

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

Применение современных молекулярно-генетических технологий для обеспечения биологической безопасности

Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, Москва

Резюме. В работе излагаются принципы применения современных молекулярно-генетических технологий для выявления особенностей циркуляции вирусов в интересах биобезопасности государства. Среди примеров, которые не только иллюстрируют эти принципы, но и могут являться моделями для решения задач обеспечения биобезопасности, значительное внимание уделяется результатам эколого-вирусологического мониторинга территории Северной Евразии 1969–1989 гг. (вирусы Хурдун, Раздан, Бханджа, Гиссар, Хасан, Иссык-Куль, Тамды, Бурана, Узун-Агач, Арташат, Сахалин, Парамушир, Чим, Герань, Сокулук, Тюлений, Кама, Алма-Арасан, Баку, Каспий, Охотский, Анива, Командоры, Залив Терпения, лихорадки долины Сырдарьи, Сихотэ-Алинь, Тюлэк) в контексте новых молекулярно-генетических методов исследований, анализу распространения вирусов тяжёлого острого респираторного синдрома (ТОРС), ближневосточного респираторного синдрома (БВРС), гриппа А (H5N1) птиц, А (H7N9) птиц и А (H1N1) pdm09. Таким образом, полученные данные, помимо решения фундаментальных задач, связанных с описанием генетического разнообразия и таксономии вирусов животных, могут быть использованы для разработки молекулярно-генетических методов детекции вируса – полимеразной цепной реакции и полимеразной цепной реакции в реальном времени – для мониторинга и диагностики инфекций на эндемичных территориях, а также в качестве модели для решения подобных задач с другими неизвестными возбудителями.

Ключевые слова: биологическая безопасность, метагеномный анализ, *Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus*, птицы, *Ixodidae*, *Argasidae*, летучие мыши.

Введение. Особую угрозу национальной и глобальной безопасности представляют новые и вновь возвращающиеся (emerging-reemerging) инфекции. Они возникают в результате природных катаклизмов или криминальных действий. Эти ситуации возникают в мире всё чаще и становятся всё более грозными. Мы ничтожно мало знаем об огромном потенциале патогенности этих возбудителей. Они ждут своего часа. Мы их называем «дремлющим вулканом» [17]. Этот постулат остаётся неизменным на протяжении последних 10 тыс. лет с периода становления человеческого общества. За это время практически все известные инфекционные болезни людей были интродуцированы из популяций домашних и диких животных. Процесс продолжается и в наше время [17, 24]. Появление ряда вирусов на неэндемичных ранее территориях вызывает тяжелейшие последствия, как это, например, недавно случилось с вирусом африканской чумы свиней (семейство *Asfarviridae*), прорвавшимся на территорию России из Грузии через Кавказский хребет [9]. Другой пример – появление в 2011 г. в Германии тяжёлого заболевания крупного и мелкого рогатого скота, связанного с новым ортобуньявирусом Шмалленберг [32].

Ранее нами [14, 16, 24, 33, 46, 47] проведено исследование по выявлению, подобно радиационному, биологического фона. Это были перманентные маневры

по прогнозу и снижению последствий чрезвычайных эпидемических ситуаций природного и искусственного происхождения. Проведено зондирование Северной Евразии. Зонды длиной более двух тысяч километров проходили через 5–7 климатических поясов, от Арктики на севере до пустынь на юге. Обследована территория свыше 15 млн км². Изолировано около 90 вирусов, из которых 26 оказались новыми для науки. По крайней мере, 9 из них патогенны для человека. Зондирование территории Российской Федерации и стран СНГ проводилось в рамках Программы по биобезопасности и изучению биоразнообразия в различных экосистемах Северной Евразии.

При возникновении внештатной эпидемической ситуации необходимо как можно скорее установить этиологию возбудителя. Это чрезвычайно важно для его сравнения с известными возбудителями, определения потенциала патогенности, возможности использования тех или других вирулицидов для лечения человека и животных, создания диагностических тест-систем, вакцин. В последнее время на основе метагеномного подхода появилась возможность надёжно и достаточно быстро установить полную молекулярно-генетическую характеристику нового возбудителя и определить тем самым его таксономический статус путём метагеномного анализа [1].

Материалы и методы. В работе использовались ранее неклассифицированные вирусы из Государственной коллекции вирусов Российской Федерации (ГКВ РФ) при Научно-исследовательском институте вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава России.

Для накопления вируса лиофилизированная суспензия из хранилища ГКВ РФ была восстановлена в 1 мл культуральной среды двойной модификации среды Игла (ДМЕМ) с добавлением антибиотика и использована для интрацеребрального заражения новорожденных беспородных белых мышей. После развития симптомов поражения центральной нервной системы (2–3 сут) мышей забивали в соответствии с правилами содержания и использования лабораторных животных.

Выделение рибонуклеиновой кислоты (РНК) из фрагментов мозга (около 30 мг) проводили с помощью набора «TRIzol» фирмы «Life Technology» (Соединенные Штаты Америки – США) в соответствии с рекомендациями производителя реагента. Для удаления низкомолекулярных фракций рибосомальной (5 S) и транспортной РНК полученный препарат дополнительно очищали набором «RNeasy mini kit» фирмы «QIAGEN» (Германия) в режиме clean-up на автоматической станции «QIAcube» фирмы «QIAGEN» (Германия) согласно инструкции.

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

Для получения ДНК библиотек из дцДНК использовали набор «TruSeq DNA Sample Prep Kits v2» фирмы «Illumina» (США) в соответствии с инструкцией. Секвенирование ДНК-библиотек проводили с помощью метагеномного подхода на приборе «MiSeq» фирмы «Illumina» (США) с использованием набора «MiSeq Reagent Kits V2 (300PE)» в соответствии с инструкцией производителя. Метагеномное секвенирование подразумевает секвенирование тотальной ДНК или РНК всех организмов, находящихся в исследуемой пробе с дальнейшим анализом биоинформационными методами. Анализ метагеномных данных проводится путём поиска гомологичных последовательностей среди известных вирусов, депонированных в базе геномных данных. Обработку данных полногеномного секвенирования, сборку контигов и картирование

ридов проводили с использованием программы «CLC Genomics Workbench 6.0» фирмы «CLC bio» (США). Предварительный поиск гомологичных последовательностей проводили с использованием сервиса «BLASTX» (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Для анализа нуклеотидных и аминокислотных последовательностей использовали пакет программ «Lasergene Core Suite» (США). Выравнивание последовательностей проводили по алгоритму ClustalW. Филогенетический анализ и построение дендрограмм проводили с использованием программы MEGA5 по методу ближайшего соседа (neighbor-joining) с 500-кратным бутстреп-тестированием.

Результаты и их обсуждение. При проведении мониторинга в Северном Прикаспии был открыт вирус Хурдун (KHURV – Khurdun virus), изолированный в урочище Хурдун в дельте Волги. Позднее в Государственную коллекцию вирусов были депонированы ещё 22 штамма вируса из всех трёх секторов дельты Волги: западного, центрального и восточного [9]. Филогенетический анализ показал, что KHURV формирует обособленную группу рода *Orthobunyavirus*. Вместе с тем, учитывая уникальную структуру М-сегмента – его укороченность на 1200 нуклеотидов – и наличие в оболочечном белке Gc-участков, не имеющих гомологии с другими ортобуньявирусами, нельзя исключить возможности выделения вируса Хурдун в отдельный род *Khurduvirus* в сем. *Bunyaviridae* (рис. 1, табл. 1) [2]. Дальнейшие исследования в этом отношении проводятся.

Вирус Раздан (RAZV – Razdan virus) выделен при зондировании Закавказья в Разданском районе Армении (рис. 2) [44]. При сравнении геномов вирусов Раздан и Бханджа (BHAV – Bhanja virus) было найдено, что уровень идентичности между ними по аминокислотным последовательностям вирусных белков составляет 88–96%. На этом основании ранее неклассифицированный буньявирус RAZV на основании высокой гомологии (более 90%) генома был отнесён нами к группе Бханджа, формирующую отдельную филогенетическую группу в составе рода *Phlebovirus* [3].

Вирус Хасан (KHAV – Khasan virus) при зондировании Дальнего Востока был изолирован в Хасанском районе Приморского края [43]. На основании филогенетического анализа KHAV был отнесён к семейству *Bunyaviridae*, роду *Phlebovirus*, в котором вирус формирует отдельную ветвь, близкую к вирусам группы Укуниеми [5].

