов реакционных смесей и подобрана оптимальная схема

температурно-временного режима амплификации (см. «Материалы и методы»). Праймеры (и соответствующие реакционные смеси) для выявления видов РВ не показали абсолютной видовой специфичности – при анализе одного образца часто наблюдался рост флюоресцентного сигнала в 2 или 3 реакционных смесях, несмотря на жесткие температурные условия отжига праймеров – 64°C. Тем не менее эмпирически была установлена разница не менее чем в 5–7 пороговых циклах между результатами анализа одного образца видоспецифическими реакционными смесями РВ-А и РВ-В, что послужило критерием для отнесения выявленного вируса к тому или иному виду РВ. Из-за отсутствия лабораторных штаммов РВ-С, который не размножается в культуре клеток, проверить аналитическую специфичность соответствующей смеси не представлялось возможным. Таким образом, на этом этапе были отработаны условия дифференциального выявления видов РВ-А и РВ-В в реакции ПЦР-РВ. В случаях отсутствия или слабого сигнала в реакционных смесях РВ-А и РВ-В и наличия сигнала в смеси РВ-С предполагали видовую принадлежность вируса к РВ-С.

Для изучения видового разнообразия РВ и КВ, циркулирующих в Московском регионе, из лабораторного банка клинических образцов, были отобраны образцы, в которых методом ПЦР-РВ была выявлена РНК РВ или КВ. Образцы со смешанной инфекцией, содержащие РНК РВ и/или КВ, также включали в исследование. Из образцов выделяли РНК и анализировали в реакции ПЦР-РВ, интегрированной с ОТ. Всего было проанализировано 63 образца, содержащие РВ и 29 образцов – КВ.

Из 29 образцов, содержащих РНК КВ, в 3 был идентифицирован КВ-229Е, в 9 – КВ-NL63, в 7 – КВ-НКУ1 и в 10 – КВ-ОС43. При анализе коронавирусной панели образцов не было получено спорных результатов – все образцы в результате ПЦР-анализа однозначно соотносены с видом. Не наблюдалось роста флюоресцентного сигнала больше чем по одному из каналов из четырех возможных.

В отношении РВ не было получено столь однозначно интерпретируемых результатов – РВ-А был выявлен в 32 образцах, РВ-В – в 4, РВ-С предположительно присутствовал в 21 образце. В 6 образцах вид РВ установить не удалось в связи с крайне малым содержанием вирусной РНК в образце (пороговый цикл при анализе панриновирусной смесью составлял  $\geq 38$  при отсутствии сигналов в каждой из трех видоспецифических смесей). Для последующего анализа были отобраны 8 (от 01 до 08) образцов, 2 из которых (04 и 03) содержали соответственно РВ-А и РВ-С, в то вре-

Последовательности праймеров и зондов для дифференциального выявления трех видов РВ

Выявляемые виды РВ	Название праймера или зонда	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	Координаты**
РВ-А, РВ-В и РВ-С	pPf1 – прямой	TGCGTGGCTGCCTGC	425–439 <sup>1</sup>
	pPf2 – прямой	TGCGTGGCGGCCARC	425–439 <sup>1</sup>
	pPf3 – прямой	CCTGCGTGGCTGCCT	423–437 <sup>2</sup>
	pPf4 – прямой	AGCCYGCCTGGTGC	421–434 <sup>3</sup>
	pPr – обратный	AACACGGACACCCAAAGTAGT	609–629 <sup>1</sup>
	pPrт – для ОТ	CGGACACCCAAAGT	612–625 <sup>1</sup>
	pPz – зонд	ROX-TTAGCCRCATTCAGGGGCCG-BHQ2	517–536 <sup>1</sup>
РВ-А*	PfA – прямой	AGTAGACCTGGCAGATGAGG	369–390 <sup>2</sup>
РВ-В*	PfB – прямой	AGTYTGGTCGATGAGGCT	37–392 <sup>4</sup>
РВ-С	PfC – прямой	CCCTGAATGCGGCTAA	525–536 <sup>3</sup>
	Pr1C – обратный	GCTTCAACAGTTGGTGACAT	912–931 <sup>5</sup>
	Pr2C – обратный	GCTTCAATTGAAGGGGACAT	912–931 <sup>3</sup>
	Pr3C – обратный	GCCTCAATTGAGGGAGACAT	912–931 <sup>6</sup>
	Pr4C – обратный	CAAGCCTCTATACTTGGACTCAT	912–934 <sup>7</sup>
	PzC – зонд	ROX-CACGGACACCCAAAGTAGTYGGT-BHQ2	605–627 <sup>3</sup>
	PrтC – для ОТ	GTAATTTGYTTAAGCCTATC	945–964 <sup>5</sup>

\* – В качестве праймеров для ОТ, обратных праймеров и зондов в смесях для выявления РВ-А и РВ-В применяли олигонуклеотиды pPrт, pPr и pPz соответственно, а прямые праймеры PfA и PfB являлись видоспецифическими;  
 \*\* координаты приведены в соответствии со следующими последовательностями из базы GenBank: <sup>1</sup> – DQ473495, <sup>2</sup> – FJ445146, <sup>3</sup> – EF582387, <sup>4</sup> – FJ445161, <sup>5</sup> – EF582385, <sup>6</sup> – GQ323774, <sup>7</sup> – EU840952.

мя как видовая принадлежность вируса в остальных 6 образцах оставалась не установленной; 5 из них содержали предположительно РВ-С, а в одном из образцов вирус не был отнесен ни к одному из видов.

Для однозначного установления вида РВ в этих образцах было проведено секвенирование участка 5'-НТР генома вируса. С использованием универсальных праймеров были получены ПЦР-продукты размером 424 пар нуклеотидов (п.н.) (координаты 214–637 относительно последовательности GenBank DQ473495), захватывающие более половины 5'-НТР риновирусного генома. Секвенирование и последующий филогенетический анализ (см. рисунок) выявили высокую степень сходства и надежную кластеризацию (поддержка внутренних ветвей дерева в 96–100% пермутаций) между всеми исследуемыми вирусами и референсными штаммами, что позволило уверенно определить видовую принадлежность исследуемых вирусов (см. рисунок). В результате этого анализа было выявлено два расхождения видоопределения, полученного с помощью ПЦР: 2 образца, предположительно отнесенные по данным ПЦР к РВ-С, оказались РВ-А (образцы 06 и 07). Неидентифицированный в ПЦР образец по результатам секвенирования содержал РВ-В (образец 08). Для всех остальных образцов вид вируса подтвердился. Последовательности фрагментов геномов 8 изолятов РВ, определенные в настоящей работе, депонированы в базе данных GenBank под номерами KJ490930–KJ490937.

Филогенетический анализ участка 5'-нетранслируемой области генома РВ, выявленных в клинических образцах.

Названия РВ, выявленных в клинических образцах, подчеркнуты и включают указание вида, который установлен в ходе настоящей работы, место (Moscow) изоляции образца, его номер (от 01 до 08) и год изо-

ляции. Для референсных последовательностей приведены полные названия штаммов РВ с указанием вида (база данных – GenBank, «NCBI»). Масштаб показывает эволюционное расстояние, соответствующее 5 заменам на каждые 100 нуклеотидов.

В целом, как уже отмечалось, примененный нами подход к определению вида РВ в реакциях ОТ и ПЦР-РВ не показал абсолютной специфичности. Получена высокая доля сложно интерпретируемых результатов, особенно в случаях, когда предполагалось наличие РВ-С. Поэтому был предложен следующий общий подход к определению вида РВ в клинических образцах: на первом этапе образцы анализируют в ПЦР-РВ с видоспецифическими праймерами, а в случае спорного результата на втором этапе проводят частичное секвенирование 5'-НТР генома РВ с последующим филогенетическим анализом. Таким образом, задача заменить общепринятый подход к определению вида РВ методом секвенирования на менее трудоемкий и более производительный метод ПЦР-РВ решена в нашей работе лишь частично.

Подход к дифференциальному выявлению РВ, основанный на секвенировании и филогенетическом анализе фрагмента 5'-НТР генома РВ размером 260 или 310 п.н., предлагают также W.M. Lee и соавт. [14] и D. Kiang и соавт. [15]. В указанных работах обоснована возможность даже более тонкой генетической характеристики – определения типа РВ-А и РВ-В и выделения отдельной ветви РВ-С. По данным D. Kiang и соавт., РВ имеют значительно меньшую частоту рекомбинаций в 5'-НТР генома, чем энтеровирусы, а результаты генотипирования на основании 5'-НТР генома в высокой степени коррелируют с данными общепринятого VP4-VP2-анализа [16]. Так, результаты идентификации генотипа 71 клинического изолята РВ путем анализа 5'-НТР и VP4-VP2 совпали на 99% [15]. Однако эти исследования

Таблица 2

## Распределение видов риновирусов среди амбулаторных и стационарных пациентов

Категория пациентов	Число случаев риновирусной моноинфекции (в том числе у детей в возрасте от 4 мес до 3 лет)				
	РВ-А	РВ-В	предположительно РВ-С	вид не определен	Всего
Стационарные	6 (3)	1 (0)	7 (7)	2 (1)	16 (11)
Амбулаторные	22 (16)	3 (2)	7(2)	4 (3)	36 (23)
Итого...	28 (19)	4 (2)	14 (9)	6 (4)	52 (34)

Таблица 3

## Распределение видов коронавируса среди амбулаторных и стационарных пациентов

Категория пациентов	Число случаев коронавирусной моноинфекции				
	КВ-229Е	КВ-NL63	КВ-НКУ1	КВ-ОС43	Всего
Стационарные	0	7	0	6	13
Амбулаторные	3	0	6	3	12
Итого...	3	7	6	9	25

не включали РВ-С и нуждаются в подтверждении с использованием расширенной выборки.

Далее была проведена клиническая оценка роли разных видов РВ и КВ в этиологии ОРВИ различной степени тяжести. Показателем тяжелой формы заболевания служил факт госпитализации больного (стационарные пациенты), тогда как на дому проходили лечение преимущественно пациенты с легкой или среднетяжелой формой (амбулаторные пациенты). Из общего числа образцов были выделены случаи смешанной инфекции, в том числе 4 случая сочетания КВ с другим респираторным вирусом и 11 подобных случаев с РВ. Отмечены сочетания РВ и КВ как друг с другом, так и с другими респираторными вирусами – бокавирусами, вирусом гриппа А, аденовирусами, вирусами парагриппа 1-го и 3-го типа. Интересно отметить, что в подавляющем большинстве случаев (14 из 15) микст-инфекция была выявлена у пациентов, проходивших лечение в стационаре, что скорее всего свидетельствует о внутрибольничном заражении одним из вирусов. В случаях выявления РВ и КВ в составе смешанной инфекции роль этих вирусов в этиологии заболеваний представляется менее определенной, чем в случаях моноинфекции, поскольку невозможно определить, какой из выявленных вирусов вызвал первичную инфекцию и какой из них сыграл решающую роль в патогенезе заболевания. Поэтому в этом разделе работ учитывались только случаи моноинфекции, т. е. образцы, в которых выявлен только 1 вид РНК – РВ или КВ.

Всего выявлено 77 случаев ОРВИ, сопровождавшихся риновирусной ( $n = 52$ ) или коронавирусной ( $n = 25$ ) моноинфекцией, из которых на РВ-инфекцию приходилось 16 случаев госпитализации (31%), а на КВ-инфекцию – 13 (52%). Распределение видов РВ и КВ в образцах от групп амбулаторных и стационарных пациентов с разделением на взрослых и детей представлено в табл. 2 и 3.

Было установлено, что на территории РФ циркулируют все известные виды РВ человека – РВ-А, РВ-В и РВ-С. В общей структуре РВ, циркулировавших на

территории Московского региона в период с 2007 по 2012 г., преобладал РВ-А (54% от всех исследованных образцов), доля случаев, ассоциированных предположительно с РВ-С, составила 30%, а РВ-В – 6%. Показано, что большая доля госпитализированных пациентов с РВ-инфекцией была выявлена в группе детей с РВ-С-инфекцией (из 9 детей с РВ-С 7 проходили лечение в стационаре). Следует отметить, что все госпитализированные больные, у которых был идентифицирован РВ-С, являлись детьми в возрасте от 4 мес до 3 лет.

Установлено, что на территории РФ циркулируют 4 вида КВ – КВ-NL63, КВ-229Е, КВ-ОС43 и КВ-НКУ1. Все случаи тяжелого течения КВ-инфекции, потребовавшие госпитализации больного, связаны с инфицированием детей (1–5 лет) КВ-NL63 и КВ-ОС43. Все пациенты, лечившиеся амбулаторно, были взрослыми (старше 16 лет); у них были выявлены КВ-НКУ1, КВ-ОС43 и КВ-229Е. При этом следует отметить, что 3 амбулаторных пациента, у которых был выявлен КВ-ОС43, являлись волонтерами из числа сотрудников НИИВС им И.И. Мечникова и, по данным анамнеза, перенесли заболевание достаточно тяжело.

