Министерство образования и науки Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Оренбургский государственный университет»

ОБЩАЯ ВИРУСОЛОГИЯ С ОСНОВАМИ ТАКСОНОМИИ ВИРУСОВ ПОЗВОНОЧНЫХ

Рекомендовано Ученым советом федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Оренбургский государственный университет» в качестве учебного пособия для студентов, обучающихся по программам высшего профессионального образования по направлениям подготовки 020400.62 Биология и 020400.68 Биология

Оренбург
2012

УДК 578 (075.8)
ББК 28.3я7 + 52.63я7
О 28

Рецензент – кандидат биологических наук Г. П. Алёхина
Авторы: А. Н. Сизенцов, А. О. Плотников, Е. А. Дроздова, Е. С. Алешина, И. В. Грязева

О 28 Общая вирусология с основами таксономии вирусов позвоночных : учебное пособие / А. Н. Сизенцов, А. О. Плотников, Е. А. Дроздова, Е.С. Алешина, И.В. Грязева; Оренбургский гос. ун-т – Оренбург : ОГУ, 2012. – 624 с.

Учебник представляет собой систематизированное изложение общей вирусологии, методов диагностики вирусных инфекций и таксономии вирусов позвоночных, что соответствует пунктам профессиональной компетентности ПК-1 (демонстрирует базовые представления о разнообразии биологических объектов, понимание значения биоразнообразия для устойчивости биосферы) и ПК-2 (использует методы наблюдения, описания, идентификации, классификации, культивирования биологических объектов) федерального образовательного стандарта высшего профессионального образования по направлению подготовки 020400 – Биология (степень – «Бакалавр», «Магистр»).

В учебнике представлены общие сведения о истории вирусологии, химмическом составе генетике репродукции вирусов, выделении и очистки вирусных препаратов, методах диагностики вирусных инфекций, таксономии вирусов позвоночных.

Учебник рекомендован для студентов медицинских и биологических специальностей при изучении дисциплин: вирусология, диагностика вирусных инфекций, частная вирусология, таксономия вирусов, а так же может быть использовано в качестве основной литературы при написании курсовой работы по дисциплине вирусология и в качестве справочного материала при выполнении экспериментальной части дипломного проекта.

УДК 578 (075.8)
ББК 28.3я7 + 52.63я7

© Сизенцов А.Н.,
Плотников А.О.,
Дроздова Е.А.,
Алешина Е.С.,
Грязева И.В., 2012
© ОГУ, 2012

Содержание

Введение ……..……9
Обозначения и сокращения ……..……..……10
1 История вирусологии, природа и происхождение вирусов ……...……14
1.1 Открытие вирусов ……14
1.2 Этапы развития вирусологии ……..……21
1.3 Развитие концепции о природе вирусов ……27
1.4 Происхождение вирусов ……..……28
2 Химический состав вирусов ……..……..30
3 Морфология, морфогенез, биофизические свойства и генетика вирусов …….35
3.1 Архитектура вирионов ……35
3.2 Морфогенез вирусов ……..……40
3.3 Биофизические свойства вирусов ……..……42
3.4 Устойчивость вирусов в окружающей среде ……..……43
3.5 Классификация вирусов ……..……44
3.6. Характеристика геномов вирусов ……..……46
3.6.1 Особенности организации нуклеиновых кислот вирусов ……..……47
3.6.2 Хранение генетической информации. Способы увеличения информационной емкости вирусного генома ……56
3.7 Реализация генетической информации у вирусов ……59
3.7.1 Репликация ……..……62
3.7.1.1 Основные принципы и механизмы репликации у вирусов ……..……62
3.7.1.2 Основные принципы и механизмы репликации РНК-геномов ……..……66
3.7.1.3 Основные принципы и механизмы репликации ДНК-геномов вирусов……77
3.7.2 Транскрипция ……..……91
3.7.2.1 Основные принципы и механизмы транскрипции у вирусов ……..……92
3.7.2.2 Особенности транскрипции РНК-геномов вирусов ……..……93
3.7.2.3 Особенности транскрипции ДНК-геномов вирусов ……..……97
3.7.2.4 Регуляция транскрипции ……..……101