Зондирование в Средней Азии привело к изоляции свыше 10 новых вирусов, в том числе – вируса Иссык-Куль (ISKV – Issyk-Kul virus) – этиологического агента Иссык-Кульской лихорадки. Вирус впервые был выделен в Киргизии от летучих мышей и их облигатных паразитов – клещей *Argas vespertilionis*, а также от больного человека [39]. Спорадическая заболеваемость и эпидемические вспышки Иссык-Кульской лихорадки регистрируются в странах Средней Азии. Случаи

Таксономический статус ранее неклассифицированных вирусов, изолированных на территории Северной Евразии

Таксономический статус					Тип биоценоза				Регион
семейство	род	антигенный комплекс	вирус	ID GenBank	паст-бищ-ный	убе-жищ-ный	гнездовые птиц		
							вы-сокие широты	уме-ренные широты	
Bunyaviridae	Orthobunyaviridae	Хурдун *	Хурдун (KHURV)	KF981636-8	-	-	-	+	юг Русской равнины
	Phlebovirus	Бханджа	Раздан (RAZV)	KC335496-8	+	-	-	-	Закавказье
		Укуниеми	Хасан (KHAV)	KF892046-8	+	-	-	-	юг Дальнего Востока
			Командоры (KOMV)	KF892049-51	-	-	+	-	север Дальнего Востока
			Залив Терпения (ZTV)	KF892040-2	-	-	+	-	север Дальнего Востока
			Гиссар (GSSV)	KJ425423-5	+	-	-	-	Средняя Азия
	Nairovirus	Иссык-Куль	Иссык-Куль (ISKV)	KF892055-7	-	+	-	-	Средняя Азия
		Тамды *	Тамды (TAMV)	KF801653	+	-	-	-	Средняя Азия
			Бурана (BURV)	KF801651	+	-	-	-	Средняя Азия
		Узун-Агач *	Узун-Агач (UZAV)	В процессе депонирования	-	+	-	-	Средняя Азия
		Сахалин *	Сахалин (SAKHV)	KF801659	-	-	+	-	север Дальнего Востока
			Парамушир (PRMSV)	KF801657	-	-	+	-	север Дальнего Востока
		Хьюз	Каспий (CASV)	KF801658	-	-	-	+	Средняя Азия, Закавказье
		Арташат *	Арташат (ARTSV)	KF801650	-	+	-	-	Закавказье
	Кальюб	Чим (CHIMV)	KF801656	-	+	-	-	Средняя Азия, Закавказье	
Герань (GERV)		KF801649	-	+	-	-	Средняя Азия, Закавказье		
Reoviridae	Orbivirus	Кемерово	Охотский (OKHV)	KF981623-32	-	-	+	-	север Дальнего Востока
			Анива (ANIV)	KJ191541-7	-	-	+	-	север Дальнего Востока
			Баку (BAKUV)	KJ191548-57	-	-	-	+	Средняя Азия, Закавказье
			Вад-Медани (WMDV)	KJ425426-35	+	-	-	-	Средняя Азия, Закавказье
Togaviridae	Alphavirus	Синдбис	Кызылагач (KYZV)	KF981618	-	-	-	+	Закавказье
Flaviviridae	Flavivirus	летучих мышей Энтеббе	Сокулук (SOKV)	KF981619-22	-	+	-	-	Средняя Азия
		Тюлений *	Тюлений (TYUV)	KF815939	-	-	+	-	север Дальнего Востока
			Кама (KAMV)	KF815940	-	+	-	+	север Дальнего Востока, север Европы
		Клещевого энцефалита	Алма-Арасан (ALARV)	В процессе депонирования	+	-	-	-	Средняя Азия
Orthomyxoviridae	Quarantavirus	Кваранфил	Тюлөк (TLKV)	KJ438647-8	-	+	-	-	Средняя Азия
	Thogotovirus	Дхори	Баткен (BKNV)	KJ396672-4	+	-	-	-	Средняя Азия
Picornaviridae	Cardiovirus	Менго	Сихотэ-Алинь (SAV)	В процессе депонирования	+	-	-	-	юг Дальнего Востока
			лихорадки долины Сырдарьи (SDVfV)	KJ191558	+	-	-	-	Средняя Азия

Примечание: * – описаны впервые в мире.

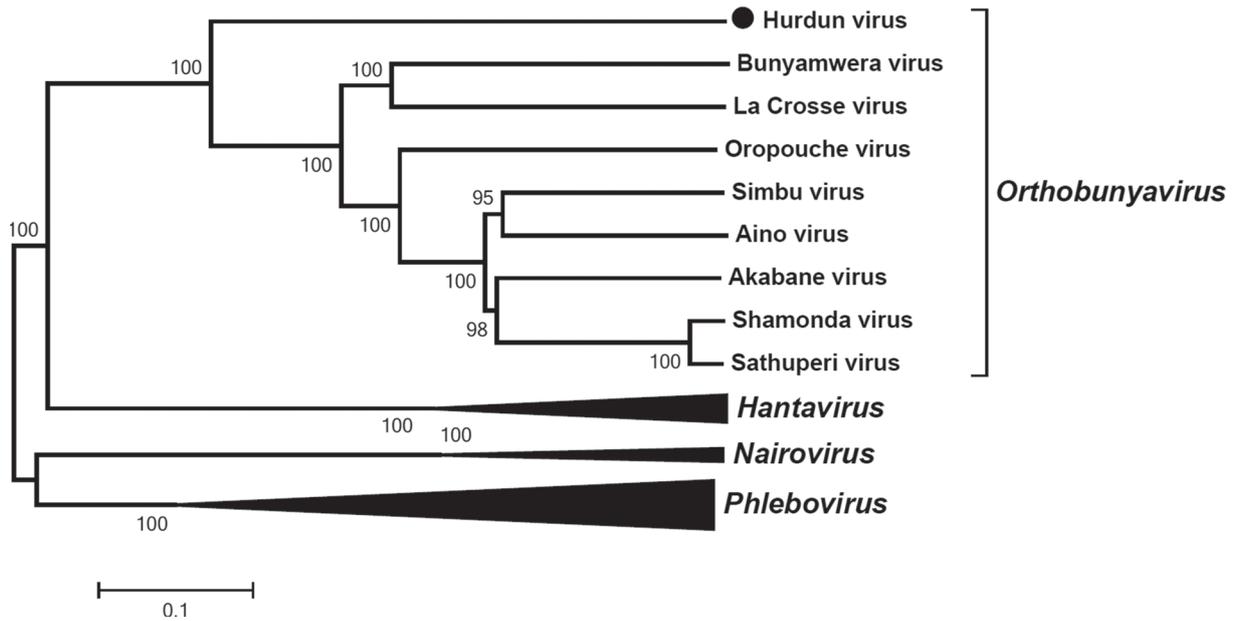


Рис. 1. Дендрограмма, построенная на основе сравнения последовательностей РНК-зависимой РНК-полимеразы представителей рода *Orthobunyavirus* (*Bunyaviridae*)

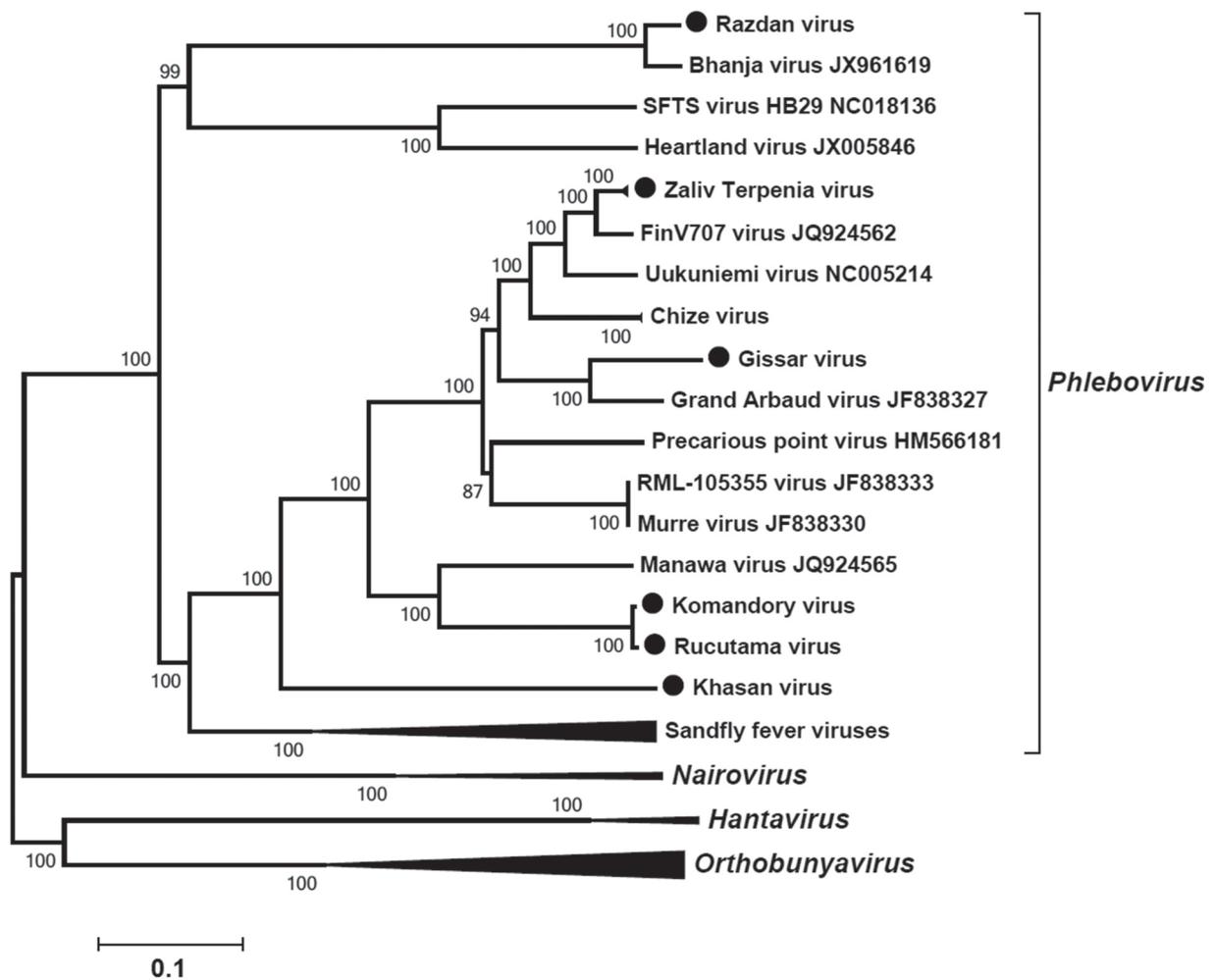


Рис. 2. Дендрограмма, построенная на основе сравнения последовательностей РНК-зависимой РНК-полимеразы представителей рода *Phlebovirus* (*Bunyaviridae*)