Полученные нами результаты были сопоставлены с опубликованными данными по проблеме. В работе J.E. Linder и соавт. показано, что РВ-С ассоциированы с возникновением более тяжелых заболеваний дыхательной системы по сравнению с РВ видов А и В [17]. Кроме того, предполагается, что РВ-С вызывают более серьезные приступы бронхиальной астмы у детей, зачастую требующие лечения в условиях стационара, по сравнению с другими видами РВ и другими респираторными вирусами [18]. Различия в патогенности и тропности к разным отделам респираторного тракта наблюдают и у различных видов КВ. Так, КВ-NL63, по данным S. Abdul-Rasool и В.С. Filding, чаще, чем другие виды КВ, приводит к развитию крупа у детей [19]. E.R. Gaunt и соавт. показали, что среди пациентов с моноинфекцией КВ-NL63 и КВ-ОС43, так и с коинфекцией с другим респираторным вирусом значительно преобладали случаи, сопровождавшиеся поражением нижних отделов дыхательных путей [6]. Высокая доля (70%) случаев коронавирусной инфекции у детей (как моно- так и смешанной) с поражением нижних отделов респираторного тракта и госпитализацией также отмечена в работе M. Jevšnik и соавт. [20]. Полученные нами результаты не противоречат приведенным выше данным, но ввиду небольшого размера выборки не позволяют делать серьезные выводы о различиях в патогенности различных видов РВ и КВ.

## Выводы

1. Установлено, что на территории Московского региона в период с 2007 по 2012 г. циркулировали все виды РВ (РВ-А, РВ-В и РВ-С) и КВ (КВ-NL63, КВ-229Е, КВ-ОС43 и КВ-НКУ1).

2. Определена последовательность участка 5'-НТР генома у РВ из 8 образцов.

3. Отдельные виды РВ и КВ с высокой частотой обнаруживали у детей с тяжелыми респираторными заболеваниями. У 78% детей с РВ-С-инфекцией наблюдалось тяжелое течение заболевания, потребовавшего госпитализации, а в группе детей, у которых выявили КВ-ОС43 и КВ-NL63, лечение в стационаре проходили все 100%.

Авторы выражают глубокую благодарность сотрудникам ФГБУ «НИИВС им. И.И. Мечникова» РАМН А.А. Никоновой и А.С. Оксаничу за помощь в выполнении работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Turner R.B. The common cold. In: Mandell G., Bennett J., Dolin R., eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*: Volume 1. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2010: 809–14.
- Available at: <http://www.niaid.nih.gov/topics/commonCold/Pages/cause.aspx>.
- García-García M.L., Calvo C., Pozo F., Villadangos P.A., Pérez-Breña P., Casas I. Spectrum of respiratory viruses in children with community-acquired pneumonia. *Pediatr. Infect. Dis J.* 2012; 31(8): 808–13.
- Fielding B.C. Human coronavirus NL63: a clinically important virus? *Future Microbiol.* 2011; 6(2): 153–9.
- Lee W.M., Lemanske R.F.Jr., Evans M.D., Vang F., Pappas T., Gangnon R. et al. Human rhinovirus species and season of infection determine illness severity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 186(9): 886–91.
- Gaunt E.R., Hardie A., Claas E.C., Simmonds P., Templeton K.E. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63 and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(8): 2940–7.
- Available at: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
- de Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S., Brown C.S., Drosten C., Enjuanes L. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J. Virol.* 2013; 87(14): 7790–2.
- Eckerle I., Müller M.A., Kallies S., Gotthardt D.N., Drosten C. In vitro renal epithelial cell infection reveals a viral kidney tropism as a potential mechanism for acute renal failure during Middle East Respiratory Syndrome (MERS) Coronavirus infection. *Virol. J.* 2013; 10: 359.
- World Health Organization. Global alert and response. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) – update. 27 December 2013. Available at: [www.who.int/csr/don/2013\\_12\\_27/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2013_12_27/en/index.html) (accessed 9 January 2014).
- Лободанов С.А. Эффективность этиологической диагностики ОРВИ методом ПЦР с детекцией в режиме реального времени. Дисс. ... канд. биол. наук. М.; 2013.
- Файзулов Е.Б., Лободанов С.А., Никонина А.А., Каира А.Н., Полухина Г.М., Трушакова С.В. и др. Дифференциальная диагностика ОРВИ методом мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2012; 1: 12–8.
- Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim van Dillen P.M., van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(3): 495–503.
- Lee W.M., Kiesner C, Pappas T, Lee I, Grindle K, Jartti T. et al. A diverse group of previously unrecognized human rhinoviruses are common causes of respiratory illnesses in infants. *PLoS One.* 2007; 2(10): e966.
- Kiang D., Kalra I, Yagi S., Louie J.K., Boushey H., Boothby J. et al. Assay for 5'-noncoding region analysis of all human rhinovirus prototype strains. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(11): 3736–45.
- Savolainen C., Blomqvist S., Mulders M.N., Hovi T. Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. *J. Gen. Virol.* 2002; 83(Pt 2): 333–40.
- Linder J.E., Kraft D.C., Mohamed Y., Lu Z., Heil L., Tollefson S. et al. Human rhinovirus C: Age, season, and lower respiratory illness over the past 3 decades. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013; 131(1): 69–77.
- Bizzintino J., Lee W.M., Laing I.A., Vang F., Pappas T., Zhang G. et al. Association between human rhinovirus C and severity of acute asthma in children. *Eur. Respir. J.* 2011; 37(5): 1037–42.
- Abdul-Rasool S., Fielding B.C. Understanding human coronavirus HCoV-NL63. *Open Virol. J.* 2010; 4: 76–84.
- Jevšnik M, Uršič T, Zigon N, Lusa L, Krivec U, Petrovec M. Coronavirus infections in hospitalized pediatric patients with acute respiratory tract disease. *BMC Infect. Dis.* 2012; 12: 365.

#### REFERENCES

- Turner R.B. The common cold. In: Mandell G., Bennett J., Dolin R., eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*: Volume 1. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2010: 809–14.
- Available at: <http://www.niaid.nih.gov/topics/commonCold/Pages/cause.aspx>.
- García-García M.L., Calvo C., Pozo F., Villadangos P.A., Pérez-Breña P., Casas I. Spectrum of respiratory viruses in children with community-acquired pneumonia. *Pediatr. Infect. Dis J.* 2012; 31(8): 808–13.
- Fielding B.C. Human coronavirus NL63: a clinically important virus? *Future Microbiol.* 2011; 6(2): 153–9.
- Lee W.M., Lemanske R.F.Jr., Evans M.D., Vang F., Pappas T., Gangnon R. et al. Human rhinovirus species and season of infection determine illness severity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2012; 186(9): 886–91.
- Gaunt E.R., Hardie A., Claas E.C., Simmonds P., Templeton K.E. Epidemiology and clinical presentations of the four human coronaviruses 229E, HKU1, NL63 and OC43 detected over 3 years using a novel multiplex real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(8): 2940–7.
- Available at: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>.
- de Groot R.J., Baker S.C., Baric R.S., Brown C.S., Drosten C., Enjuanes L. et al. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *J. Virol.* 2013; 87(14): 7790–2.
- Eckerle I., Müller M.A., Kallies S., Gotthardt D.N., Drosten C. In vitro renal epithelial cell infection reveals a viral kidney tropism as a potential mechanism for acute renal failure during Middle East Respiratory Syndrome (MERS) Coronavirus infection. *Virol. J.* 2013; 10: 359.
- World Health Organization. Global alert and response. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) – update. 27 December 2013. Available at: [www.who.int/csr/don/2013\\_12\\_27/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2013_12_27/en/index.html) (accessed 9 January 2014).
- Lobodanov S.A. Efficacy etiologic diagnosis ARI detection by PCR real-time: Diss. Moscow; 2013. (in Russian)
- Faizuloev E.B., Lobodanov S.A., Nikonova A.A., Kaira A.N., Poluhina G.M., Trushakova S.V. et al. Differential diagnosis of respiratory viral infections by multiplex real-time PCR. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika.* 2012; 1: 12–8. (in Russian)
- Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim van Dillen P.M., van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* 1990; 28(3): 495–503.
- Lee W.M., Kiesner C, Pappas T, Lee I, Grindle K, Jartti T. et al. A diverse group of previously unrecognized human rhinoviruses are common causes of respiratory illnesses in infants. *PLoS One.* 2007; 2(10): e966.
- Kiang D., Kalra I, Yagi S., Louie J.K., Boushey H., Boothby J. et al. Assay for 5'-noncoding region analysis of all human rhinovirus prototype strains. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46(11): 3736–45.
- Savolainen C., Blomqvist S., Mulders M.N., Hovi T. Genetic clustering of all 102 human rhinovirus prototype strains: serotype 87 is close to human enterovirus 70. *J. Gen. Virol.* 2002; 83(Pt 2): 333–40.
- Linder J.E., Kraft D.C., Mohamed Y., Lu Z., Heil L., Tollefson S. et al. Human rhinovirus C: Age, season, and lower respiratory illness over the past 3 decades. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013; 131(1): 69–77.
- Bizzintino J., Lee W.M., Laing I.A., Vang F., Pappas T., Zhang G. et al. Association between human rhinovirus C and severity of acute asthma in children. *Eur. Respir. J.* 2011; 37(5): 1037–42.
- Abdul-Rasool S., Fielding B.C. Understanding human coronavirus HCoV-NL63. *Open Virol. J.* 2010; 4: 76–84.
- Jevšnik M, Uršič T, Zigon N, Lusa L, Krivec U, Petrovec M. Coronavirus infections in hospitalized pediatric patients with acute respiratory tract disease. *BMC Infect. Dis.* 2012; 12: 365.

Получена 11.03.14

Грибкова Н.В., Сивец Н.В., Шмелева Н.П., Чешенюк Е.В., Лано Т.П., Аношко О.Н.

## Этиология ОРВИ среди госпитализированных детей в Республике Беларусь в 2011 и 2012 гг.

ГУ «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» Минздрава РБ, 220114, г. Минск

Представлены данные о сезонном выявлении респираторных вирусов на протяжении 2011–2012 гг. С помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) определена этиологическая структура острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) среди госпитализированных детей в возрасте от 0 до 17 лет. Этиологическими агентами инфекции были не только вирусы гриппа А и В, парагриппа (ВПГ) типов 1–4, аденовирусы (АДВ) и респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), но и недавно описанные бока- и метапневмовирусы (БоВ и МПВ). Наиболее полный спектр респираторных вирусов выявляли в образцах, полученных от детей от 0 до 4 лет.

Ключевые слова: ОРВИ; вирусы гриппа; вирусы парагриппа; аденовирусы; респираторно-синцитиальный вирус; риновирусы; корона-, бока- и метапневмовирусы; ПЦР; сезонность.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60 (3): 37–40.

Gribkova N.V., Sivets N.V., Shmaliyova N.P., Cheshenok T.V., Lapo E.P., Anoshka O.N.

### The ARI etiology among children in Belarus in 2011-2012

Republican Research-and-Practical Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of Republic of Belarus, 220114, Minsk, Belarus

The seasonal distribution of the respiratory viruses for the period of 2011-2012 is presented. The ARI etiological structure among children 0-17 years, who were admitted to the hospital for respiratory disease in Belarus, was defined by the PCR-method. It was found that the etiological agents of the infections were not only influenza viruses A and B, parainfluenza types 1-4, adeno- and respiratory syncytial viruses, but also described bocavirus and metapneumoviruses. The most complete spectrum of the respiratory viruses was detected among children aged 0-4 years.

Key words: ARI; influenza viruses; parainfluenza; adenovirus; respiratory syncytial virus; rhinovirus; human coronaviruses; bocaviruses; metapneumoviruses; PCR; seasonality.

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(3): 37–40. (In Russ.)