3.7.3 Трансляция ……105
4 Репродукция вирусов ……..112
4.1 Адсорбция ……113
4.2 Проникновение вирусов в клетку ……..116
4.3 Раздевание ……..……..120
4.4 Транскрипция ……..……121
4.5 Трансляция ……..……126
4.6 Репликация ……135
4.7 Сборка вирусных частиц ……..……140
4.8 Выход вирусных частиц из клетки ……..……..144
5 Основные процессы, контролирующие наследственность и изменчивость вирусов ..……..145
5.1 Генетические и негенетические взаимодействия между вирусами ……147
6 Классификация и патогенез вирусных инфекций ……..….151
6.1 Кассификация вирусных инфекций на клеточном уровне …….……...151
6.2 Цитопатология зараженной вирусом клетки …….……156
6.3 Классификация вирусных инфекций на уровне организма ……160
6.4 Патогенез вирусных инфекций ……..……163
6.4.1 Пути проникновения вируса в организм ……..……..164
6.4.2 Распространение вирусов в организме ……..……166
6.5 Группы вирусов, вызывающих массовые инфекции ……..……167
7 Противовирусный иммунитет ……..……169
7.1 Формирование противовирусного иммунитета ……..……173
7.2 Эпидемиология вирусных инфекций ……..……...180
7.3 Иммунопрофилактика вирусных инфекций ……..……..183
8 Бактериофаги ……..……187
8.1 История бактериофагов ……..……188
8.2 Морфология бактериофагов …….……189
8.3 Химический состав фагов ……..……194
8.4 Антигенные свойства фагов ……..……195

8.5 Размножение фагов ……195
8.6 Видовая и штаммовая специфичность бактериофагов ……200
8.7 Введение фаговой нуклеиновой кислоты в бактериальную клетку ……201
8.8 Типы взаимодействия фагов с бактериями ……203
8.9 Фаговые векторы ……210
8.10 Лечебные препараты бактериофагов ……211
9 Прионы ……212
9.1 Прионы – новый класс возбудителей инфекций ……213
9.2 Классификация прионных болезней ……216
9.3 Генетика прионных болезней ……216
9.4 Морфология прионов ……218
9.5 Изоформы прионов ……224
9.6 Прионы и видовой барьер ……225
9.7 Устойчивость прионов ……226
10 Принципы и методы диагностики вирусных инфекций ……228
10.1 Экспресс-методы диагностики вирусных инфекций ……229
10.1.1 Микроскопические методы ……229
10.1.2 Иммунологические методы ……230
10.1.2.1 Реакция иммунофлюоресценции ……231
10.1.2.2 Иммунная электронная микроскопия ……234
10.1.2.3 Встречный иммуноэлектрофорез ……237
10.1.2.4 Реакция гемадсорбции на твердой основе ……238
10.1.2.5 Метод ИФА с использованием индикаторных полосок ……238
10.1.3 Молекулярно-генетические методы ……239
10.2 Вирусологический метод ……251
10.2.1 Работа с клеточными культурами ……252
10.2.2 Инфицирование живых систем вируссодержащим материалом ……260
10.2.2.1 Культуры клеток ……260
10.2.2.2 Куриные эмбрионы ……261
10.3 Биологический метод ……266

10.3.1 Выявление (индикация) вирусов ……..…….269
10.3.1.1 Выявление по цитопатическому действию (ЦПД) ……..……..271
10.3.1.2 Выявление по реакции гемадсорбции (РГАд) …….…….274
10.3.1.3 Непосредственное выявление вирусных частиц …….…….276
10.3.1.4 Обнаружение вируса в куриных эмбрионах …….……277
10.3.2 Обнаружение вирусов в организме лабораторных животных ……..…….280
10.3.2.1 Идентификация выделенных вирусов ……280
10.3.2.2 Идентификация по антигенной структуре …….……281
10.4 Серологический метод …….……..291
10.4.1 Реакция связывания комплемента (РСК) …….…….292
10.4.2 Реакция радиального гемолиза (РРГ) ……..……..292
10.4.3 Методы иммуноблотинга (ИБ) …….…….293
11 Выделение и очистка вирусных препаратов …….…….297
11.1 Очистка и концентрирование вирусов с помощь полиэтиленгликоля ……301
11.2 Критерии чистоты вирусных препаратов ……302
11.3 Определение концентрации вируса в очищенном препарате ……306
12 Методические рекомендации к лабораторным занятиям ……...308
13 Основы таксономии вирусов ……323
13.1 Концентрация вида в таксономии вирусов ……..324
13.2 Международный код классификации и номенклатуры вирусов ……..326
14 Таксономический каталог вирусов и субвирусных агентов позвоночных ……336
14.1 ДНК-содержащие вирусы ……..…336
14.1.1 Семейство: *Poxviridae* …….……336
14.1.1.1 Подсемейство: *Chordopoxvirinae* ……..……341
14.1.1.2 Подсемейство: *Entomopoxvirinae* ……345
14.1.2 Семейство: *Asfaviridae* ……346
14.1.3 Семейство: *Iridoviridae* ……349
14.1.4 Семейство: *Herpesviridae* ……352
14.1.4.1 Подсемейство: *Alphaherpesvirinae* ……..……357
14.1.4.2 Подсемейство: *Betaherpesvirinae* …….……358