заболеваемости Иссyk-Кульской лихорадкой (в том числе – среди воинских контингентов), как правило, связаны с обитанием в жилых помещениях летучих мышей, а заражение вирусом может происходить респираторным, алиментарным или трансмиссивным путями. Основным резервуаром и переносчиком вируса являются рукокрылые (*Chiroptera*), а также их облигатные паразиты – аргасовые клещи комплекса *Argas (Carios) vespertilionis* [45]. L-сегмент ISKV соответствует найровирусам семейства *Bunyaviridae* и ближе всего к изолированному во Франции вирусу Эрве, затем – к Крымской-Конго геморрагической лихорадке. Уровень идентичности белка РНК-зависимой РНК-полимеразы вируса с другими найровирусами составляет в среднем 45%. Уровень сходства М-сегмента с другими найровирусами составляет от 32 до 37%, а структурных оболочечных белков – от 40 до 50%. Наибольшая близость выявлена к вирусам Эрве и ККГЛ. Уровень идентичности S-сегмента с другими найровирусами, в среднем достигает 35%, а белка нуклеокапсида N среди описанных найровирусов – от 56 до 63%. На построенных дендрограммах видно,

что вирус наиболее близко группируется с вирусами рода *Nairovirus*. Структура генома вируса, уровень идентичности белков и результаты филогенетического анализа позволяют отнести вирус Иссyk-Куль к семейству *Bunyaviridae*, роду *Nairovirus*. При этом вирус формирует внешнюю по отношению к другим найровирусам ветвь и является наиболее дивергентным из известных найровирусов (рис. 3) [4].

Вирус Иссyk-Куль экологически связан с мигрирующими рукокрылыми. Его предполагаемый ареал охватывает обширные территории Африки, Австралии и Океании, где распространены аргасовые клещи комплекса *Argas (Carios) vespertilionis*, являющиеся основными переносчиками и – наряду с летучими мышами – природным резервуаром вируса. Это подтверждается выделением в Малайзии и ЮАР антигенно идентичных вирусов.

К найровирусам сем. *Bunyaviridae* относится и вызывающий патологию человека вирус Тамды (TAMV – Tamdy virus), изолированный в Средней Азии и Закавказье [42]. **Вирус формирует отдельную группу** (см. рис. 3, табл. 1), в которую включён и вирус

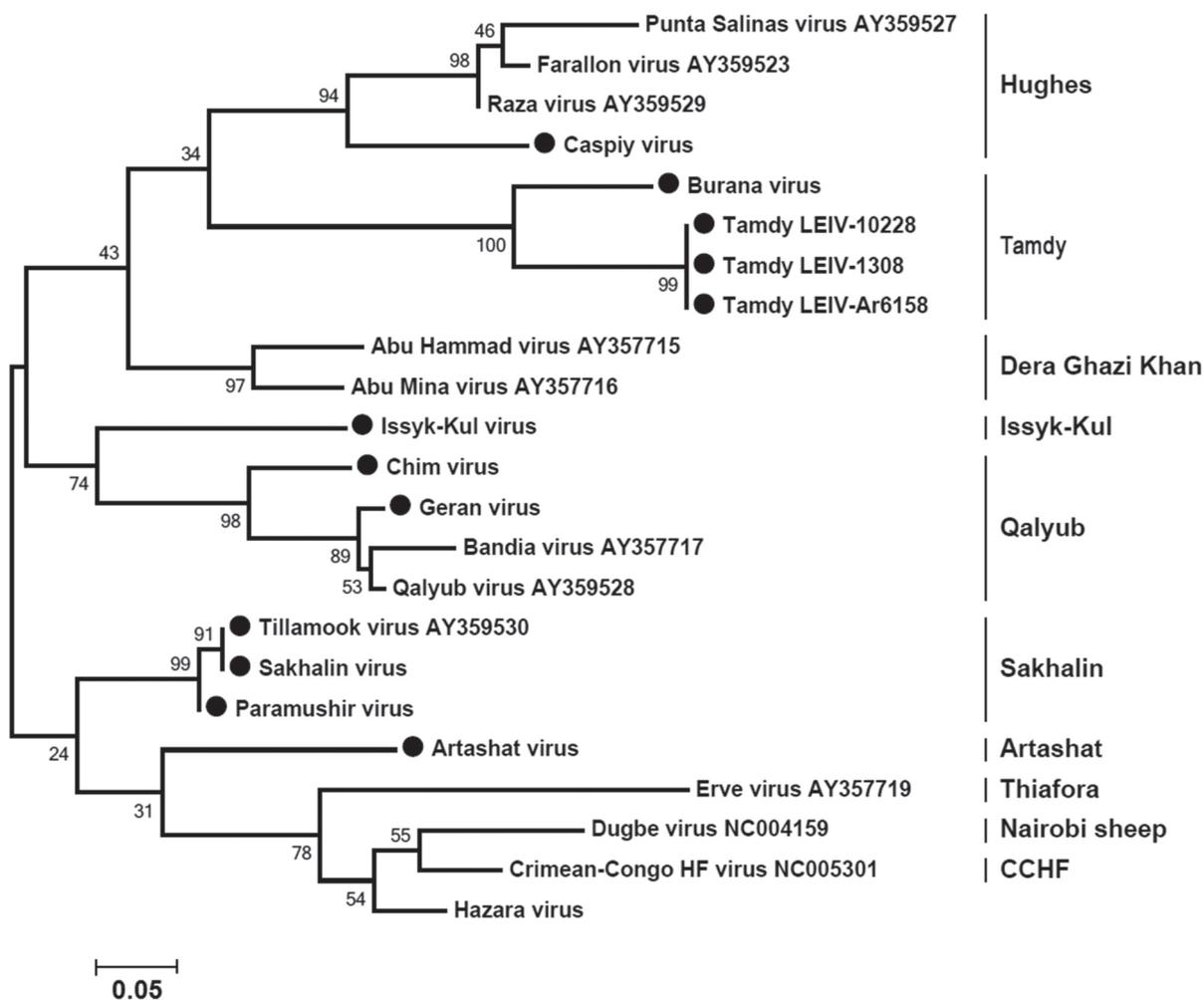


Рис. 3. Дендрограмма, построенная на основе сравнения последовательностей РНК-зависимой РНК-полимеразы представителей рода *Nairovirus* (*Bunyaviridae*)

Бурана (BURV – Burana virus) из Средней Азии. К найровирусам относятся вирусы Узун-Агач (UZUGV – Uzun-Agach virus) из Средней Азии и Арташат (ARTSV – Artashat virus) из Закавказья, формирующий отдельную группу, Сахалин (SAKV – Sakhalin virus) и Парамушир (PMRV – Paramushir virus) из Субарктики (группа Сахалин), а также вирусы Чим (CHIMV – Chim virus) из Средней Азии и Герань (GERAV – Geran virus) из Закавказья, принадлежащие к африканской группе Кальюб.

Вирус Сокулук (SOKV – Sokuluk virus), изолированный в Киргизии от летучих мышей и снятых с них аргасовых клещей [41], отнесён к сем. *Flaviviridae* роду *Flavivirus*. Наибольшая гомология выявлена с африканским вирусом летучих мышей Энтеббе [31]. Эти два вируса формируют группу, близкую к вирусу жёлтой лихорадки в составе ветви комариных фла-

вивирусов (рис. 4). Тесная связь SOKV с убежищами летучих мышей и жильём позволяет рассматривать этот вирус в качестве потенциально опасного для человека.

Род *Flavivirus* включает такие опасные вирусы, как вирус клещевого энцефалита (TBEV – Tick-borne encephalitis virus), жёлтой лихорадки (YFV – Yellow fever virus), денге (DENV – Dengue virus) и др. Ареал нового флавивируса Тюлений (TYUV – Tyuleny virus) охватывает высокие широты Северного и Южного полушарий в бассейнах Тихого и Атлантического океанов [10]. TYUV вызывает патологию у людей [11]. Близкий вирус Мибан изолирован на севере Франции, а вирусы Саумарец-Риф и Гаджетс-Галли – в Южном полушарии (рис. 5), на островах между Австралией и Антарктидой. А вот близкий вирус Кама (KAMV – Kama virus)