For correspondence: Nataliya Gribkova, MD, PhD; e-mail: gribkova@belriem.by

Received 04.10.13

### Введение

В инфекционной патологии довольно высок удельный вес острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ), которые ежегодно являются причиной 3–5 млн случаев смерти в мире. Наиболее часто среди этиологических агентов – возбудителей ОРВИ упоминаются вирусы гриппа А и В, аденовирусы (АДВ), респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), вирусы парагриппа (ВПГ) [1]. В последние годы спектр возбудителей вирусных респираторных инфекций пополнился человеческими корона-, бока- и метапневмовирусами (КоВ, БоВ, МПВ), что связано с расширением возможностей лабораторной диагностики [2–5]. Бесспорным лидером среди респираторных вирусов являются вирусы гриппа, причиняющие большой социальный ущерб во время ежегодных эпидемий. Негриппозные респираторные вирусы вызывают гриппоподобные заболевания, весьма напоминающие по клинической картине грипп, и выявить этиологический агент ОРВИ можно только с помощью лабораторной диагностики, которая является одним из основных элементов эпидемиологического надзора. Отсутствие сведений об этиологическом агенте заболевания увеличивает риск развития постинфекционных осложнений, приводит к запоздалому назначению специфической противовирусной терапии,

способствует росту вероятности внутрибольничного инфицирования и затрудняет проведение адекватных противоэпидемических мероприятий. Как было показано нами ранее, наиболее высокий уровень респираторных заболеваний в Республике Беларусь фиксируется среди пациентов возрастной категории от 0 до 17 лет [6]. В нашей стране систематические исследования по определению этиологического спектра возбудителей ОРВИ, оцениваемого с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), ранее не проводились.

Целью исследования было изучение этиологической структуры ОРВИ в Республике Беларусь среди госпитализированных детей на протяжении 2011 и 2012 гг. на основании результатов, полученных при использовании ПЦР.

### Материалы и методы

Материалом для исследования служили назофарингеальные мазки, полученные от пациентов с респираторной симптоматикой, госпитализированных в дозорные учреждения здравоохранения страны. Всего за 2011–2012 гг. исследовано 968 клинических образцов от детей в возрасте от 0 до 17 лет.

Выявление генетического материала респираторных вирусов в исследуемых образцах осуществляли в ПЦР с детекцией в режиме реального времени. В работе использовали диагностические наборы «Ам-

плиСенс Influenza virus A/B-FL» и «ОРВИ-скрин-FL» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва). Экстракцию нуклеиновых кислот проводили с применением набора «Рибо-сорб», реакцию обратной транскрипции – с набором реагентов «Реверта-L» (производство ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва). Постановку ПЦР выполняли на приборе Rotor Gene 6000 («Corbett Research», Австралия) в соответствии с рекомендациями производителя наборов.

### Результаты и обсуждение

Эпидемиологический надзор за гриппом и ОРВИ в стране осуществляется по системе дозорного надзора на протяжении всего года. Эпидемический период по гриппу и ОРВИ начинается с октября и завершается на 20-й календарной неделе последующего года. Межэпидемический период охватывает 21–39 нед. На протяжении 2011–2012 гг. были исследованы образцы, полученные от детей, госпитализированных в дозорные лечебные учреждения с клиническими диагнозами ОРВИ, ларингит, ринофарингит, бронхит и пневмония. Генетический материал респираторных вирусов был обнаружен в подавляющем большинстве исследованных образцов (69,4%), полученных от детей всех возрастных групп. Наиболее часто (73,2%) респираторные вирусы выявляли в образцах, полученных от детей младшей возрастной группы (0–4 года). Частота выявления респираторных вирусов в образцах от детей в возрасте 5–14 и 15–17 лет была сопоставима и составила 50,7 и 53,1% соответственно.

За 2 года наблюдения этот показатель в дозорных образцах варьировал, однако риновирусы (РВ) и ВПГ выявляли практически с одинаковой частотой неза-

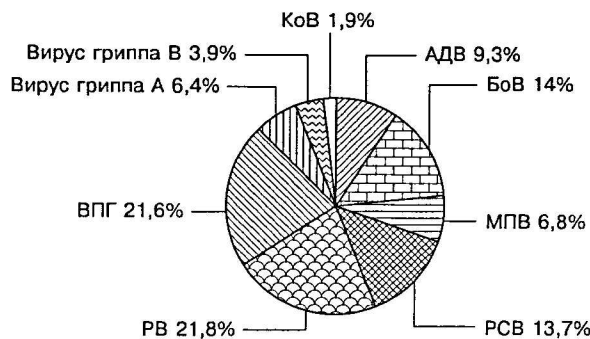


Рис. 1. Этиологическая структура ОРВИ у госпитализированных детей в возрасте от 0 до 17 лет.

висимо от года наблюдения. Усредненные результаты двухлетнего изучения этиологической структуры ОРВИ у госпитализированных детей приведены на рис. 1. Как видно из представленных данных, в общей структуре возбудителей ОРВИ преобладали негриппозные вирусы. Чаще других госпитализация требовалась пациентам с респираторной инфекцией, ассоциированной с РВ и ВПГ типов 1–4. От 6,3 до 14% случаев ОРВИ было обусловлено БоВ, РСВ, АДВ и МПВ. КоВ в исследуемых образцах обнаруживали лишь спорадически.

Спектр выявляемых респираторных вирусов в клинических образцах варьировал в зависимости от возраста пациентов (рис. 2). Так, на протяжении всего периода наблюдения для детей от 0 до 4 лет был характерен наиболее полный спектр определяемых

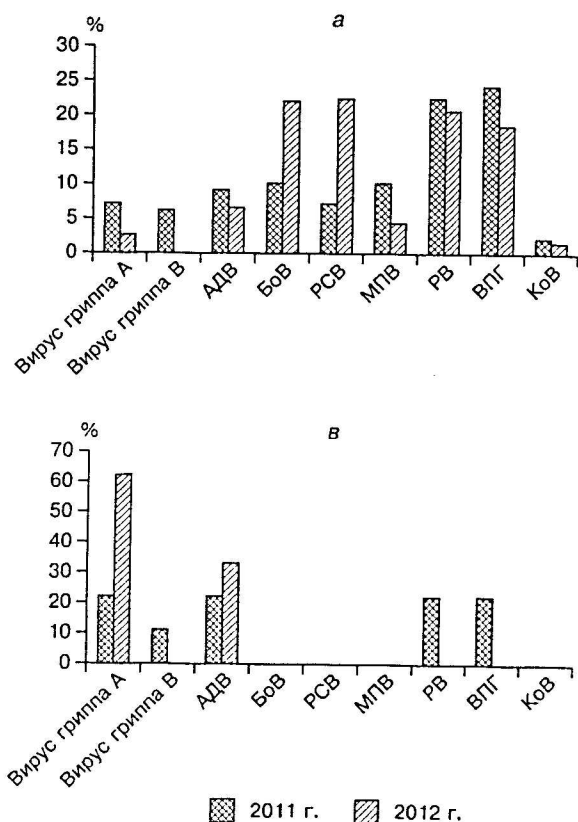


Рис. 2. Этиологическая структура ОРВИ в возрастных группах 0–4 года (а), 5–14 лет (б), 15–17 лет (в). Здесь и на рис. 3 по оси ординат – процент положительных образцов.

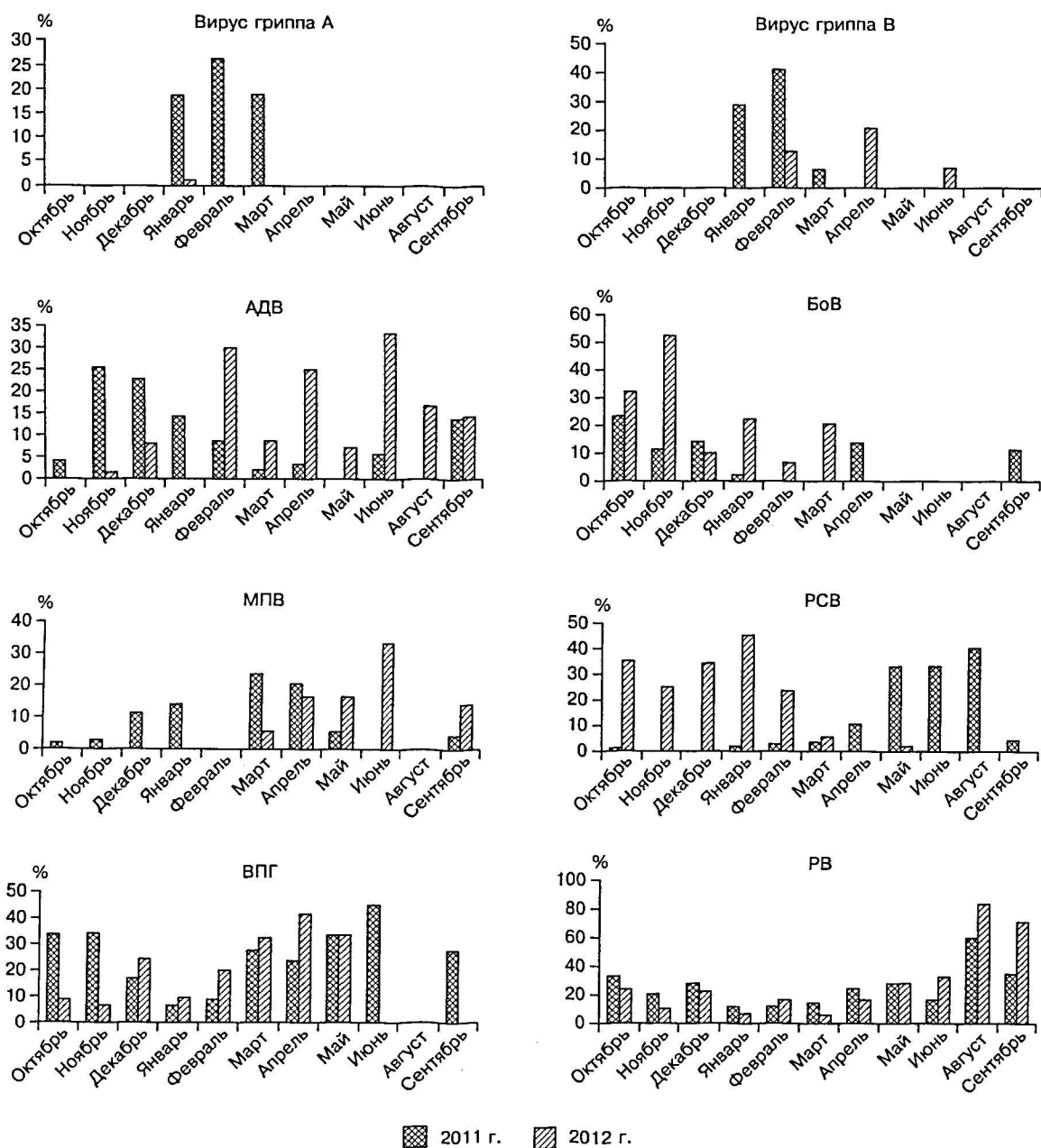


Рис. 3. Сезонная циркуляция респираторных вирусов.

респираторных вирусов с доминированием РВ, КоВ, РСВ и ВПГ, в то время как в группе 5–14 лет преобладали РВ и ВПГ типов 1–4. За 2 года в образцах этой возрастной группы БоВ и КоВ не были выявлены. В образцах, полученных от детей старшей возрастной группы (15–17 лет), на протяжении 2 лет не удалось выявить генетический материал БоВ, РСВ, МПВ и КоВ. Вирусы гриппа В, РВ и ВПГ в этой группе были выявлены лишь в 2011 г., а АДВ ежегодно присутствовали в клинических образцах. Частота выявления вирусов гриппа А и В в этой возрастной группе была выше, чем в первых двух.

Анализ сезонной циркуляции респираторных вирусов выявил постоянный вклад РВ и ВПГ в респираторную заболеваемость независимо от месяца и года наблюдения (рис. 3).

Как видно на рис. 3, АДВ и РСВ у госпитализированных детей выявляли как в осенние, так и в весенние месяцы. Недавно описанные респираторные вирусы (БоВ и МПВ) обнаруживали в клинических образцах во время эпидемического сезона по гриппу. Большинство положительных образцов, содержащих ДНК БоВ, определяли в октябре–ноябре. МПВ чаще выявляли в клиническом материале, полученном в зимние и весенние месяцы. Клиническая симптоматика заболеваний, обусловленных этими вирусами, соответствовала клиническим диагнозам обструктивного бронхита, ларинготрахеита, ринофарингита, пневмонии. Заболевания различались по степени тяжести, а некоторые пациенты нуждались в госпитализации в отделения интенсивной терапии.

Вирусы гриппа А доминировали в сезон 2010/11



года (см. рис. 3), а в 2012 г. лишь в апреле отмечен незначительный рост частоты выявления в дозорных образцах этих вирусов, который не сопровождался эпидемическим ростом заболеваемости. В этот же период активно циркулировали АДВ и ВПГ. Вирусы гриппа типа В не были выявлены в образцах сезона 2012 г. (см. рис. 3). В период активной циркуляции вирусов гриппа А и В наблюдали снижение удельного веса других респираторных вирусов в этиологической структуре ОРВИ.