14.1.4.3 Подсемейство: *Gammaherpesvirinae* ……..……359
14.1.5 Семейство: *Adenoviridae* ……361
14.1.6 Семейство: *Polyomaviridae* ……366
14.1.7 Семейство: *Papillomaviridae* ……..……369
14.1.8 Семейство: *Circoviridae* ……..……372
14.1.9 Семейство: *Parvoviridae* ……..……374
14.1.9.1 Подсемейство: *Parvovirinae* ……..……377
14.1.9.2 Подсемейство: *Densovirinae* ……379
14.1.10 Семейство: *Hepadnaviridae* ……...380
14.1.11 Семейство: *Retroviridae* ……389
14.2 РНК-содержащие вирусы ……..……403
14.2.1 Семейство: *Reoviridae* ……..…403
14.2.2 Семейство: *Birnaviridae* ……..…439
14.2.3 Отряд: *Mononegavirales* ……..……445
14.2.3.1 Семейство: *Bornaviridae* ……..……449
14.2.3.2 Семейство: *Filoviridae* ……..……453
14.2.3.3 Семейство: *Paramyxoviridae* ……459
14.2.3.3.1 Подсемейство: *Paramyxovirinae* ……...463
14.2.3.3.2 Подсемейство: *Pneumovirinae* ……..467
14.2.3.4 Семейство: *Rhabdoviridae* ……469
14.2.4 Семейство: *Orthomyxoviridae* ……..482
14.2.5 Семейство: *Bunyaviridae* ……493
14.2.6 Семейство: *Arenaviridae* ……501
14.2.7 Семейство: *Picornaviridae* ……..510
14.2.8 Семейство: *Caliciviridae* ……525
14.2.9 Семейство: *Astroviridae* ……..532
14.2.10 Семейство: *Nodaviridae* ……534
14.2.11 Порядок: *Nidovirales* ……539
14.2.11.1 Семейство: *Coronaviridae* ……..547
14.2.11.2 Семейство: *Arteriviridae* ……558

14.2.12 Семейство: *Flaviviridae* …….563
14.2.13 Семейство: *Togaviridae* …….578
14.3 Прионы (агенты губкообразных энцефалопатии) ……...587
15 Тестовые задания для контроля уровня знаний ……..594
Список истользованных источников ……623

Введение

Вирусология – наука о морфологии, физиологии, генетике, экологии и эволюции вирусов. Медицинская и ветеринарная вирусология исследует вирусы-паразиты человека и животных, их роль в этиологии и патогенезе инфекционных и опухолевых болезней, разрабатывает специальные методы диагностики, способы этиотропной терапии и специфической профилактики.

Вирусы являются одной из наиболее распространенных групп живых организмов, которые способны заражать не только практически всех представителей флоры и фауны, но и микроорганизмы. Эффективность борьбы со многими вирусами не имеет положительных результатов, так как вирусы не только имеют природный резервуар в окружающей среде, но и постоянно изменяются (мутируют), в связи с чем снижается эффективность проведения вакцинопрофилактики. Одним из наиболее ярких примеров является неэффективная многолетняя борьба с вирусом иммунодефицита человека.

Своевременность и точность постановки диагноза вирусного инфекционного заболевания позволяет не только осуществить эффективное лечение, направленное на уничтожение вирусного агента, но и провести профилактику дальнейшего распространения данного заболевания с учетом индивидуальных особенностей вириона. Например, в XX веке повсеместно было ликвидировано такое заболевание как оспа по средствам проведения массовой вакцинации населения.

В данном учебном пособии подробно рассмотрены вопросы основ классификации (таксономии) вирусов позвоночных, международный код классификации и номенклатуры вирусов, характеристики семейств и родов ДНК и РНК-содержащих вирусов, диагностики вирусных заболеваний и методы выделения и очистки вирусных препаратов.