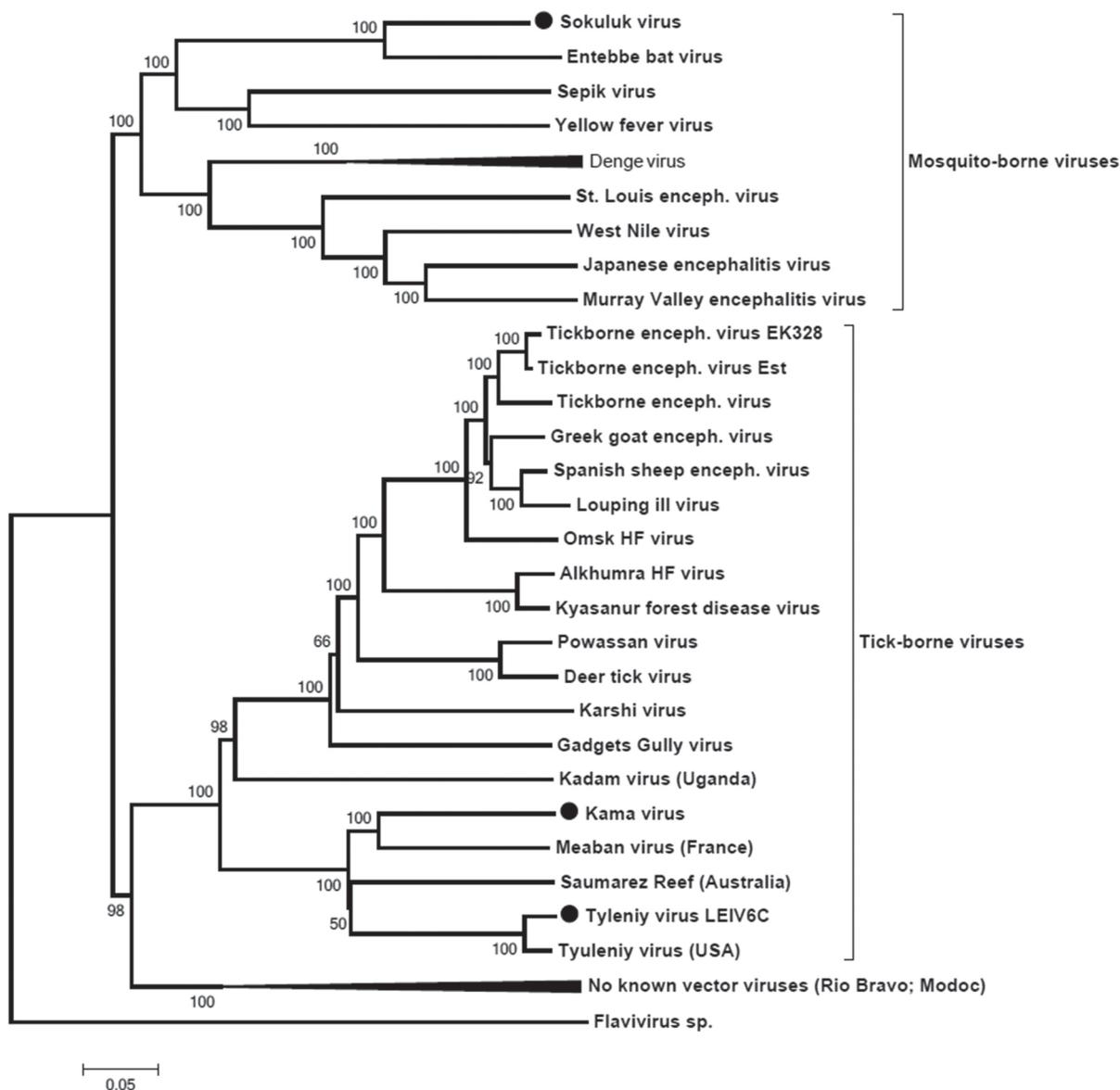


Рис. 4. Дендрограмма, построенная на основе сравнения последовательностей РНК-зависимой РНК-полимеразы представителей рода *Flavivirus* (*Flaviviridae*)

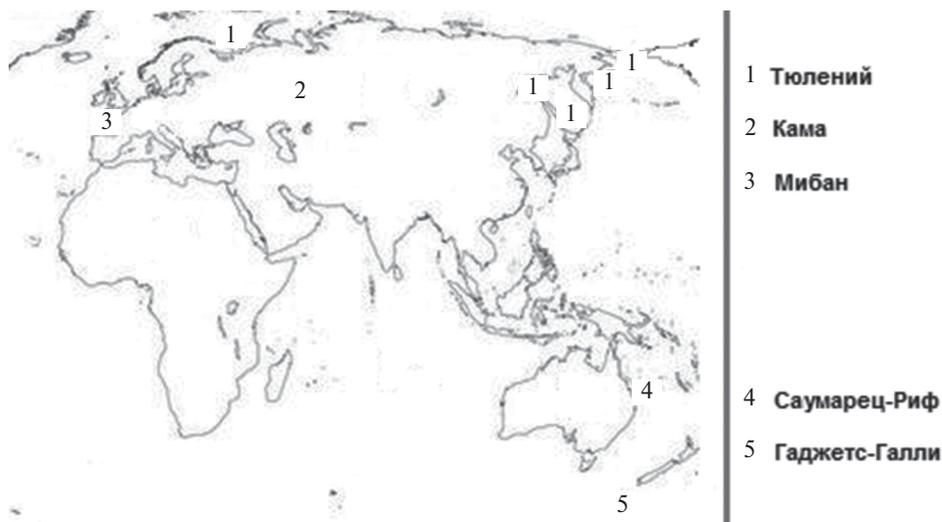


Рис. 5. Ареалы вирусов Тюлений, Кама, Мибан, Саумарец-Риф, Гаджетс-Галли (*Flaviviridae*, *Flavivirus*)

изолирован из клещей на островах Волжско-Камского плёса Куйбышевского водохранилища в Татарстане [15]. KAMV относится к той же филогенетической ветви [29]. Его изоляция в центре Русской равнины свидетельствует о древних связях этих вирусов с искодовыми клещами в Субарктике-Субантарктике и в средней полосе России. KAMV потенциально патогенен для человека.

К флавивирусам отнесён и выделенный в горах Казахстана вирус Алма-Арасан (ALARV – Alma-Arasan virus). Этот вирус близок к вирусу Повассан (POWV – Powassan virus) из комплекса клещевого энцефалита, ареал которого охватывает юг Канады, север США, а у нас – Приморский край [28].

Вирус Баку (BAKV – Vaku virus) был впервые выделен из клещей *Ornithodoros capensis*, собранных в гнездовьях серебристых чаек (*Larus argentatus*) на островах Бакинского архипелага в Каспийском море, а позднее – на островах в заливе Кара-Богаз-Гол в Туркмении и в предгорьях Чаткальского хребта Западного Тянь-Шаня в Узбекистане [12]. Метагеномный анализ позволил отнести этот вирус к сем. *Reoviridae*, роду *Orbivirus*, группе Кемерово [6] (рис. 6).

Там же, в Бакинском архипелаге в Каспийском море, был изолирован вирус Каспий (CASV – Caspiy virus) [13]. Установлена его принадлежность к роду *Nairovirus* сем. *Bunyaviridae* в качестве самостоятельного вида, формирующего отдельную ветвь, наиболее близкую к вирусам групп Хьюз и Сахалин (см. рис. 5), распространённым на шельфовых и островных экосистемах Северной Евразии, а также Северной и Южной Америки [30].

Ареал вирусов Охотский (OKHV – Okhotskiy virus) и Анива (ANIV – Aniva virus) охватывает в высоких широтах шельфовые и островные территории бассейнов Охотского, Берингова и Баренцева морей [40]. Эти вирусы являются самостоятельными видами в составе группы Грейт-Айленд рода *Orbivirus* сем. *Reoviridae*.

Вирус лихорадки долины Сырдарьи (SDVFFV – Syr-

Darya valley fever virus) из Средней Азии как и вирус Сихотэ-Алинь (SAV – Sikhote-Alin) из Приморского края классифицированы в качестве самостоятельных видов рода *Cardiovirus* сем. *Picornaviridae*, а вирус Тюлек (TLKV – Tyulek virus) из Средней Азии входит в группу африканского вируса Кваранфил (QRFV – Quaranfil virus). Вирусы QRFV, TLKV, Озеро Чад (LCV – Lake Chad virus) и Джонстон Атолл (JAV – Johnston Atoll virus) из Новой Зеландии формируют новый род *Quaranjavirus* в составе сем. *Orthomyxoviridae*. В это семейство теперь входят 6 родов: *Influenza A virus*, *Influenza B virus*, *Influenza C virus*, *Thogotovirus* (представители которого вызывают энцефалиты у людей в Астраханской обл.), *Isavirus* (поражают рыб), а теперь – и *Quaranjavirus*.

Ситуация с коронавирусным ближневосточным респираторным синдромом (ББРС) (MERS-CoV – Middle East respiratory syndrome coronavirus) является ещё одним примером **emerging-ситуации**. **Природным резервуаром** этого коронавируса – как и у ISKV – являются летучие мыши [26, 36]. Эти животные служат природным резервуаром и других опасных вирусов – бешенства (*Rhabdoviridae*, *Lyssavirus*) [8], Хендра (HeV – Hendra virus) и Нипах (NiV – Nipah virus) из семейства *Reoviridae* [27], представители родов *Ebolavirus* и *Marburgvirus* из семейства *Filoviridae* [25] и ряда др.