Для обнаружения вирусных респираторных антигенов ранее широко использовали метод иммунофлюоресценции, который в силу ряда причин не всегда позволял составить реальное представление об этиологическом спектре возбудителей респираторных инфекций. По результатам иммунофлюоресцентного анализа, помимо вирусов гриппа А и В, в исследуемых образцах выявляли АДВ, ВПГ и РСВ. Использование ПЦР в лабораторной диагностике при мониторинговых исследованиях позволило расширить этиологический спектр определяемых респираторных вирусов и дополнительно к выявляемым ранее респираторным вирусам выявить циркуляцию в стране недавно описанных респираторных вирусов – БоВ и МПВ [2, 4, 6]. Обнаруженные методом ПЦР респираторные вирусы вызывают весьма похожие по клинической симптоматике острые инфекции верхних и нижних отделов дыхательного тракта различной степени тяжести, требующие госпитализации пациентов в возрасте от 0 до 17 лет. Смешанные инфекции, вызванные коинфицированием новыми респираторными вирусами, ассоциируются с увеличением тяжести заболевания [3]. Частота выявления БоВ при смешанных инфекциях, по разным данным, достигает 10% и более [2]. Однако в настоящее время патогенез инфекций БоВ и МПВ изучен недостаточно, и оценка воздействия этих вирусов на течение смешанной респираторной инфекции проблематична. На основании результатов 2-летнего наблюдения трудно сделать выводы о вкладе в респираторную заболеваемость детей человеческих БоВ и МПВ, оценить особенности клинического течения вызванных ими заболеваний, а также определить особенности сезонной циркуляции этих вирусов на территории страны. Эти вопросы требуют дальнейшего изучения. Возможность выявления методом ПЦР РВ в клинических образцах также позволит уточнить вклад данного патогена в респираторную заболеваемость детей, нуждающихся в госпитализации, особенно в период, предшествующий эпидемическому сезону гриппа.

#### Заключение

Проведенные исследования этиологической структуры ОРВИ с помощью ПЦР позволили расширить спектр определяемых вирусов. Показано, что недавно описанные БоВ и МПВ вызывают у детей инфекции верхних и нижних отделов дыхательных путей, часто требующие госпитализации. В зависимости от принадлежности к той или иной возрастной группе среди госпитализированных детей от 0 до 17 лет с

респираторными вирусами ассоциированы 50–73,2% случаев ОРВИ. Наиболее часто этиологическим агентом инфекции у детей младшей возрастной группы в неэпидемический по гриппу период являются РВ, ВПГ, РСВ и недавно описанные респираторные БоВ. Внедрение ПЦР в мониторинговые исследования гриппа и ОРВИ будет способствовать расшифровке этиологии инфекции, снижению необоснованного применения антибиотиков и эффективному использованию средств этиотропной терапии в отношении тех агентов, для которых она имеется, а также предупреждению внутрибольничного инфицирования.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Mahony J.B. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008; 21 (4): 716–47.
2. Allander T., Jartti T., Gupta S., Niesters H.G., Lehtinen P., Osterback R. et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 44: 904–10.
3. Шмелева Н.П., Сивец Н.В., Сергиенко Е.Н., Грибкова Н.В., Германенко И.Г. Изучение спектра возбудителей ОРВИ у госпитализированных детей с применением Real-Time PCR. «Молекулярная диагностика-2010». Сб. трудов VII всероссийской научно-практической конференции с международным участием. М.; 2010; Том IV: 223–5.
4. Яцишина С.Б., Коновалов А.В., Магкоева З.Г., Прадед М.Н., Шелковская Л.П., Перевозчикова Л.А. и др. Лабораторная диагностика в оценке заболеваемости острыми респираторными вирусными инфекциями в эпидемическом сезоне 2010–2011 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2013; 1: 34–8.
5. Schildgen O. Human Bocavirus: Passenger or Pathogen in Acute Respiratory Tract Infections? *J. Clin. Microbiol.* 2008; 21: 291–304.
6. Сергиенко Е.Н., Германенко И.Г., Грибкова Н.В., Шмелева Н.П. Грипп и респираторно-синцитиальная инфекция у детей в эпидемический сезон 2009–2010 гг. в Республике Беларусь. *Медицинская панорама.* 2011; 2 (119): 3–7.
7. Kahn J.S. Epidemiology of Human Metapneumovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19 (3): 546–57.

#### REFERENCES

1. Mahony J.B. Detection of respiratory viruses by molecular methods. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008; 21 (4): 716–47.
2. Allander T., Jartti T., Gupta S., Niesters H.G., Lehtinen P., Osterback R. et al. Human bocavirus and acute wheezing in children. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 44: 904–10.
3. Shmeleva N.P., Sivets N.V., Sergienko E.N., Gribkova N.V., Germanenko I.G. Study of SARS spectrum pathogens in hospitalized children using Real-Time PCR In «Molek. Diagnostics 2010». Proceedings of the VII All-Russian scientific and practical conference with international participation. Moscow [«Molekulyarnaya diagnostika-2010». Sb. trudov VII vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem. Moscow], 2010; Vol. IV: 223–5. (in Russian)
4. Jacishina S.B., Konovalov A.V., Magkoeva Z.G. et al. Laboratory diagnosis in the evaluation of acute respiratory viral infections in the 2010–2011 epidemic season. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunologii.* 2013; 1: 34–8. (in Russian)
5. Schildgen O. Human Bocavirus: Passenger or Pathogen in Acute Respiratory Tract Infections? *J. Clin. Microbiol.* 2008; 21: 291–304.
6. Sergienko E.N., Germanenko I.G., Gribkova N.V., Shmeleva N.P. Influenza and respiratory syncytial virus infection in children during the epidemic season 2009 and 2010 in the Republic of Belarus. *Meditsinskaya panorama.* 2011; 2 (119): 3–7. (in Russian)
7. Kahn J.S. Epidemiology of Human Metapneumovirus. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19 (3): 546–57.

Поступила 04.10.13

Рыжов К.А.<sup>1</sup>, Носик М.Н.<sup>1</sup>, Кравченко А.В.<sup>2</sup>

## Изменчивость регуляторных генов ВИЧ-1, выявляемых с помощью полимеразной цепной реакции

<sup>1</sup>ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва; <sup>2</sup>ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва

Исследовано 200 образцов от ВИЧ-инфицированных лиц: 50 образцов из Республики Саха (Якутия), 50 образцов из Вологодской области (Череповец) и 100 образцов из Московского региона (Москва и Московская область). Все образцы были получены от больных, не проходивших антиретровирусную терапию. В ходе исследования обнаружено, что в результате одностадийной амплификации регуляторные гены *vif*, *vpr*, *vpr*, *rev*, *tat* и *nef* амплифицируются с малой чувствительностью. При проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) тех же образцов с использованием «гнездовой» ПЦР частота выявления этих генов значительно возросла. При изучении гена *nef* было установлено, что в поздних (3 и 4) стадиях инфекции в ядрах клеток наблюдается феномен сплайсинга, который отсутствует в ранних стадиях инфекции. Этот эффект может являться причиной перехода бессимптомной стадии ВИЧ-инфекции в манифестирующую. Впервые было показано, что изменчивость регуляторных генов зависит от субтипа вируса.

Ключевые слова: ВИЧ; регуляторные гены ВИЧ; «гнездовая» полимеразная цепная реакция; стадия ВИЧ-инфекции.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(3): 41–44.

Ryzhov K. A.<sup>1</sup>, Nosik M. N.<sup>1</sup>, Kravtchenko A. V.<sup>2</sup>

### A study of the HIV-1 regulatory genes using the polymerase chain reaction

<sup>1</sup>Federal State Budgetary Institution «I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera», 105064, Moscow, Russia; <sup>2</sup>Federal Budget Institution of Science «Central Research Institute of Epidemiology» of the Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance, 111123, Moscow, Russia

In this work, a total of 200 samples from the HIV-infected individuals were analyzed: 50 samples from the Saha Republic (Yakutia), 50 samples from the Vologda Region (City of Cherepovets), and 100 samples from the Moscow Region (Moscow and Moscow Region). All samples were obtained from the patients who were not undergoing antiretroviral therapy. It was detected that the regulatory genes *vif*, *vpr*, *vpr*, *rev*, *tat*, and *nef* were amplified with moderate sensitivity after one-stage amplification. When those samples were analyzed by the nested PCR the detection ratio was much higher. While studying *nef*-gene the phenomena of the splicing in cells cores was detected at the advanced stages of the HIV-infection (3 and 4 stages). At the same time, the splicing was not detected at the earlier stages of the HIV-infection. This effect might be the cause of the transition from asymptomatic stage of the infection to the advanced stage. It was also shown for the first time that the variability of the regulatory genes correlated with the virus subtype.

Key words: HIV; regulatory genes; PCR; nested PCR; stages of HIV-infection.

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(3): 41–44. (In Russ.)

For correspondence: Konstantin Ryzhov, senior researcher; e-mail: rkazaw@yahoo.com

Received 23.05.13

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), относящийся к семейству ретровирусов, имеет уникальное строение генома, заключающееся в наличии системы регуляторных генов *vif*, *vpr*, *tat*, *rev*, *nef*, *vpr*, которые отсутствуют у других ретровирусов. Эти гены оказывают выраженное влияние на скорость репродукции вируса и его инфекционность и играют ключевую роль в патогенезе СПИДа. Так, ген *vif* ответственен за повышение инфекционности вирусных частиц в  $10^2$ – $10^3$  раз в последних стадиях вирусного цикла [1]. Показано, что у лиц, инфицированных штаммами ВИЧ-1, у которых ген *nef* содержит дефектные аллели, развитие болезни наступает гораздо позже [2]. Нуклеотидные замены в гене *vpr* (мутация R77Q) также ведут к замедлению прогрессирования ВИЧ-инфекции [3]. Ген *tat*, ответственный за распространение вируса *in vivo* и иммуносупрессию ненфицированных клеток, связывают с такими патологиями, как саркома Капоши и ВИЧ-ассоциированная деменция, ускоряющими течение заболевания и приводящими к летальному

исходу [4]. Имеются данные о том, что при хронической инфекции белки *vpr*, *tat*, *nef* индуцируют апоптоз Т-клеток [5, 6].

В связи с вышесказанным изучение структурных особенностей регуляторных генов является важной задачей для понимания механизмов ВИЧ-инфекции, так как изменения, происходящие в этих генах, могут влиять на характер течения заболевания. Целью настоящей работы было определить, как связаны изменения в структуре регуляторных генов с биологическими свойствами вируса.

### Материалы и методы

**Выделение генетического материала.** Выделение провирусной ДНК из клеток и вирусной РНК из плазмы крови проводили с помощью коммерческих систем производства фирмы «Интерлабсервис».

**Подбор праймеров.** Наиболее распространенными молекулярно-биологическими методами изучения генов являются полимеразная цепная реакция (ПЦР) и

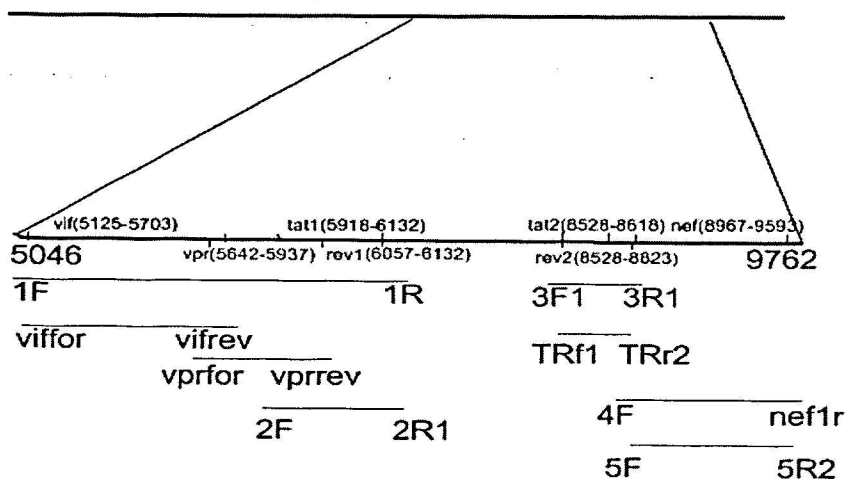


Рис. 1. Схема расположения системы праймеров для амплификации ВИЧ-1. Цифрами указаны позиции праймеров на консенсусной последовательности ВИЧ-1 субтипа А.

секвенирование. Однако при изучении регуляторных генов ВИЧ необходимо учитывать ряд факторов, сильно влияющих на чувствительность этих методов. Это высокая изменчивость ВИЧ, мозаичное строение генов *tat* и *rev*, перекрывающиеся рамки считывания и наличие высоковариабельных участков. При подборе праймеров приходится учитывать субтипы, характерные для территории, на которой проводятся исследования.