Обозначения и сокращения

AGE – агарозный гель

ANU – Australian National University

ATCC – American Type Culture Collection

bp – (base pair) пара оснований

ds – (double-stranded) двуспиральный

dsDNA – двуспиральная ДНК

dsDNA-RT – двуспиральная ДНК, в репликативном цикле которой имеется этап обратной транскрипции с РНК

dsRNA – двуспиральная РНК

dsRNA – двуспиральная РНК

G (GP) – поверхностный гликопротеин

IN – интеграза

IRES – (internal ribosomal entry site) внутренний сайт входа рибосомы

kb – (kilo base) килобаза (тысяча оснований)

kbp – (kilo base pare) тысяча пар оснований

kDa – (kilo Dalton) килодальтон

MA – (matrix) матрикс

Mr – (relative molar mass) относительная молярная масса

N – (nucleoprotein) нуклеопротеин

NC – (nucleocapsid) нуклеокапсид

NC – (nucleocapsid) нуклеокапсид)

NNS – негативный несегментированный геном РНК

NP – нуклеопротеин

NS – неструктурные белки – это предшественники структурных белков, регуляторные белки и ферменты, обслуживающие процесс внутриклеточной репродукции вируса и не входящие в состав вирусной частицы

NSF – National Science Foundation

NssRNA – односпиральная РНК негативной полярности

nt – (nucleotide) нуклеотид

ORF – (open reading frame) открытая рамка считывания

PAGE – полиакриламидный гель

PR – протеаза

PrP – приемный протеин

RT – (reverse transcriptase) обратная транскриптаза

RT – обратная транскриптаза

sgRNA – (subgenomic RNA) субгеномная РНК

SH – интегративный мембранный протеин

SP – сериновая протеаза

ss – (single-stranded) одноцепочечный

ssDNA – односпиральная ДНК

ssRNA – односпиральная РНК

ssRNA-RT – односпиральная РНК в репликативном цикле которой имеется этап обратной транскрипции

SU – (surface) поверхностный

T – (triangular number) триангулярное число

VPg – (genome-linked protein) геном-ассоциированный протеин

VP – структурные белки, входящие в состав вирусной частицы

БСА – альбумин нормальной сыворотки быка

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИБ – метод иммуноблотинга

$ИД_{50}$ – 50 % инфекционная доза для животных или для куриных эмбрионов

иРНК – информационная рибонуклеиновая кислота

ИФА – иммунофлюоресцентный анализ

ИЭМ – иммунная электронная микроскопия

ИЭТ – изоэлектрическая точка

кДНК – клеточная дезоксирибонуклеиновая кислота

КПЧ – клетки почек человека

$ЛД_{50}$ – 50 % смертельная доза

М – матриксный протеин

ММГ – методы молекулярной гибридизации

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

МФА – метод иммунофлюоресценции

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭГ – полиэтиленгликоль

РБО – реакция бляшкообразования

РВИЭФ – реакция встречного иммуноэлектрофореза

РГА – реакция гемагглютинации

РГАд – реакции гемадсорбции

РЗБО – реакция задержки (нейтрализации) бляшкообразования

РЗЦПД – реакция задержки цитопатического действия вирусов

РИФ – реакция иммунофлюоресценции

РН – реакция нейтрализации

РНК – рибонуклеиновая кислота

РРГ – реакция радиального гемолиза

рРНК – рибосомальная рибонуклеиновая кислота

РСК – реакция связывания комплемента

РСР – папаино-подобная цистеиновая протеаза

РТГА – реакция торможения гемагглютинации

РТГАд – реакция торможения гемадсорбции

СА – (capsid protein) капсидный протеин

СР – (capsid protein) капсидный протеин

СРЕ – (cytopathic effect) ЦПЭ, цитопатический эффект

$ТКИД_{50}$ – 50 % инфекционная доза для тканевой культуры

ТМ – (transmembrane) трансмембранный

тРНК – транспортная рибонуклеиновая кислота

УФ – ультрафиолет

ФИТЦ – флюоресцеина изотиоцианат

ФЭЧ – фибробласты эмбриона человека

ЦПД – цитопатическому действию

ЭМВ – электронно-микроскопическое выявление

1 История вирусологии, природа и происхождение вирусов

1.1 Открытие вирусов

Вирусология — молодая наука, ее история насчитывает немногим более 100 лет. Начав свой путь как наука о вирусах, вызывающих болезни человека, животных и растений, в настоящее время вирусология развивается в направлениях изучения основных законов современной биологии на молекулярном уровне, основываясь на том, что вирусы являются частью биосферы и важным фактором эволюции органического мира.