Летучие мыши оказались и первичным природным резервуаром возбудителя коронавирусного тяжёлого острого респираторного синдрома (SARS-CoV – Severe acute respiratory syndrome coronavirus), который, подчас, неправильно называют «атипичной пневмонией». По-русски это название звучит как «коронавирус ТОРС» [26, 36]. От летучих мышей в природе заражаются циветты – разновидность мангуст, которых жители Юго-Восточной Азии держат в качестве домашних животных и часто употребляют в пищу. От них – промежуточных хозяев вируса – и происходит заражение людей, а затем уже при тесном

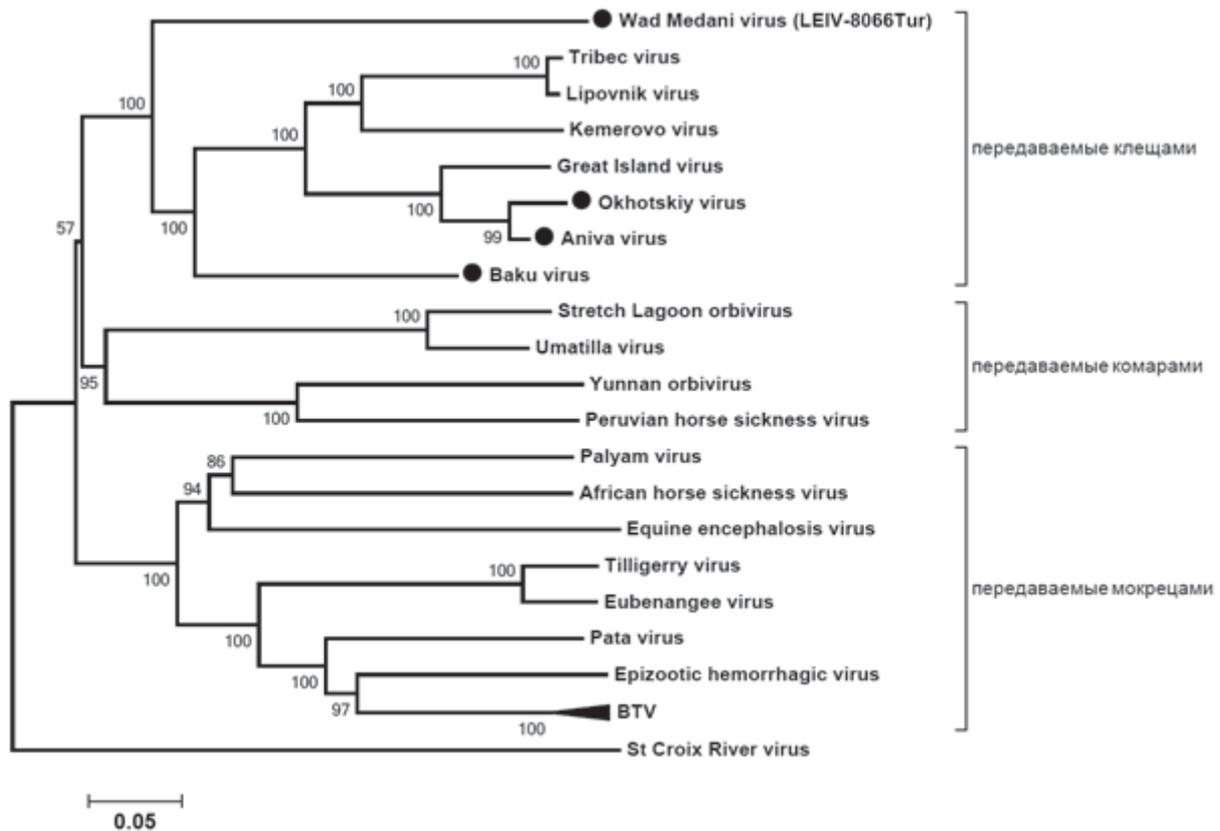


Рис. 6. Дендрограмма, построенная на основе сравнения последовательностей РНК-зависимой РНК-полимеразы представителей рода *Orbivirus* (Reoviridae)

контакте вирус способен к передаче от человека к человеку [26, 36, 37].

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

Первые случаи заболевания БВРС у людей появились в Саудовской Аравии в сентябре 2012 г. Основная заболеваемость наблюдается в восточной части Саудовской Аравии. Завозные случаи заболевания выявлены в других странах Ближнего Востока (в Иордании, Катаре, ОАЭ), северной Африке (в Тунисе), а в Европе – во Франции, Германии, Великобритании и Италии. На 01.01.2014 г. лабораторно подтверждены 114 случаев заболевания, из которых 54 (47%) оказались летальными. Установлена возможность передачи вируса от человека к человеку при тесном контакте (в том числе – и медицинским работникам) [38]. Показано, что в процесс циркуляции БВРС вовлечены верблюды [49].

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

Во-первых, продолжает циркулировать высоковирулентный птичий грипп А (H5N1), убивая 60% заразившихся им людей. В России установлена циркуляция двух генотипов этого вируса: 2.2 – на западе, 2.3.2.1 – на востоке страны (рис. 7) [21, 48].

Высокая летальность людей от первичной вирусной пневмонии объясняется аффинностью вируса к $\alpha 2-3$ -рецепторам, выявленным на поверхности бронхиолярных и альвеолярных клеток с убыванием вверх по респираторному тракту. Поэтому вирус гриппа А (H5N1), вызывая летальную инфекцию, не способен к респираторной передаче (рис. 8) [35].

Во-вторых, появившийся в 2009 г. пандемический вирус гриппа А (H1N1) pdm09 свиного происхождения с самого начала обладал большей вирулентностью по сравнению с сезонным гриппом за счёт двойной рецепторной специфичности $\alpha 2-6$ и $\alpha 2-3$ [18, 20, 34]. **Возрас-**

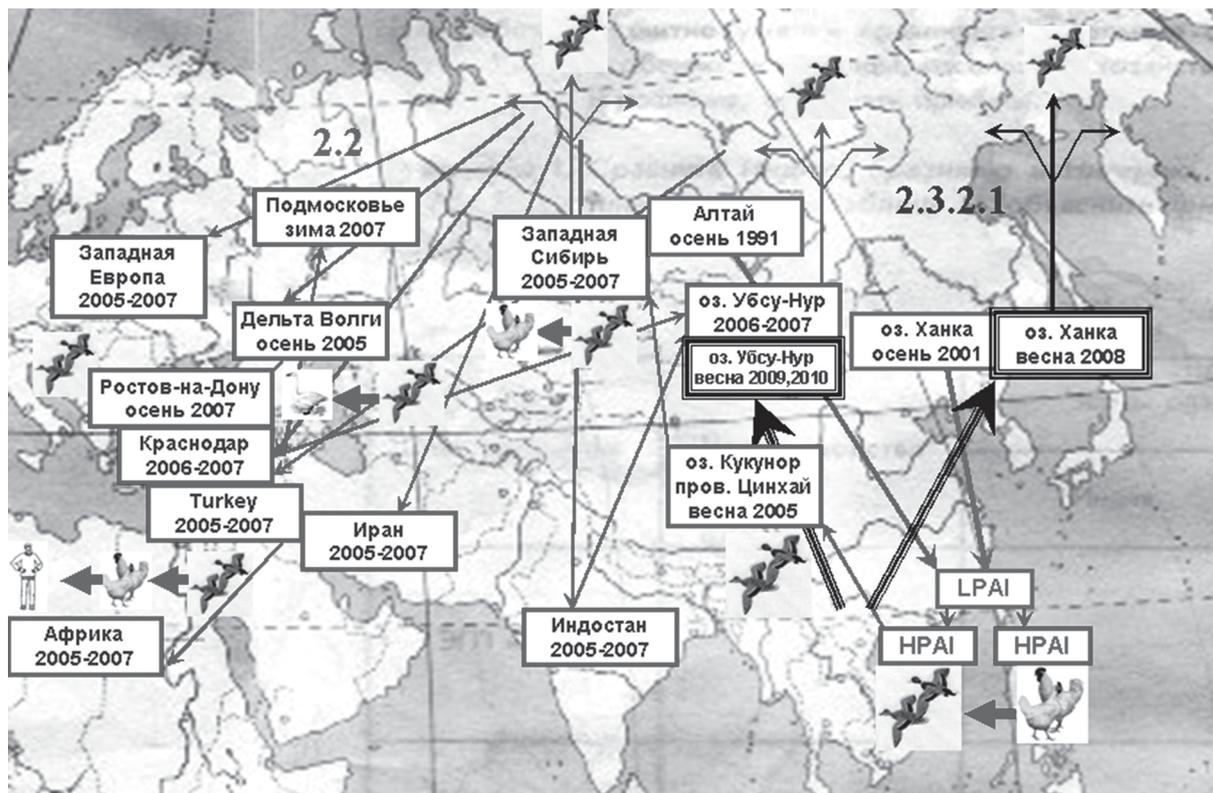


Рис. 7. Последствия проникновения высоковирулентного вируса гриппа А (H5N1) в Северную Евразию весной 2005 г.

тание вирулентности этого вируса, в частности, связано с заменой аспарагиновой кислоты (D) на глицин (G) в 222-й позиции первой субъединицы гемагглютинаина в пределах рецептор-связывающего сайта. Вирус при этом меняет рецепторную специфичность с $\alpha 2-6$ на $\alpha 2-3$ и приобретает способность к поражению нижних отделов респираторного тракта с развитием летальной вирусной пневмонии. Процесс формирования мутантов обычно происходит при отсутствии этиотропной терапии в первые 2-3 дня заболевания [21-23, 35].