Были подобраны праймеры к каждому регуляторному гену. Поскольку фрагмент гена *rev1* находится «внутри» гена *tat1*, а фрагмент гена *tat2* «внутри» гена *rev2*, выявляли большие фрагменты, т. е. *tat1* и *rev2*.

Для повышения чувствительности выявления регуляторных генов проводили двухстадийную (nested) ПЦР. Для этого праймеры рассчитаны и синтезированы 2 пары внешних праймеров, расположенных в высококонсервативных участках генома. Данные праймеры амплифицировали фрагменты, содержащие гены *vif*, *vpr*, *tat1*, *rev1*, *vpr* и *tat2*, *rev2* и *nef* соответственно. Схема расположения праймеров на геноме ВИЧ приведена на рис. 1.

**Амплификация.** ПЦР и обратнотранскриптазную ПЦР (ОТ-ПЦР) проводили с помощью коммерческих тест-систем производства фирмы «Интерлабсервис» в соответствии с инструкцией с использованием синтезированных праймеров. В качестве положительного контроля использовали плазмиду рВН10, содержащую полноразмерный геном ВИЧ-1. В качестве отрицательного контроля использовали ДНК, выделенную из лимфоцитов здоровых людей.

Подбор условий ПЦР и амплификацию образцов выполняли на градиентном амплификаторе (Eppendorf).

Электрофорез проводили в 1,5% агарозном геле при 100 В.

### Результаты и обсуждение

В работе исследовали 50 образцов от ВИЧ-инфицированных из Республики Саха (Якутия), 50 образцов из Вологодской области (Череповец) и 100 образцов из Московского региона (Москва и Московская область). Образцы были получены как от больных, не проходивших антиретровирусную терапию, так и от больных, находившихся на лечении (табл. 1).

В результате одностадийной амплификации регуляторных генов *vif*, *vpr*, *vpr*, *rev*, *tat* и *nef* было установ-

лено, что все они амплифицируются с малой чувствительностью. Результат амплификации одного из образцов приведен на рис. 2.

Из этого рисунка видно, что в клиническом образце имеется большое количество неспецифических полос, связанных с тем, что концевые последовательности регуляторных генов частично комплементарны последовательностям человеческого генома. Аналогичный результат был получен при исследовании других клинических образцов.

При проведении ПЦР тех же образцов с использованием дополнительных внешних праймеров (nested ПЦР) удалось выявить различные регуляторных генов (рис. 3).

Из рис. 3 следует, что в клинических образцах после двухстадийной амплификации наблюдаются четкие полосы, что говорит о правильно подобранной схеме проведения реакции.

В дальнейшем все исследования регуляторных генов проводили по следующей схеме: генетический материал выделяли из лимфоцитов (провирусная ДНК и ядерная РНК) и плазмы крови (вирусная РНК). Далее РНК подвергали ОТ-ПЦР. С провирусной ДНК сразу проводили амплификацию.

Амплификацию выполняли по схеме, показанной на рис. 1. В стадии 1 использовали праймеры 1F - 1R и TRf1- nef1r, далее ставили реакцию с использованием олигонуклеотидов для выявления отдельных генов.

При изучении гена *nef* было обнаружено, что в поздних (3 и 4) стадиях инфекции в ядерной фракции РНК

Таблица 1  
Распределение образцов по стадиям болезни

Стадия ВИЧ-инфекции	Количество образцов (n = 200)
2	115
3	68
4	17

Примечание. Здесь и в табл. 2: стадии ВИЧ-инфекции приведены по классификации В.В. Покровского.

Таблица 2  
Результаты исследования гена *nef*, выделенного от пациентов Московского региона в разных стадиях болезни (n = 100)

Генетический материал	Стадия ВИЧ-инфекции	Количество образцов	Выявляемый фрагмент	
			нормальный	укороченный
Провирусная ДНК	2	35	+	-
	3, 4	65	+	-
Вирусная РНК	2	35	+	-
	3, 4	65	+	-
Ядерная РНК	2	35	+	-
	3, 4	65	+	+
Плазмиды	-	1	+	-

Примечание. + - фрагмент выявляется; - - фрагмент не выявляется.

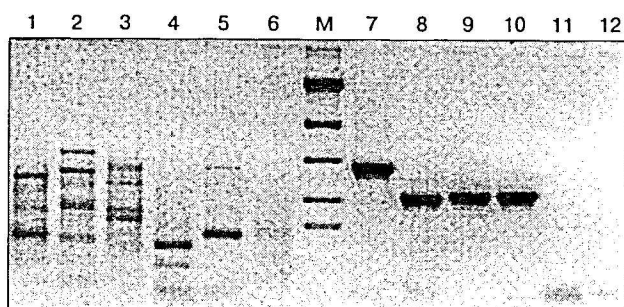


Рис. 2. Результат амплификации регуляторных генов *vif*, *vpr*, *vpr*, *rev*, *tat* и *nef* в одностадийной ПЦР.

М – ДНК-маркер молекулярной массы; 1, 7 – ПЦР с праймерами для выявления *vif*; 2, 8 – ПЦР с праймерами для выявления *vpr*; 3, 9 – ПЦР с праймерами для выявления *vpr*; 4, 10 – ПЦР с праймерами для выявления *tat*; 5, 11 – ПЦР с праймерами для выявления *rev*; 6, 12 – ПЦР с праймерами для выявления *nef*; 1–6 – образец от ВИЧ-инфицированного пациента М-11 (Москва); 7–12 – положительный контроль (плазмиды рВН10).

появляются фрагменты гена *nef*, которые на 120 нуклеотидов меньше фрагментов, полученных в ранних стадиях инфекции, а также выделенных из вирусной РНК, провирусной ДНК и положительного контроля. Результаты приведены в табл. 2.

Определение генетической последовательности полученных фрагментов полностью подтвердило данные гель-электрофореза. Исходя из полученных результатов можно сделать вывод, что в ядре клетки РНК гена *nef* подвергается сплайсингу. Поскольку этот эффект проявляется только в поздних стадиях ВИЧ-инфекции, можно заключить, что сплайсинг является одной из причин перехода болезни из бессимптомной стадии в манифестирующую.

Эксперименты для выделения и изучения последовательностей других регуляторных генов из ядерной РНК не увенчались успехом. Это можно объяснить как малым количеством исследуемых фрагментов РНК в ядерной фракции, так и тем, что граничные последовательности этих генов неблагоприятны для исследования с помощью ПЦР из-за высокой вариабельности данных областей генома ВИЧ. Двухстадийный ПЦР-анализ провирусной ДНК и вирусной РНК показал разнообразие длин получаемых амплификатов и различную частоту выявления этих генов (табл. 3). Так, амплификаты генов *tat* и *rev*, выделенные от разных пациентов, различались по размеру примерно на 30–80 нуклеотидов. Однако не было выявлено корреляции между длиной амплифика-

Таблица 3

Результаты исследования генов *vif*, *vpr*, *vpr*, *tat1-rev1* и *tat2-rev2*, выделенных от пациентов в разных стадиях болезни ( $n = 200$ )

Стадия (число образцов)	Ген, % выявления				
	<i>vif</i>	<i>vpr</i>	<i>vpr</i>	<i>tat1-rev1</i>	<i>tat2-rev2</i>
2 (115)	95	92	97	83	86
3, 4 (85)	96	93	97	83	87

Примечание. Здесь и в табл. 4: % выявления считали от количества образцов данной стадии.

Таблица 4

Частота выявления генов *vif*, *vpr*, *vpr*, *tat1-rev1* и *tat2-rev2*, выделенных от пациентов с разными субтипами вируса ( $n = 193^*$ )

Ген	Субтип, % выявления (число образцов)		
	A (132)	B (25)	<i>gagA/envB</i> (36)
<i>vif</i>	95	94	91
<i>vpr</i>	93	93	90
<i>vpr</i>	97	98	92
<i>tat1-rev1</i>	83	85	79
<i>tat2-rev2</i>	86	86	81

Примечание. \* – В таблицу не вошли данные о больных с другими субтипами вируса и не выявленными субтипами ( $n = 7$ ).

тов (амплифицированных генов) и стадиями болезни.

Из результатов, приведенных в этой таблице, видно, что чувствительность ПЦР при исследовании генов *vif*, *vpr*, *tat1-rev1* и *tat2-rev2* не зависит от стадии болезни. Более низкая чувствительность для генов *tat1-rev1* и *tat2-rev2* связана с более высокой изменчивостью этих генов и перекрывающимися рамками считывания.

При детальном анализе полученных результатов выяснилось, что частота выявления регуляторных генов *tat*, *rev*, *vif* и *vpr* ниже, а разброс размеров амплификатов выше для субтипа *gagA/envB*, чем для субтипов А и В (табл. 4).

### Заключение

В результате работы установлено, что из-за высокой изменчивости регуляторных генов для их изучения необходимо ставить «гнездовую» (nested) ПЦР.

В поздних стадиях ВИЧ-инфекции (3 и 4) был выявлен феномен сплайсинга гена *nef* в ядрах клеток. Данный феномен не наблюдался при исследовании вирусной РНК, выделенной из плазмы ВИЧ-инфицированных и провирусной ДНК независимо от стадии болезни, а

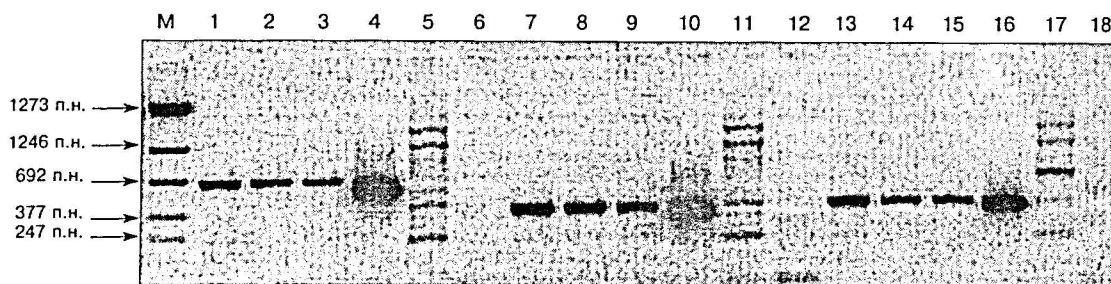


Рис. 3. Результат амплификации регуляторных генов *vif*, *vpr* и *tat-rev1* в двухстадийной ПЦР.

М – ДНК-маркер молекулярной массы; 1, 7, 13 – ВИЧ-положительный клинический образец М-11 (Москва); 2, 8, 14 – ВИЧ-положительный клинический образец М-12 (Москва); 3, 9, 15 – ВИЧ-положительный клинический образец М-13 (Москва); 4, 10, 16 – положительный контроль (плазмиды рВН10); 5, 11, 17 – отрицательный контроль (ДНК из лимфоцитов здорового донора); 6, 12, 18 – отрицательный контроль ( $H_2O$ ); 1–6 – ПЦР с праймерами к гену *vif*; 7–12 – ПЦР с праймерами к гену *vpr*; 13–18 – ПЦР с праймерами к гену *tat-rev1*.

также в ранних стадиях инфекции. Этот эффект может являться причиной перехода бессимптомной стадии ВИЧ-инфекции в манифестирующую.

Было впервые показано, что изменчивость регуляторных генов зависит от субтипа вируса. Исходя из этого факта можно предположить, что в субтипе gagA/envB, для которого выявлена большая частота мутаций в регуляторных генах, при лечении также быстрее образуются мутации и в структурных генах (gag, pol и env), ведущие к появлению вариантов, устойчивых к антиретровирусным препаратам.

#### ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Ohagen A., Gabuzda D. Role of Vif in Stability of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Core. *J. Virol.* 2000; 74(23): 11055–66.

2. Raymond A.D., Campbell-Sims T.C., Khan M., Lang M., Huang M.B., Bond V.C. et al. HIV type 1 Nef is released from infected cells in CD45<sup>+</sup> microvesicles and is present in the plasma of HIV-infected individuals. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 2011; 27(2): 167–78.
3. Mologni D., Citterio P., Menzaghi B., Zanone Poma B., Riva C., Brogini V. et al. Vpr and HIV-1 disease progression: R77Q mutation is associated with long-term control of HIV-1 infection in different groups of patients. *AIDS.* 2006; 20(4): 567–74.
4. Huigen M.C., Kamp W., Nottet H.S. Multiple effects of HIV-1 transactivator protein on the pathogenesis of HIV-1 infection. *Eur. J. Clin. Invest.* 2004; 34: 57–66.
5. Boya P., Pauleau A.L., Poncet D., Gonzalez-Polo R.A., Zamzami N., Kroemer G. Viral proteins targeting mitochondria: Controlling cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004; 1659 (2–3): 178–89.
6. Chase A., Zhou Y., Siliciano R.F. HIV-1-induced depletion of CD4<sup>+</sup> T cells in the gut: Mechanism and therapeutic implications. *Trends Pharmacol. Sci.* 2006; 27: 4–7.