История вирусологии необычна тем, что один из ее предметов — вирусные болезни — стал изучаться задолго до того, как были открыты собственно вирусы. Начало истории вирусологии — это борьба с инфекционными заболеваниями и только впоследствии — постепенное раскрытие источников этих болезней. Подтверждением тому служат работы Эдуарда Дженнера (1749-1823 гг.) по предупреждению оспы и работы Луи Пастера (1822-1895 гг.) с возбудителем бешенства.

С незапамятных времен оспа была бичом человечества, унося тысячи жизней. Описания оспенной заразы встречаются в рукописях древнейших китайских и индийских текстов. Первые упоминания об эпидемиях оспы на европейском континенте датируются VI столетием нашей эры (эпидемия среди солдат эфиопской армии, осаждавшей Мекку), после чего наблюдался необъяснимый период времени, когда упоминания об эпидемиях оспы отсутствовали. Оспа снова начала гулять по континентам в XVII веке. Например, в Северной Америке (1617-1619 гг.) в штате Массачусетс погибло 9/10 населения, в Исландии (1707 г.) после эпидемии оспы от 57 тыс. человек осталось только 17 тыс., в г. Истхем (1763 г.) от 1331 жителя осталось 4 человека. В связи с этим, проблема борьбы с оспой стояла очень остро.

Методика предупреждения оспы через прививку, называемая вариоляцией, была известна с давних времен. Упоминания о применении вариоляции в Европе датируются серединой 17-го века со ссылками на более ранний опыт применения в Китае, на Дальнем Востоке, в Турции. Суть вариоляции заключалась в том, что со-

держимое пустул от пациентов, болевших легкой формой оспы, вносили в маленькую ранку на коже человека, что вызывало легкое заболевание и предупреждало острую форму. Однако при этом сохранялась большая опасность заболевания тяжелой формой оспы и смертность среди привитых достигала 10 %. Дженнер совершил переворот в методике предупреждения оспы. Он первый обратил внимание на то, что люди, переболевшие коровьей оспой, которая протекала легко, впоследствии никогда не болели оспой. 14 мая 1796 г. Дженнер внес в ранку Джеймса Фипса, никогда не болевшего оспой, жидкость из пустул больной коровьей оспой доярки Сары Селмес. На месте искусственной инфекции у мальчика появились типичные пустулы, которые через 14 дней исчезли. Тогда Дженнер внес в ранку мальчика высокоинфекционный материал из пустул больного оспой. Мальчик не заболел. Так зародилась и подтвердилась идея вакцинации (от латинского слова vacca — корова). Во времена Дженнера вакцинация понималась как внесение инфекционного материала коровьей оспы в организм человека с целью предотвращения заболевания натуральной оспой. Термин вакцина применяли к веществу, предохранявшему от оспы. С 1840 г. противооспенную вакцину стали получать заражением телят. Вирус оспы человека был открыт только в 1904 г. Таким образом, оспа — это первая инфекция, против которой была применена вакцина, т. е. первая управляемая инфекция. Успехи в вакцинопрофилактике черной оспы привели к ее искоренению в мировом масштабе.

В наше время вакцинация и вакцина употребляются как общие термины, обозначающие прививку и прививочный материал.

Пастер, по существу не знавший ничего конкретного о причинах бешенства, кроме неоспоримого факта его инфекционной природы, использовал принцип ослабления (аттенуации) возбудителя. В целях ослабления болезнетворных свойств возбудителя бешенства был использован кролик, в мозг которого ввели мозговую ткань умершей от бешенства собаки. После смерти кролика мозговая ткань его была введена следующему кролику и т. д. Было проведено около 100 пассажей, прежде чем возбудитель адаптировался к ткани мозга кролика. Будучи введен подкожно в организм собаки, он проявлял лишь умеренные свойства патогенности. Такой «пе-