Нами [23] разработан метод количественной оценки соотношения рецепторной специфичности $\alpha 2-3$ и $\alpha 2-6$ у выделенных штаммов. Была проведена огромная комплексная работа по изучению свыше 100 штаммов, выделенных от больных и секционного материала за 2 эпидсезона. По своей аффинности штаммы пандемического гриппа занимают нишу между сезонным и птичьим гриппом А (H5N1). Тёмные линии на рисунке 9 – летальные случаи; все они группируются в верхней части диаграммы, где индекс

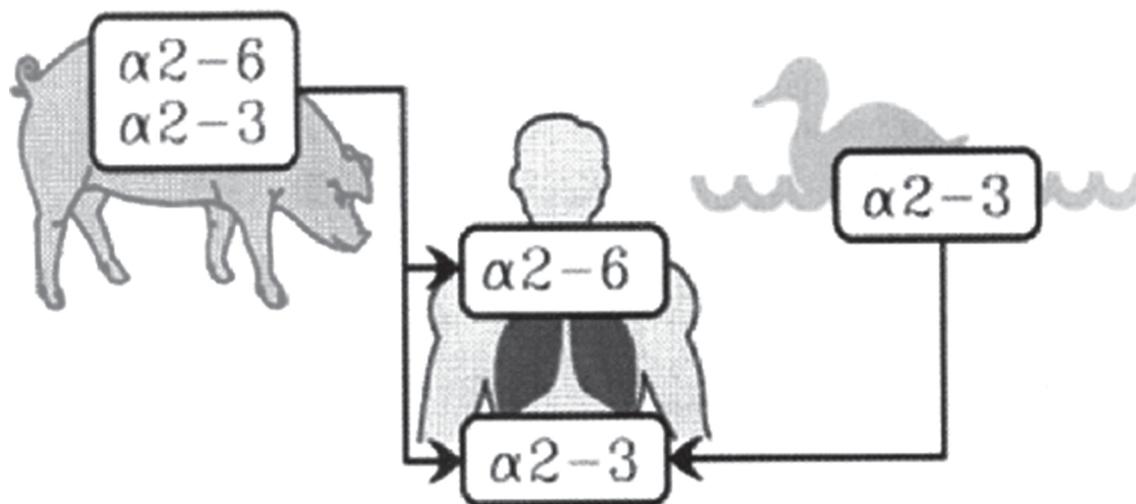


Рис. 8. Рецепторная специфичность вирусов гриппа А, адаптированных к различным хозяевам

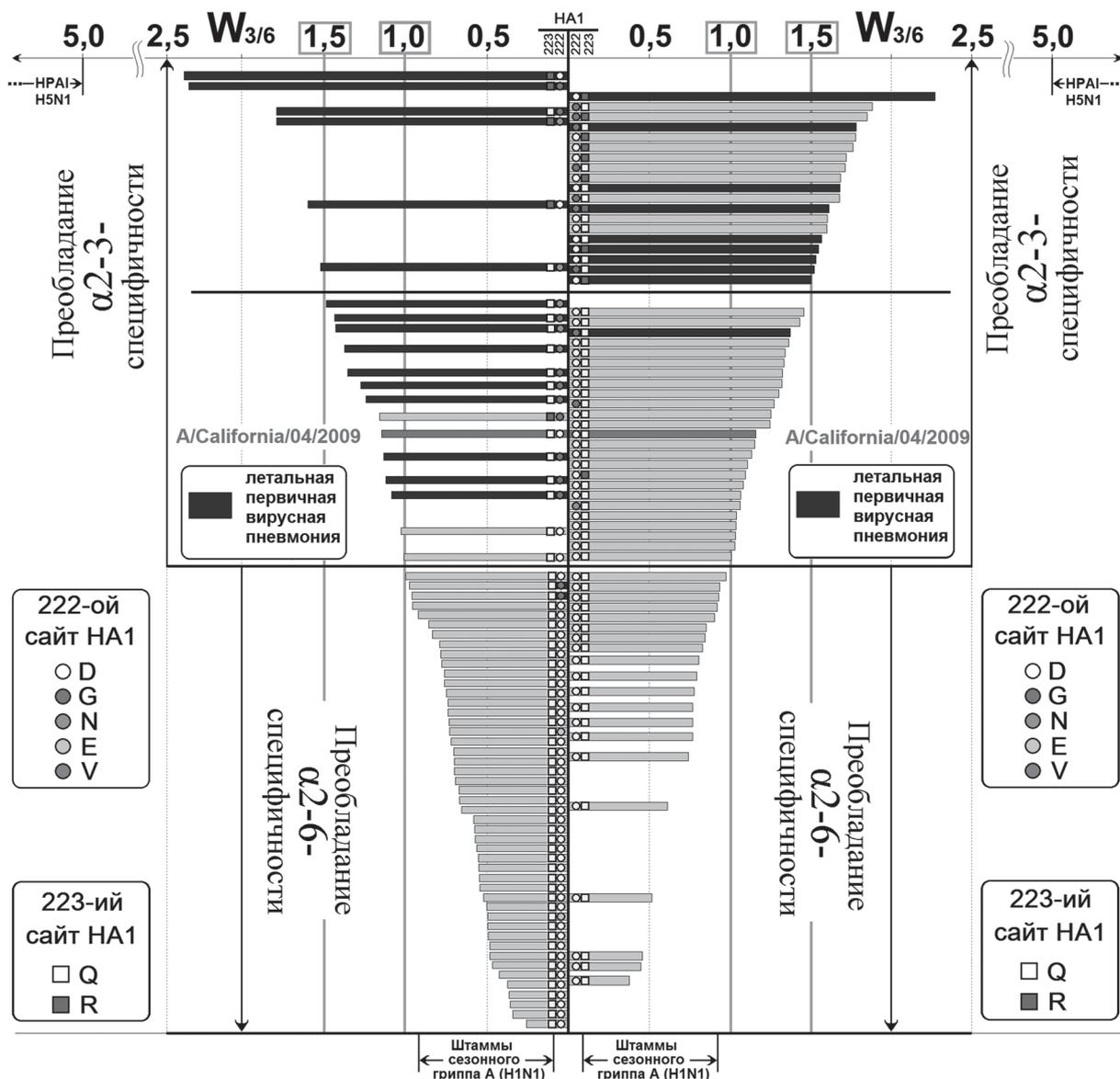


Рис. 9. Выявление аминокислотных замен в позициях 222 и 223 рецептор-связывающего сайта HA1 у штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09, изолированных от пациентов с благоприятным и летальным исходами

$W_{3/6}$ выше единицы. В работе принимали участие клиницисты, вирусологи, генетики и специалисты по вирусным рецепторам. Показано, что как и при птичьим гриппе А (H5N1), мутантные штаммы А (H1N1) вызывают летальность 60%, но пока, к счастью, они не приобрели способности к респираторной передаче (но это зависит лишь от одной аминокислотной замены).

В-третьих, начиная с февраля 2014 г., то есть в начале сезона весенней миграции птиц, в Китае выявлена спорадическая заболеваемость людей, этиологически связанная с вирусом птичьего гриппа А (H7N9). По состоянию на январь 2014 г. лабораторно подтверждены 209 случаев заражения людей с 25% летальностью. Случаи заболевания сначала возникли в районе Шанхая, затем распространились

на провинции Цзянсу и Чжэцзян, а позднее – ещё на 10 восточных провинций, включая Тайвань. Источником подавляющего большинства выявленных случаев заболевания людей гриппом А (H7N9) были инфицированные домашние птицы, которые переносят инфекцию инapparантно. Случаи массовой гибели птиц не отмечены. Выявлены несколько семейных очагов заболевания, но все члены семей могли иметь контакт с птицами. Показана ограниченная способность вируса гриппа А (H7N9) передаваться воздушно-капельным путём от человека к человеку. Повышенный тропизм этого вируса к α2-6-сиалозидам также определяет такую возможность.

Результаты анализа генома штаммов вируса гриппа А (H7N9) показали, что этот вирус появился в результате реассортации: сегменты гемагглютини-

на (H7) и NA (N9) получены от вирусов гриппа А диких птиц водно-околоводного комплекса, а сегменты PB2, PB1, PA, NP, M и NS – от вируса гриппа А птиц подтипа H9N2 [50]. Вероятнее всего, реассортация произошла во время весенней миграции, когда происходит чрезвычайно интенсивные популяционные взаимодействия диких птиц водно-околоводного комплекса. По нашим оценкам, местом возникновения реассортанта могло стать оз. Тайху на границе провинций Чжэцзян, Цзянсу и Шанхай, которое представляет собой один из крупнейших хабов миграционных потоков диких птиц. Сохраняется вероятность заноса вируса гриппа А (H7N9) на территорию России дикими птицами вдоль Дальневосточно-Притихоокеанского миграционного русла (на Дальний Восток) и вдоль Джунгарского миграционного русла (в Западную Сибирь).

Данные анализа генома штаммов вируса гриппа А (H7N9), представленные в международной базе данных GenBank, позволяют сделать следующие выводы: 1) сайт протеолитического нарезания гемагглютинаина соответствует слабовирулентным штаммам вируса гриппа А (что согласуется с отсутствием массовой гибели птиц); 2) структура рецептор-связывающего сайта указывает на повышенный тропизм к α 2-6-сиалозидам (что объясняет контагиозность вируса для человека и предполагает возможность передачи от человека к человеку воздушно-капельным путём);

3) в субъединице PB2 полимеразного комплекса имеется замена в 627-м сайте глутаминовой кислоты на лизин, а молекула NA имеет делецию (длиной 5 аминокислотных остатков, что является маркером повышенного тропизма к клеткам млекопитающих); 4) в молекуле каналобразующего белка M2 имеется замена в 31-м сайте серина на аспарагин, которая определяет резистентность вируса к химиопрепаратам адамантанового ряда – в частности, римантадину и амантадину; 5) NA некоторых штаммов (например, A/Shanghai/1/2013 (H7N9)) содержит мутацию R294K, которая известна как маркер устойчивости к ингибиторам NA – осельтамивиру и занамивиру – для N2 и N9; однако штаммы с такими мутациями сохраняли чувствительность к осельтамивиру, что, по-видимому, объясняется наличием смеси вирусных вариантов в составе штамма [50].