Поступила 23.05.13

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ. 2015  
УДК 578.833.26:578.56].083.2

Дзюев Ю.П.<sup>1,2</sup>, Парамонов А.И.<sup>2</sup>, Рева О.Н.<sup>3</sup>, Букин Ю.С.<sup>4</sup>, Козлова И.В.<sup>1,2</sup>, Демина Т.В.<sup>5</sup>, Ткачев С.Е.<sup>6</sup>, Злобин В.И.<sup>1</sup>

## Детекция потенциальных сайтов рекомбинации вируса клещевого энцефалита методами сравнительной геномики

<sup>1</sup>ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 664025, г. Иркутск; <sup>2</sup>ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, 664003, г. Иркутск; <sup>3</sup>Университет Претории, ЮАР; <sup>4</sup>Лимнологический институт СО РАН, 664082, г. Иркутск; <sup>5</sup>ФГБОУ ВПО «Иркутская государственная сельскохозяйственная академия», 664038, г. Иркутск; <sup>6</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, г. Новосибирск

Представлены результаты биоинформационного поиска потенциальных сайтов рекомбинации в полногеномных структурах вируса клещевого энцефалита (ВКЭ) с помощью ряда программных методов. Проанализировано 55 геномов штаммов ВКЭ, из которых у 21 выявлено наличие сайтов рекомбинации. Рекомбинантные штаммы относились к дальневосточному ( $n = 19$ ) и европейскому ( $n = 2$ ) генотипам. Выявленные 22 сайта рекомбинации отнесены к 5 типам по позиционным, штаммовым и региональным характеристикам. Определены родительские штаммы, которые по генотипическим и географическим параметрам не противоречат возможности формирования рекомбинантов. Почти  $\frac{3}{5}$  сайтов расположены в области генов NS4a и NS4b штаммов ВКЭ, являющейся «горячей точкой» рекомбинации, при этом большая их часть концентрируется в гене NS4. Показано, что рекомбинационные процессы у ВКЭ происходят на уровне генотипа (европейского), определенных групп внутри генотипа (дальневосточного) и характерны для периферийных популяций ареала.

Ключевые слова: вирус клещевого энцефалита; сайты рекомбинации; методы программирования рекомбинации; родительские штаммы; «горячая точка» рекомбинации.

Для цитирования: Вопросы вирусологии. 2015; 60(3): 44–49.

Dzhioev Yu. P.<sup>1,2</sup>, Paramonov A. I.<sup>2</sup>, Reva O. N.<sup>3</sup>, Bukin Yu. S.<sup>4</sup>, Kozlova I. V.<sup>1,2</sup>, Demina T. V.<sup>5</sup>, Tkachev S. E.<sup>6</sup>, Zlobin V. I.<sup>1</sup>

## Detection of potential sites of recombination in the Tick-borne encephalitis virus by the methods of comparative genomics

<sup>1</sup>Irkutsk State Medical University, Ministry of Health of the Russian Federation, 664025, Irkutsk, Russia; <sup>2</sup>Scientific Center of Family Health Problems and Human Reproduction, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, 664003, Irkutsk, Russia; <sup>3</sup>University of Pretoria, South Africa; <sup>4</sup>Limnological Institute, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 664082, Irkutsk, Russia; <sup>5</sup>Irkutsk State Agricultural Academy, 664038, Irkutsk, Russia; <sup>6</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, 630090, Novosibirsk, Russia

The results of the bioinformatic search for the potential sites of the recombination in the genome-wide structures of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) through a series of software techniques were presented in this work. The genomes of the 55 TBEV strains were assayed, 21 of them showed the presence of the recombination sites. Recombinant strains belonged to the Far Eastern (19 strains) and European (2 strains) genotypes. 22 sites of the recombination attributed were identified to five types based on position, strain, and regional characteristics. The parental strains were identified based on the genotypic and geographical parameters, which do not contradict the possibility of the formation of the recombinants. Nearly two-thirds of the sites are located in the regions of NS4a and NS4b genes, which are the "hot spots" of the recombination, most of them being concentrated in the gene NS4. It was shown that the recombination processes did not occur at the level of the genotypes (European genotype) or certain groups within the genotype (Far East) and were typical of the peripheral populations.

Key words: tick-borne encephalitis virus; recombination sites; parent strains; recombination hotspot.

Citation: Voprosy virusologii. 2015; 60(3): 44–49. (In Russ.)

For correspondence: Yuriy Dzhioev, MD, PhD; e-mail: alanir07@mail.ru

Received 17.01.14

Для корреспонденции: Дзюев Юрий, канд. мед наук; e-mail: alanir07@mail.ru

## Введение

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ), относящийся к семейству Flaviviridae, роду Flavivirus, вызывает у людей тяжелые нейронные инфекции, в ряде случаев, с параличами, парезами и высокой летальностью [1, 2]. Описаны 3 основных генотипа ВКЭ – дальневосточный, западный (европейский) и урало-сибирский (сибирский). Два генетических варианта (прототипные штаммы 886-84 и 178-79) рассматриваются как 4-й и 5-й генотипы [3].

Одним из ведущих факторов изменчивости и эволюции живых систем являются процессы рекомбинации, создающие новые генотипы путем объединения генетического материала из различных линий, повышая генетическое разнообразие популяции [4]. Они также являются основной движущей силой в эволюции вирусов, непосредственно влияя на их адаптацию к новым хозяевам и патогенность [5]. Рекомбинация отмечена во всех группах ДНК-содержащих и у многих РНК-содержащих вирусов, в том числе у ряда представителей рода Flavivirus [6, 7]. Однако существование рекомбинации у ВКЭ до сих пор оспаривается из-за противоречивых данных разных авторов [8, 9]. Вместе с тем в ряде работ последних лет в результате использования более эффективных биоинформационных программных методов были представлены данные о выявлении сигналов рекомбинации в геномах ВКЭ [6, 10, 11].

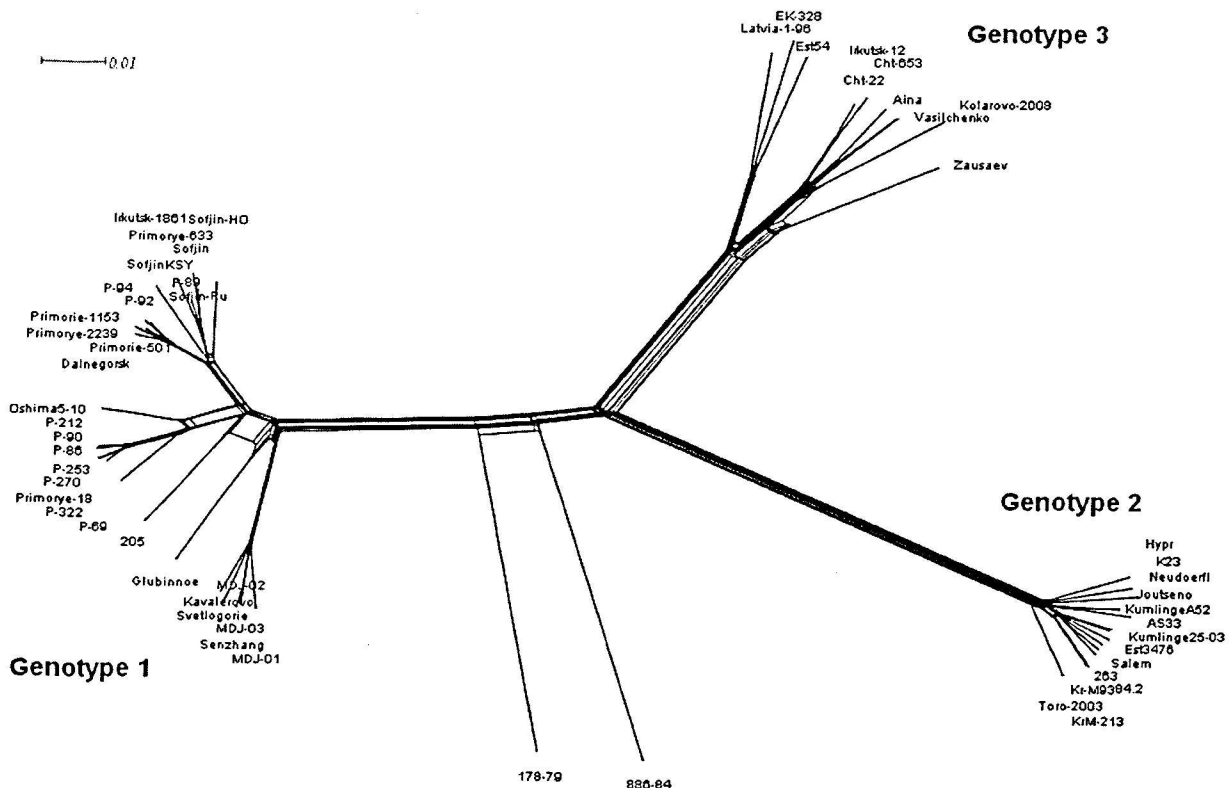
Целью данной работы было обнаружение в геномных последовательностях штаммов ВКЭ потенциальных сайтов рекомбинации, зафиксированных высокочувствительными программными методами, ориентированными на выявление рекомбинационных событий.

## Материалы и методы

**Последовательности нуклеотидов ВКЭ.** Материал представлен выборкой данных о кодирующей части геномов 55 штаммов ВКЭ из базы данных GenBank: TEU27491, TEU27495, TEU39292, AF091010, AB062063, AB062064, AY182009, L40361, DQ989336, DQ486861, EU106868, DQ862460, EF469661, EF469662, EU816450-EU816455,

FJ402885, FJ402886, FJ906622, FJ997899, GQ228395, GQ266392, AY169390, GU121642, HM859894, HM859895, HQ201303, HM120875, HM535610, HM535611, HQ901366, HQ901367, JF316707, JF316708, FJ968751, JF819648, GU183379-GU183384, JN003205- JN003209, AF527415, AY217093, DQ401140 и штамм Софьин [12]. Последовательности выровнены программой Clustal W с использованием штрафа за открытие делеции 15 и штрафа за продолжение 6,66 [13].

**Компьютерные программные методы.** Положение сайтов рекомбинации определяли с помощью 7 программных методов, реализованных в пакете программ RDP v. 3.34: RDP (Recombination detection program); Geneconv (Statistical Tests for Detecting Gene Conversion); BootScan (Bootstrap-based detection of recombination breakpoints); Chimaera (Maximum mismatch chi-square); 3Seq (Method for inferring mosaic structure in sequence triplets); SiScan (Sister-scanning), MaxChi (Maximum chi-square) [14–20]. Программы выполняли статистическую оценку полученных результатов. Результат считали достоверным, когда значение  $p$  было равным или меньше 0,05. Для пакета программ RDP были установлены следующие общие настройки: «последовательности линейные, коррекция Бонефолли, не требуется филогенетического подтверждения, отшлифовывать точки рекомбинации, показывать все события». В ходе работы с программами применяли следующие настройки: «RDP – внешние и внутренние ссылки, размер окна 30; Geneconv, g-scale = 1; BootScan – длина окна 200, шаг 20, использовать UPGMA дерево, число повторов бутстрэпа 100; MaxChi – заданный размер окна, 70 переменных сайтов на окно, не использовать пропуски; Chimaera – заданный размер окна, 70 переменных сайтов на окно». Все прочие настройки выставлены по умолчанию. Для статистической поддержки полученных результатов был использован метод Phi-тестирования [21]. Филогенетическое предположение присутствия рекомбинаций было получено с использованием программы Splits Tree v. 4.1 [22], методом Neighbor-net [23]. Данный метод отображает конфликтующие филогенетические сигналы в виде циклов внутри неукорененного дре-



Филогенетические сети, построенные методом Neighbor-net для исследуемой группы штаммов вируса клещевого энцефалита.