Результаты прямых экспериментов *in vitro* с использованием штамма A/Anhui/1/2013 (H7N9) показали, что новый вирус резистентен к римантадину и чувствителен к осельтамивиру, рибавирину (виразолу), ингавирину и арбидолу. Установлено, что для этого варианта гриппа А (H7N9) коэффициент рецепторной специфичности $W_{3/6} = 1,324$ (рис. 10), что сближает его с пандемическими штаммами и указывает на его высокий эпидемический потенциал в отличие от других штаммов вируса гриппа А (H7).

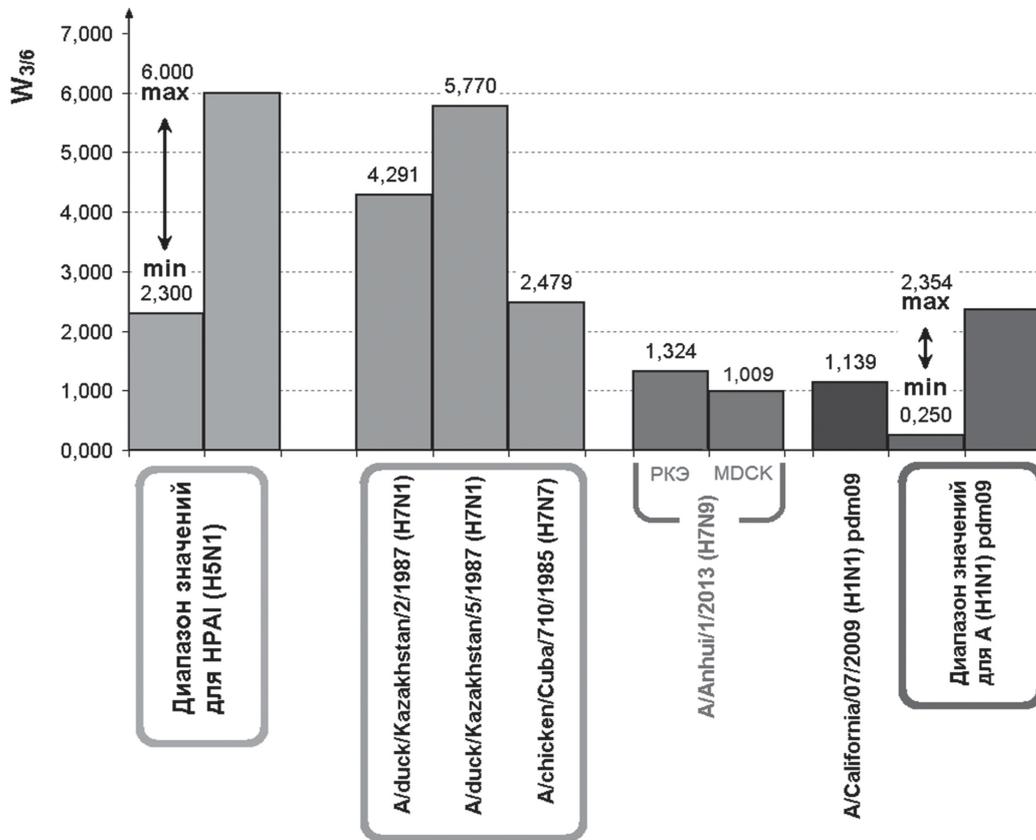


Рис. 10. Рецепторная специфичность штамма A/Anhui/1/2013 (H7N9)

Заключение. Полученные данные, помимо решения фундаментальных задач, связанных с описанием генетического разнообразия и таксономии вирусов животных, могут быть использованы для разработки молекулярно-генетических методов детекции вируса – полимеразной цепной реакции (ПЦР) и ПЦР в реальном времени – для мониторинга и диагностики инфекций на эндемичных территориях, а также в качестве модели для решения подобных задач с другими неизвестными возбудителями.

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

Литература

1. Альховский, С.В. Метагеномный подход – полногеномное секвенирование / С.В. Альховский // Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. – М.: МИА, 2013. – С. 476–479.
2. Альховский, С.В. Вирус Хурдун (KHURV): новый вирус рода Orthobunyaviridae (Bunyaviridae) / С.В. Альховский [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2013. – Т. 58. – № 4. – С. 10–13.
3. Альховский, С.В. Молекулярно-генетическая характеристика вирусов Бханджа (BHAV) и Раздан (RAZV) (Bunyaviridae, Phlebovirus), изолированных от иксодовых клещей *Rhipicephalus bursa* Canestrini et Fanzago, 1878 и *Dermacentor marginatus* Sulzer, 1776 в Закавказье / С.В. Альховский [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2013. – Т. 58. – № 4. – С. 14–19.
4. Альховский, С.В. Таксономия вируса Иссык-Куль (Issyk-Kul, ISKV; Bunyaviridae, Nairovirus), возбудителя Иссык-Кульской лихорадки, изолированного от летучих мышей (Vespertilionidae) и клещей *Argas (Carios) vespertilionis* Latreille, 1796 / С.В. Альховский [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2013. – Т. 58. – № 5. – С. 11–15.
5. Альховский, С.В. Таксономия вируса Хасан (Khasan, KHAV) – нового вируса рода Phlebovirus (сем. Bunyaviridae), изолированного из клещей *Haemaphysalis longicornis* Neumann, 1901 в Приморском крае, Россия / С.В. Альховский [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2013. – Т. 58. – № 5. – С. 15–18.
6. Альховский, С.В. Таксономия вируса Баку (Baku virus, BAKV, Reoviridae, Orbivirus), изолированного от облигатных паразитов птиц – аргасовых клещей (Acari: Argasidae) в Азербайджане, Туркменистане и Узбекистане / С.В. Альховский [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2013. – Т. 58. – № 6. – С. 22–26.
7. Галкина, И.В. Вирус Хурдун (Khurdun), предположительно новый РНК-содержащий вирус, связанный с лысухами (*Fulica atra*), изолированный в дельте Волги / И.В. Галкина [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2005. – Т. 50. – № 4. – С. 29–31.
8. Грибенча, С.В. Рабдовирусы (Rhabdoviridae) / С.В. Грибенча, Д.К. Львов, М.Ю. Щелканов // Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. – М.: МИА, 2013. – С. 197–202.
9. Забережный, А.Д. Африканская чума свиней / А.Д. Забережный [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2012. – Т. 57. – № 5. – С. 4–10.
10. Львов, Д.К. Изоляция арбовирусов от клещей *Ixodes (Ceraticodes) putus* Pick. 1878, собранных в колонии птиц на о. Тюлений, Охотское море / Д.К. Львов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 1970. – Т. 15. – № 4. – С. 440–444.
11. Львов, Д.К. Вирус Тюлений: предположительно новый арбовирус из группы В / Д.К. Львов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 1971. – Т. 16. – № 2. – С. 180–184.
12. Львов, Д.К. Выделение нового арбовируса Баку группы Кемерово из аргасовых клещей *Oraithodoros capensis* в Азербайджане / Д.К. Львов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 1971. – Т. 16. – № 4. – С. 434–437.
13. Львов, Д.К. Предварительные данные по изоляции трёх новых арбовирусов на Кавказе и в Средней Азии / Д.К. Львов [и др.] // Экология вирусов. – М.: АМН СССР, 1974. – Вып. 2. – С. 80–81.
14. Львов, Д.К. Организация эколого-эпидемиологического мониторинга территории Российской Федерации с целью противоэпидемической защиты населения и войск. Методические рекомендации / Д.К. Львов [и др.]. – М.: МЗ РФ, Федеральное Управление медико-биологических и экстремальных проблем, НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, 1993. – 128 с.
15. Львов, Д.К. Новый вирус Кама (Flaviviridae, Flavivirus, антигенная группа Тюлений), изолированный из клещей *Ixodes lividus* / Д.К. Львов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 1998. – Т. 43. – № 2. – С. 71–74.
16. Львов, Д.К. Атлас распространения возбудителей природно-очаговых вирусных инфекций на территории Российской Федерации / Д.К. Львов [и др.]. – М.: МЗ РФ, 2001. – 192 с.
17. Львов, Д.К. Натуральная оспа – дремлющий вулкан / Д.К. Львов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2008. – Т. 53. – № 4. – С. 4–8.
18. Львов, Д.К. Изоляция 24.05.2009 и депонирование в Государственную коллекцию вирусов (ГКВ N 2452 от 24.05.2009) первого штамма A/Moscow/01/2009 (H1N1) sw1, подобного свиному вирусу А (H1N1) от первого выявленного 21.05.2009 больного в г. Москве / Д.К. Львов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2009. – Т. 54. – № 6. – С. 10–14.
19. Львов, Д.К. Грипп и другие новые и возвращающиеся инфекции Северной Евразии. Глобальные последствия / Д.К. Львов // Федеральный справочник. Здравоохранения России. – 2010. – Вып. 11. – С. 209–220.
20. Львов, Д.К. Распространение нового пандемического вируса гриппа А (H1N1) v в России / Д.К. Львов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2010. – Т. 55. – № 3. – С. 4–9.
21. Львов, Д.К. Обнаружение аминокислотных замен аспарагиновой кислоты на глицин и глутаминовую кислоту в рецептор-связывающем сайте гемагглютинаина в штамме пандемического вируса гриппа H1N1 от больных с летальным исходом и со средне-тяжелой формой заболевания / Д.К. Львов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2010. – Т. 55. – № 3. – С. 15–18.
22. Львов, Д.К. Возможная связь летальной пневмонии с мутациями пандемического вируса гриппа А / H1N1 sw1 в рецептор-связывающем сайте субъединицы HA1 гемагглютинаина / Д.К. Львов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2010. – Т. 55. – № 4. – С. 4–9.
23. Львов, Д.К. Корреляция между рецепторной специфичностью штаммов пандемического вируса гриппа А (H1N1) pdm09, изолированных в 2009–2011 гг., структурой рецептор-связывающего сайта и вероятностью развития летальной первичной вирусной пневмонии / Д.К. Львов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2012. – Т. 57. – № 1. – С. 14–20.
24. Львов, Д.К. Экология вирусов / Д.К. Львов // Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. – М.: МИА, 2013. – С. 68–86.
25. Львов, Д.К. Филовирусы (Filoviridae) / Д.К. Львов, М.Ю. Щелканов // Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. – М.: МИА, 2013. – С. 202–205.
26. Львов, Д.К. Коронавирусы (Coronaviridae) / Д.К. Львов, М.Ю. Щелканов // Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. – М.: МИА, 2013. – С. 211–218.
27. Львов, Д.К. Реовирусы (Reoviridae) / Д.К. Львов [и др.] // Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. – М.: МИА, 2013. – С. 315–324.
28. Львов, Д.К. Флавивирусы (Flaviviridae) / Д.К. Львов, П.Г. Дерябин, С.В. Альховский // Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. – М.: МИА, 2013. – С. 340–346.
29. Львов, Д.К. Генетическая характеристика вирусов из антигенного комплекса Тюлений (Flaviviridae, Flavivirus): Тюлений (TYUV – Tyuleny virus), изолированного из об-