Позиции сайтов рекомбинации, родительские штаммы и фиксирующие их программы

Штамм	Номер в GenBank	Позиции сайтов	Фиксирующие программы	Родительские штаммы, %
MDJ-02	JF316707	7951-9122	RDP	Маж. род. Senzhang, 99,8 Мин. род. MDJ-01, 99,9
MDJ-03	JF316708	7951-9122	RDP	Маж. род. Senzhang, 99,7 Мин. род. MDJ-02, 99,8
Senzhang	AY182009	7934-9122	MaxChi	Маж. род. MDJ-03, 99,7 Мин. род. неизвестен (MDJ-01)
Irkutsk-1861	JN003205	6485-7030	Chimaera	Маж. род. Primorye-332, 95,1 Мин. род. неизвестен (205)
Sofjin-Ho	AB062064	6497-7013	"	Маж. род. Primorie-332, 95,3 Мин. род. неизвестен (205)
Sofjin	Her	6484-7011	"	Маж. род. Primorye-332, 95,1 Мин. род. неизвестен (205)
Sofjin-KSY	JF819648	6485-7030	"	Маж. род. Primorye-332, 95,2 Мин. род. неизвестен (205)
Primorye-89	FJ906622	6484-7007	"	Маж. род. Primorye-322, 95,4 Мин. род. неизвестен (205)
Primorye-92	HQ201303	6500-7013	"	Маж. род. Primorye-332, 95,5 Мин. род. неизвестен (205)
Primorye-94	EU816454	6497-7013	"	Маж. род. Primorye-332, 95,4 Мин. род. неизвестен (205)
MDJ-01	AY217093	7945-9122 7951-9122	3Seq RDP, Geneconv, Chimaera	Маж. род. неизвестен (Senzhang) Мин. род. MDJ-02, 99,9
Joutseno	GU183381	7139-8558 6844-8558	Geneconv MaxChi	Маж. род. AS33, 98,7 Мин. род. Est3476, 99,9
AS33	GQ266392	942-1701 946-1701	Geneconv MaxChi	Маж. род. Joutseno, 98,7 Мин. род. неизвестен (Est3476)
Primorye-2239	HM859895	6497-7013 6488-6670	Chimaera SiScan, Geneconv	Маж. род. Primorye-332, 95,5 Мин. род. неизвестен (205) Маж. род. Primorye-69, 95,3 Мин. род. неизвестен (205)
Sofjin-Ru	JN229223	6484-7007 6487-6734	Chimaera SiScan	Маж. род. Primorye-332, 95,2 Мин. род. неизвестен (205) Маж. род. Primorye-69, 95,3 Мин. род. неизвестен (205)
Dalnegorsk	FJ402886	6497-7013 6488-6570	Chimaera Geneconv	Маж. род. Primorye-332, 95,2 Мин. род. неизвестен (205) Маж. род. Primorye-69, 95,3 Мин. род. неизвестен (205)
205	DQ989336	359-1008 6506-6931	RDP RDP, MaxChi	Маж. род. Primorye-2239, 95,7 Мин. род. Glubinnoe, 98,3 Маж. род. неизвестен (Primorye-2239) Мин. род. P-212, 98,4
Glubinnoe	DQ862460	679-893 412-1008 359-1008	Geneconv MaxChi RDP	Маж. род. неизвестен (Primorye-2239) Мин. род. Primorye-332, 98,1 Маж. род. неизвестен (Primorye-2239) Мин. род. 205, 100
Primorye-501	HQ901367	6488-6725 6488-6570 6497-7013	SiScan Geneconv Chimaera	Маж. род. Primorye-69, 95,6 Мин. род. неизвестен (205) Маж. род. Primorye-332, 95,4 Мин. род. неизвестен (205)
Primorye-1153	HQ901366	6488-6725 6488-6570 6497-7013	SiScan Geneconv Chimaera	Маж. род. Primorye-69, 95,6 Мин. род. неизвестен (205) Маж. род. Primorye-332, 95,3 Мин. род. неизвестен (205)
Primorye-633	HM859894	6444-6725 6444-6569 6458-7007	SiScan Geneconv Chimaera	Маж. род. Primorye-69, 95,3 Мин. род. неизвестен (205) Маж. род. Primorye-332, 95,5 Мин. род. неизвестен (205)

Примечание. Маж. род. – мажорный родитель; мин. род. – минорный родитель; в скобках указан предполагаемый родитель.

ва [22]. Статистический тест проводили с помощью метода Conduct Phi Test for Recombinations из программной системы Splits Tree 4 test [21]. Хотя для получения данных о филогенетических несовместимостях мы использовали расстояния Джукса-Кантора, с исключением делеции и неинформативных для парсимонии сайтов, похожие результаты получаются с использованием и других параметров [24].

### Результаты

Поиск сайтов рекомбинации обычно начинают с создания филогенетической сети, построенной методом Neighbor-net по геномам исследуемых штаммов при анализе таких ретикуляционных событий, как гибридизация, горизонтальный перенос генов, рекомбинация, дупликация или потеря генов [22, 23]. Представленная на рисунке филогенетическая сеть похожа на филогенетическое древо генотипов ВКЭ, однако в ветвях имеется множество циклов и расколов, указывающих на возможность рекомбинаций, по крайней мере для некоторых последовательностей, представленных на этой модели. Для более достоверной оценки филогенетической сети, предполагающей наличие событий рекомбинации было использовано 7 программных методов из пакета программ RDP v. 3.34 [14–20]. Учитывали только те выявленные сайты, в которых достоверность фиксации сигналов рекомбинации была меньше 0,05. Разные программы выявили следующие частоты рекомбинаций: GenesconV – 30 случаев, RDP – 13, MaxChi и SiScan – по 10, менее всего – 3Seq и BootScan – по 4. По итогам детекции был выявлен 21 рекомбинантный штамм ВКЭ, а также определены его предполагаемые родительские штаммы (табл. 1). Родительские штаммы, которые устанавливали с наибольшей долей вероятности, определяли как мажорные, а с менее значимой вероятностью – как минорные.

Штаммы по количеству выявленных сайтов рекомбинаций на геном разделились на основную группу из 20 штаммов с одним сайтом рекомбинации и штамм 205 с двумя сайтами. В основной группе за исключением штамма Glubinnoe все сайты рекомбинации выявлены в неструктурной области генома, причем 3 сайта – в области гена NS5 (китайские штаммы MDJ-03, MDJ-03, Senzhang). Сайты для штаммов MDJ-02 и MDJ-03 определены методом RDP. Наиболее вероятным (мажорным) их родительским штаммом является Senzhang, но по менее вероятному (минорному) родителю они различаются: у MDJ-02 это штамм MDJ-01, а у штамма MDJ-03 – MDJ-02. Для рекомбинанта *Senzhang* мажорным родителем является штамм MDJ-03 при неизвестном, но предполагаемом минорном родителе MDJ-01 (выявлены программой MaxChi). Далее, у 7 штаммов (№ 4–10, в табл. 1) все сайты расположены в гене NS4a и на стыке генов NS4a и NS4b (табл. 2). Мажорным родителем для этих рекомбинантов является штамм Primorye-332, а в качестве минорного предполагается штамм 205.

У остальных штаммов (№ 11–21, кроме штамма 205, см. табл. 1) в геноме условно посредством разных программ выделяются по 2 или 3 сайта рекомбинации с небольшими различиями по длине фрагмента. В китайском штамме MDJ-01 разными программами показаны 2 сайта, различающихся по длине всего на 5 нуклеотидов и имеющих одинаковые родительские штаммы. Хотя мажорный штамм достоверно не определен, но предполагается штамм Senzhang. В европейских штаммах AS33 и Joutseno сайты рекомбинации различны по положению в геноме. В штамме AS33 сайт расположен в гене E, имея общих мажорного и предполагаемого минорного родителей – Joutseno и Est 3476. Сайты в штамме Joutseno расположены на стыке генов NS4b и NS5 (см. табл. 2), имея общего мажорного (AS 33) и минорного (Est 3476) родителей. В штамме Primorye-2239 оба сайта зафиксированы на стыке генов NS4a и NS4b, выявляются разными программами и имеют разных предполагаемых родителей.

Аналогичная картина наблюдается для штаммов Sofjin-Ru и Dalnegorsk, но у них варианты предполагаемых родителей совпадают. При сопоставлении Sofjin-Ru с его тремя однокорневыми вариантами (Sofjin-HO, Sofjin, Sofjin-KSY) заметны различия.

Аналогичная картина представлена у штамма Glubinnoe, в

Таблица 2

### Характеристика выявленных сайтов рекомбинации штаммов ВКЭ

Позиции сайтов	Размер сайтов, н.о.	Штаммы, в которых встречаются сайты	Гены, в которых расположены сайты
359–1008	649	205, Glubinnoe	M + E
412–1008	591	Glubinnoe	M + E
679–893	214	Glubinnoc	M + E
942–1701	759	AS33	E
6444–6569	125	Primorye-633	NS4a
6444–6725	281	"	NS4a
6488–6570	82	Primorye-501, Dalnegorsk	NS4a
6488–6725	237	Primorye-1153, Primorye-501	NS4a
6488–6670	182	Primorye-2239	NS4a
6458–7007	549	Primorye-633	NS4a + NS4b
6484–7007	523	Sofjin-Ru, Primorye-89	NS4a + NS4b
6484–7011	527	Sofjin	NS4a + NS4b
6487–6734	247	Sofjin-Ru	NS4a + NS4b
6497–7013	516	Sofjin-HO, Primorye -94, Primorye-2239, Dalnegorsk, Primorye-501, Primorye-1153	NS4a + NS4b
6500–7013	513	Primorye-92	NS4a + NS4b
6485–7030	545	Sofjin-KSY, Irkutsk-1861	NS4a + NS4b
6506–6931	425	205	NS4b
6844–8558	1714	Joutseno	NS4b + NS5
7139–8558	1419	"	NS4b + NS5
7934–9122	1188	Senzhang	NS5
7945–9122	1177	MDJ-01	NS5
7951–9122	1171	MDJ-01, MDJ-02, MDJ-03	NS5

Примечание. н.о. – нуклеотидные основания.

котором все условные 3 сайта, с одной стороны, расположены на стыке структурных генов M и E, а с другой, имея общего предполагаемого мажорного родителя Primorye-2239, фиксируются тремя разными программами (см. табл. 1). Однако, у штаммов Primorye-501, Primorye-1153 и Primorye-633 сайты рекомбинации выявляются одними и теми же программами, которым соответствуют одни и те же комбинации родительских штаммов. Совпадают у них также позиции сайтов в генах NS4a и NS4b (см. табл. 2). У штамма 205 сайт 359–1008 выявляется на стыке двух структурных генов M и E и фиксируется методом RDP, имея родителей Primorye-2239 и Glubinnoc. Второй сайт 6506–6931 расположен в гене NS4b, и это единственный сайт среди всех, который определяется в этом гене (см. табл. 2). При этом программы, фиксирующие сайт, выявляют различных родителей (см. табл. 1).

Далее в табл. 2 приводятся характеристики позиций и размерностей 22 вариантов сайтов рекомбинации с оценками их генной принадлежности. Здесь размерности сайтов варьирует в широком диапазоне – от 82 до 1714 н.о. Наиболее крупные сегменты выявляются на стыке генов NS4b и NS5 и в гене NS5. Чаше сайты обнаруживаются в гене NS4a и в районах стыков этого гена с геном NS4b (68,2%). Этот участок генома можно охарактеризовать как «горячую точку» рекомбинации ВКЭ. На ген NS4a приходится 80% рекомбинационных замен, и его можно считать ядром «горячей точки» рекомбинационных событий у ВКЭ. В генах C, NS1, NS2a, NS2b, NS3 не были зафиксированы сигналы рекомбинации, что можно объяснить (исключив ген C) тем, что они представляют высококонсервативный репликативный комплекс ВКЭ [12].

Как видно из табл. 2, все 22 выявленных сайта рекомбинации можно разделить на 5 типов по позиционным, штаммовым и региональным характеристикам. К первому типу можно отнести сайты под 1–3, которые расположены на стыке генов M и E. Они выявлены в двух штаммах – 205 и Glubinnoc. Второй тип характерен для гена структурного белка E, носителем которого является европейский штамм AS33



Результаты статистического анализа методом Phi-теста

№ группы	Группы штаммов, принадлежащих к разным генотипам	Число штаммов	Оценка по Phi-тесту (p-value)
1	Все исследованные штаммы	55	0,137
2	Все исследованные штаммы дальневосточного генотипа	30	0,092
3	Все исследованные штаммы европейского генотипа	13	0,008
4	Все исследованные штаммы сибирского генотипа	10	0,526
5	Все штаммы с выявленными признаками рекомбинации (дальневосточный + европейский генотипы)	21	0,137
6	Штаммы с выявленными признаками рекомбинации (дальневосточный генотип, 2 штамма европейского генотипа исключены)	19	0,0015

Примечание. В группах не учитываются штаммы 886–84 и 178–79.

восточном. В штаммах из сибирского региона, занимающих центр ареала ВКЭ, всеми используемыми программными методами не были определены достоверные сайты рекомбинации, что соответствует принципам популяционной генетики – рекомбинации более вероятны в периферийных популяциях, чем в популяциях центральной части ареала вида [24]. Предполагаемые родительские штаммы географически и генотипически связаны с конкретными рекомбинантными штаммами, что может отражать достоверность их родственных связей. Показаны различия в степени чувствительности и специфичности используемых программных методов. Все программы RDP по-разному оценивают и фиксируют как сайты рекомбинации, так и родительские штаммы рекомбинантов. Тем не менее в совокупности они предоставляют высокодостоверную информацию о наличии в геномах штаммов ВКЭ потенциальных сигналов рекомбинации и определяют границы рекомбинантных сайтов. Вместе с Phi-тестированием они фиксируют связь рекомбинационных событий у ВКЭ с определенными иерархическими уровнями: генотипическим (европейский), субгенотипическим (дальневосточный) и популяционным (рекомбинанты выявляются в популяциях на периферии ареала).

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Зильбер Л.А. Весенний (весенне-летний) эпидемический клещевой энцефалит. *Архив биологических наук*. 1939; 2: 9–37.
2. Thiel H.-J., Collett M. S., Gould E. A., Heinz F. X., Houghton M., Meyers G. et al. Family Flaviviridae. In: Fauquet C.M. et al., eds. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Amsterdam: Elsevier; 2005; 981–98.
3. Демина Т.В., Джюев Ю.П., Козлова И.В., Верхозина М.М., Ткачев С.Е., Дорошенко Е. К., и др. Генотипы 4 и 5 вируса клещевого энцефалита: особенности структуры геномов и возможный сценарий их формирования. *Вопросы вирусологии*. 2012; 4: 13–9.
4. Суходолец В.В. Значение генетических рекомбинаций для сохранения и прогресса видов в эволюции. *Журнал общей биологии*. 2003; 3: 215–26.
5. Цилинский Я.Я. *Популяционная структура и эволюция вирусов*. М.: Медицина; 1988.
6. Bertrand Y., Tupel M., Elvdng A., Melik W., Johansson M. First dating of a recombination event in mammalian tick-borne flaviviruses. *PLoS One*. 2012; (7): 1–12.
7. Carney J., Daly J.M., Nisalak A., Solomon T. Recombination and positive selection identified in complete genome sequences of Japanese encephalitis virus. *Arch. Virol*. 2012; 157: 75–3.
8. Taucher C., Berger A., Mandl C.W. A trans-complementing recombination trap demonstrates a low propensity of flaviviruses for intermolecular recombination. *J. Virol*. 2010; 84: 599–11.
9. Twiddy S.S., Holmes E.C. The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. *J. Gen. Virol*. 2003; 84: 429–40.

(№ 4). Штаммы третьего типа (№ 5–17) расположены в генах *NS4a* и *NS4b* и на их стыках. Четвертая группа представлена штаммом Joutseno, сайты которого (№ 18–19) расположены на стыке генов *NS4b* и *NS5* и являются самыми длинными рекомбинантными фрагментами – 1714 и 1419 н.о. Китайские штаммы Senzhang, MDJ-01, MDJ-02, MDJ-03 формируют пятый тип, их сайты занимают позиции в гене *NS5* (№ 20–22) и специфичны только для них.

Для статистического анализа рекомбинационных событий использовали Phi-тестирование [21]. Было сформировано 6 групп (табл. 3). В первой группе, куда вошли все исследованные 55 штаммов, достоверно не выявлено наличия сигналов рекомбинации (степень критерия достоверности  $p = 0,137$ ). В группе из всех проанализированных дальневосточных штаммов также не обнаружено сайтов рекомбинации ( $p = 0,092$ ), но в группе штаммов европейского генотипа были зафиксированы высокодостоверные сигналы рекомбинации ( $p = 0,008$ ). Для штаммов сибирского генотипа не было выявлено достоверных сигналов рекомбинации. При анализе выборки из 21 выявленного рекомбинантного штамма критерий достоверности – также  $p = 0,137$ . Однако после удаления из этой группы 2 штаммов европейского генотипа в остальных 19 штаммах дальневосточного генотипа был зафиксирован высокодостоверный сигнал рекомбинации ( $p = 0,0015$ ). В этом случае результаты, полученные с помощью RDP-метода и Phi-теста, совпадают, фиксируя сигналы рекомбинации среди групп штаммов европейского и дальневосточного генотипов и не выявляя их в сибирском генотипе.

#### Обсуждение

Рекомбинации и мутации являются первичными внутренними источниками генетической изменчивости организмов (в том числе вирусов), формирующими эволюционный и адаптационный потенциалы вида. Мутации обеспечивают увеличение разнообразия генофонда популяции за счет точечной перестройки существующего генетического материала без притока генов извне, а рекомбинации в рамках существующих геномов дают начало образованию новых генотипов за счет перераспределения уже существующих генетических структур [4, 5]. Отсюда можно сделать вывод, что если определенный вид (в том числе вид вируса) имеет генотипическую структуру, то рекомбинации в таких случаях должны играть определяющую роль. Как известно, все виды живых организмов имеют определенный ареал и соответственно подразделены на популяционные иерархические структуры, а в пространстве ареала распределяются на периферийные и центральную популяции [4, 24]. В работе Э. Майра [24] отмечено, что в центральных популяциях видов в генотипах преобладают мутационные процессы, а в периферийных возрастают возможности рекомбинационных процессов. Эта концепция экстраполируется и на вирусные популяции исходя из общегенетических принципов, согласно которым вирусы в своей эволюционной и адаптационной стратегии также подчиняются им [5]. Поэтому утверждения ряда авторов о невозможности рекомбинаций у ВКЭ [8, 9] представляются недостаточно обоснованными. Их утверждения опровергаются также обнаружением рекомбинационных событий у вирусов, для которых ранее они отрицались [6, 7, 10, 11].

Таким образом, можно выделить несколько следующих особенностей, определяющих и характеризующих структуру выявленных сайтов рекомбинации у ВКЭ. Выявлена группа из 21 штамма, в геномах которых зафиксированы потенциальные участки рекомбинации с одним или двумя сайтами. Зафиксированные сайты рекомбинации можно подразделить на 5 типов по позиционным, штаммовым и региональным характеристикам. Выявлен регион (гены *NS4a* и *NS4b*), образующий «горячую точку» рекомбинации ВКЭ. Сайты рекомбинации привязаны к двум генотипам – дальневосточному и европейскому. Показано, что рекомбинационные процессы у ВКЭ происходят на уровне как генотипа (европейский генотип), так и определенных групп внутри генотипа (дальневосточный). Выявлено пространственное распределение сайтов рекомбинации: они фиксируются только в периферийных регионах (популяциях) ареала ВКЭ – европейском и дальне-

10. Джиоев Ю.П., Парамонов А.И., Демина Т.В., Козлова И.В., Верхожина М.М., Ткачев С.Е. и др. Обнаружение рекомбинаций у вируса клещевого энцефалита с помощью компьютерного анализа вирусных геномов. *Вопросы вирусологии*. 2012; 2: 14–8.
11. Norberg P., Roth A., Bergström T. Genetic recombination of tick-borne flaviviruses among wild-type strains. *Virology*. 2013; 440: 105–16.
12. Pletnev A.G., Yamshchikov V.F., Blinov V.M. Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the polyprotein of tick-borne encephalitis virus. *Virology*. 1990; 174: 250–63.
13. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22: 4673–80.
14. Boni M.F., Posada D., Feldman M.W. An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics*. 2007; 176: 1035–47.
15. Gibbs M.J., Armstrong J.S., Gibbs A.J. Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics*. 2000; 16: 573–82.
16. Martin D.P., Posada D., Crandall K.A., Williamson C. A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2005; 21: 98–2.
17. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefeuve P. Rdp3: A flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics*. 2010; 26: 2462–63.
18. Maynard S.J. Analyzing the mosaic structure of genes. *J. Mol. Evol*. 1992; 34: 126–9.
19. Padidam M., Sawyer S., Fauquet C.M. Possible emergence of new Gemini viruses by frequent recombination. *Virology*. 1999; 265: 218–25.
20. Posada D., Crandall K.A. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; 98: 13757–62.
21. Bruen T. C., Philippe H., Bryant D. A quick and robust statistical test to detect the presence of recombination. *Genetics*. 2006; 172: 2665–81.
22. Huson D.H., Scornavacca C. A survey of combinatorial methods for phylogenetic networks. *Genome Biol. Evol*. 2011; 3: 23–5.
23. Bryant D., Moulton V. Neighbor-Net: An agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol. Biol. Evol*. 2004; 21: 255–65.
24. Jukes T.H., Cantor C.R. Evolution of Protein Molecules. In: Munvo, ed. *Mammalian Protein Metabolism*. New York: Academic Press; 1969: 21–132.
25. Майр Э. Популяция, виды и эволюция. М.: Мир; 1974.
5. Tsilinskiy Ya.Ya. *Population structure and evolution of viruses [Populyatsionnaya struktura i evolyutsiya virusov]*. Moscow: Meditsina; 1988. (in Russian)
6. Bertrand Y, Töpel M, Elväng A, Melik W, Johansson M. First dating of a recombination event in mammalian tick-borne flaviviruses. *PLoS One*. 2012; (7): 1–12.
7. Carney J., Daly J.M., Nisalak A., Solomon T. Recombination and positive selection identified in complete genome sequences of Japanese encephalitis virus. *Arch. Virol*. 2012; 157: 75–3.
8. Taucher C., Berger A., Mandl C.W. A trans-complementing recombination trap demonstrates a low propensity of flaviviruses for intermolecular recombination. *J. Virol*. 2010; 84: 599–11.
9. Twiddy S.S., Holmes E.C. The extent of homologous recombination in members of the genus *Flavivirus*. *J. Gen. Virol*. 2003; 84: 429–40.
10. Dzhioev Yu.P., Paramonov A.I., Demina T.V., Kozlova I.V., Verkhozina M.M., Tkachev S.E. et al. Detection of recombinations have borne encephalitis virus using computer analysis of viral genomes. *Voprosy Virusologii*. 2012; 2: 14–8. (in Russian)
11. Norberg P., Roth A., Bergström T. Genetic recombination of tick-borne flaviviruses among wild-type strains. *Virology*. 2013; 440: 105–16.
12. Pletnev A.G., Yamshchikov V.F., Blinov V.M. Nucleotide sequence of the genome and complete amino acid sequence of the polyprotein of tick-borne encephalitis virus. *Virology*. 1990; 174: 250–63.
13. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994; 22: 4673–80.
14. Boni M.F., Posada D., Feldman M.W. An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics*. 2007; 176: 1035–47.
15. Gibbs M.J., Armstrong J.S., Gibbs A.J. Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics*. 2000; 16: 573–82.
16. Martin D.P., Posada D., Crandall K.A., Williamson C. A modified bootscan algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. 2005; 21: 98–2.
17. Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefeuve P. Rdp3: A flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics*. 2010; 26: 2462–63.
18. Maynard S.J. Analyzing the mosaic structure of genes. *J. Mol. Evol*. 1992; 34: 126–9.
19. Padidam M., Sawyer S., Fauquet C.M. Possible emergence of new Gemini viruses by frequent recombination. *Virology*. 1999; 265: 218–25.
20. Posada D., Crandall K.A. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; 98: 13757–62.
21. Bruen T. C., Philippe H., Bryant D. A quick and robust statistical test to detect the presence of recombination. *Genetics*. 2006; 172: 2665–81.
22. Huson D.H., Scornavacca C. A survey of combinatorial methods for phylogenetic networks. *Genome Biol. Evol*. 2011; 3: 23–5.
23. Bryant D., Moulton V. Neighbor-Net: An agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol. Biol. Evol*. 2004; 21: 255–65.
24. Jukes T.H., Cantor C.R. Evolution of Protein Molecules. In: Munvo, ed. *Mammalian Protein Metabolism*. New York: Academic Press; 1969: 21–132.
25. Mayr E. *Population, species and evolution [Populyatsiya, vidy i evolyutsiya]*. Moscow: Mir; 1974. (in Russian)

## REFERENCES

1. Zil'ber L.A. Spring (spring-summer ) epidemic encephalitis *Arkhiv biologicheskikh nauk*. 1939; 2: 9–37. (in Russian)
2. Thiel H.-J., Collett M. S., Gould E. A., Heinz F. X., Houghton M., Meyers G., et.al. Family Flaviviridae. In: Fauquet C.M. et al., eds. *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature. Eighth Report of the International Committee on the Taxonomy of Viruses*. Amsterdam: Elsevier; 2005: 981–98.
3. Demina T.V., Dzhioev Yu.P., Kozlova I.V., Verkhozina M.M., Tkachev S.E., Doroshchenko E. K. et al. Genotypes 4 and 5 are borne encephalitis virus : structural features of genomes and a possible scenario for their formation. *Voprosy Virusologii*. 2012; 4: 13–9. (in Russian)
4. Sukhodolets V.V. Value for the conservation of genetic recombination and progress in the evolution of species. *Zhurnal Obshchey Biologii*. 2003; 3: 215–26. (in Russian)

Поступила 17.01.14