- лигатных эктопаразитов колониальных птиц – клещей Ixodes (Ceratiixodes) uriae White, 1852, собранных в высоких широтах Северной Евразии, – и Кама (KAMV – Kama virus), изолированного из клещей Ixodes lividus Roch, 1844, собранных в норových колониях птиц в средней части Русской равнины / Д.К. Львов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2014. – Т. 59. – № 1. – С. 18–24.
30. Львов, Д.К. Генетическая характеристика вируса Каспий (CASV – Caspiu virus) (Bunyaviridae, Nairovirus), изолированного от чайковых (Laridae Vigors, 1825) и крачковых (Sternidae Bonaparte, 1838) птиц и аргасовых клещей Ornithodoros capensis Neumann, 1901 (Argasidae Koch, 1844) на западном и восточном побережьях Каспийского моря / Д.К. Львов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2014. – Т. 59. – № 1. – С. 24–29.
31. Львов, Д.К. Таксономия вируса Сокулук (SOKV – Sokuluk virus) (Flaviviridae, Flavivirus, антигенный комплекс летучих мышей Энтеббе), изолированного в Киргизии от летучих мышей нетопырей-карликов (Vespertilio pipistrellus Schreber, 1774), аргасовых клещей (Argasidae Koch, 1844) и птиц / Д.К. Львов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2014. – Т. 59. – № 1. – С. 30–34.
32. Орлянкин, Б.Т. Болезнь Шмалленберг / Б.Т. Орлянкин [и др.] // Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных. – М.: МИА, 2013. – С. 877–878.
33. Щелканов, М.Ю. Роль эколога-вирусологического районирования в прогнозировании влияния климатических изменений на ареалы арбовирусов / М.Ю. Щелканов, В.Л. Громашевский, Д.К. Львов // Вестник РАМН. – 2006. – № 2. – С. 22–25.
34. Щелканов, М.Ю. Динамика распространения пандемического гриппа А / H1N1 sw1 на Дальнем Востоке в 2009 г. / М.Ю. Щелканов [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2010. – Т. 55. – № 3. – С. 10–15.
35. Щелканов, М.Ю. Грипп: история, клиника, патогенез / М.Ю. Щелканов, Л.В. Колобухина, Д.К. Львов // Лечащий врач. – 2011. – № 10. – С. 33–38.
36. Щелканов, М.Ю. Коронавирусы человека (Nidovirales, Coronaviridae): возросший уровень эпидемической опасности / М.Ю. Щелканов, Л.В. Колобухина, Д.К. Львов // Лечащий врач. – 2013. – № 10. – С. 49–54.
37. Bolles, M. SARS-CoV and emergent coronaviruses: viral determinants of interspecies transmission / M. Bolles, E. Donaldson, R. Baric // Curr. Opin. Virol. – 2011. – Vol. 1. – № 6. – P. 624–634.
38. Lim, P.L. Middle East Respiratory Syndrome coronavirus (MERS CoV): Update 2013 / P.L. Lim, T.H. Lee, E.K. Rowe // Curr. Infect. Dis. Rep. – 2013. – Vol. 15. – № 4. – P. 295–298.
39. Lvov, D.K. «Issyk-Kul» virus, a new arbovirus isolated from bats and Argas (Carios) vespertilionis (Latr., 1802) in the Kirghiz S.S.R. Brief report / D.K. Lvov [et al.] // Arch. Gesamte Virusforsch. – 1973. – Vol. 42. – № 2. – P. 207–209.
40. Lvov, D.K. «Okhotskiy» virus, a new arbovirus of the Kemerovo group isolated from Ixodes (Ceratiixodes) putus Pick.-Camb. 1878 in the Far East / D.K. Lvov [et al.] // Arch. Gesamte Virusforsch. – 1973. – Vol. 42. – № 3. – P. 160–164.
41. Lvov, D.K. «Sokuluk» virus, a new group B arbovirus isolated from Vespertilio pipistrellus Schreber, 1775, bat in the Kirghiz S.S.R. / D.K. Lvov [et al.] // Arch. Gesamte Virusforsch. – 1973. – Vol. 42. – № 3. – P. 170–174.
42. Lvov, D.K. Virus «Tamdy» – a new arbovirus, isolated in the Uzbek S.S.R. and Turkmen S.S.R. from ticks Hyalomma asiaticum asiaticum Schulze et Schlotzke, 1929, and Hyalomma plumbeum plumbeum Panzer, 1796 / D.K. Lvov [et al.] // Arch. Virol. – 1976. – Vol. 51. – № 1–2. – P. 15–21.
43. Lvov, D.K. Khasan virus, a new ungrouped bunyavirus isolated from Haemaphysalis longicornis ticks in the Primorie region / D.K. Lvov [et al.] // Acta Virol. – 1978. – Vol. 22. – № 3. – P. 249–252.
44. Lvov, D.K. Razdan virus, a new ungrouped bunyavirus isolated from Dermacentor marginatus ticks in Armenia / D.K. Lvov [et al.] // Acta Virol. – 1978. – Vol. 22. – № 6. – P. 506–508.
45. Lvov, D.K. Issyk-Kul virus disease / D.K. Lvov // The Arboviruses: ecology and epidemiology. Ed.: T.P. Monath. – Boca Raton: CRS press, 1988. – P. 53–62.
46. Lvov, D.K. Ecological sounding of the USSR territory for natural foci of arboviruses / D.K. Lvov // Sov. Med. Rev. Ser. E: Virology Reviews. USA: Harwood Ac. Publ. GmbH, 1993. – № 5. – P. 1–47.
47. Lvov, D.K. Arboviral zoonoses of Northern Eurasia (Eastern Europe and the Commonwealth of Independent States) / D.K. Lvov // Handbook of zoonoses. Ed.: G.W. Beran. Section B: Viral. Boca Raton–London–Tokyo: CRC Press, 1994. – P. 237–260.
48. Lvov, D.K. Evolution of HPAI H5N1 virus in Natural ecosystems of Northern Eurasia (2005–2008) / D.K. Lvov [et al.] // Avian Dis. – 2010. – Vol. 54. – P. 483–495.
49. Reusken, C.B. Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study / C.B. Reusken [et al.] // Lancet Infect. Dis. – 2013; doi: pii: S. 1473–3099 (13). – S. 70164–70166.
50. Watanabe, T. Characterization of H7N9 influenza A viruses isolated from humans / T. Watanabe [et al.] // Nature. – 2013; doi: 10.1038 / nature. – P. 12392.

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

Application of modern molecular-biological techniques for provision of biological safety

Abstract. Principles of application of modern molecular-biological techniques for the revelation of virus circulation peculiarities in the interests of state biosafety are described. Among examples, which not only illustrate those principles, but could be the models for the solution of biosafety security problems significant attention is devoted to the results of ecologo-virological monitoring of Northern Eurasia (1969–1989) (Khurdun, Razdan, Bhanja, Gissar, Khasan, Issyk-Kul, Tamdy, Burana, Uzun-Agach, Artashat, Sakhalin, Paramushir, Chim, Geran, Sokuluk, Tyuleniy, Kama, Alma-Arasan, Baku, Caspiy, Okhotskiy, Aniva, Komandory, Zaliv Terpeniya, Syr-Darya valley fever, Sikhote-Alin, Tyulek) in the context of modern molecular-genetic approaches, analysis of distribution of severe acute respiratory syndrome virus (SARS), Middle-East respiratory syndrome virus (MERS), avian influenza A (H5N1) virus, avian influenza A (H7N9) virus, and pandemic influenza A (H1N1) pdm09 virus. Thus, the data obtained, in addition to solving the fundamental problems related to the description of genetic diversity and taxonomy of viruses in animals can be used for the development of molecular genetic methods for detecting virus – polymerase chain reaction polymerase chain reaction in real time – for monitoring and diagnostics of infections endemic areas, as well as a model for solving similar problems with other unknown pathogens.

Key words: biological safety, metagenomic analysis, Bunyaviridae, Orthobunyavirus, Phlebovirus, Nairovirus, birds, Ixodidae, Argasidae, bats.

Контактный телефон: 8-903-268-90-95; e-mail: dk_lvov@mail.ru