ревоспитанный» возбудитель Пастер назвал «фиксированным», в отличие от «дикого», которому свойственна высокая патогенность. Позднее Пастер разработал метод создания иммунитета, состоящий из серии инъекций с постепенно увеличивающимся содержанием фиксированного возбудителя. Собака, прошедшая полный курс инъекций, оказалась в полной мере устойчивой к инфекции. Пастер пришел к выводу, что процесс развития инфекционной болезни, по существу, является борьбой микробов с защитными силами организма. «Каждая болезнь должна иметь своего возбудителя, а мы должны способствовать развитию иммунитета к этой болезни в организме пациента», — говорил Пастер. Еще не понимая, каким образом организм вырабатывает иммунитет, Пастер сумел использовать его принципы и направить механизмы этого процесса на пользу человека. В июле 1885 г. Пастеру представился случай испытать свойства «фиксированного» возбудителя бешенства на ребенке, укушенном бешеной собакой. Мальчику была проведена серия инъекций все более ядовитого вещества, причем последняя инъекция содержала уже полностью патогенную форму возбудителя. Мальчик остался здоров. Вирус бешенства был открыт Ремленже в 1903 г.

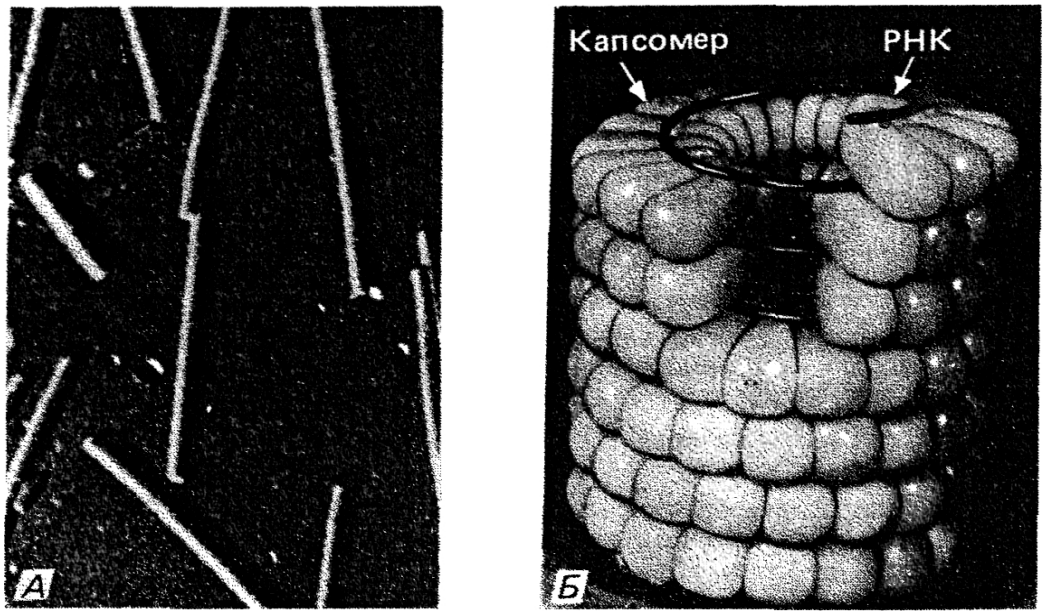
Следует отметить, что ни вирус оспы, ни вирус бешенства не были первыми открытыми вирусами, поражающими животных и человека. Первое место по праву принадлежит вирусу ящура, открытому Леффлером и Фрошем в 1898 г. Эти исследователи, используя многократные разведения фильтрующегося агента, показали его ядовитость и сделали заключение о его корпускулярной природе.

К концу XIX-го столетия выяснилось, что целый ряд заболеваний человека, таких как бешенство, оспа, грипп, желтая лихорадка являются инфекционными, однако их возбудители не обнаруживались бактериологическими методами. Благодаря работам Роберта Коха (1843-1910 гг.), который впервые использовал технику чистых бактериальных культур, появилась возможность различать бактериальные и небактериальные заболевания. В 1890 г. на X конгрессе гигиенистов Кох вынужден был заявить, что «…при перечисленных болезнях мы имеем дело не с бактериями, а с организованными возбудителями, которые принадлежат к совсем другой группе микроорганизмов». Это высказывание Коха свидетельствует, что открытие вирусов

не было случайным событием. Не только опыт работы с непонятными по своей природе возбудителями, но и понимание сущности происходящего способствовали тому, что была сформулирована мысль о существовании оригинальной группы возбудителей инфекционных заболеваний небактериальной природы. Оставалось экспериментально доказать ее существование.

Первое экспериментальное доказательство существования новой группы возбудителей инфекционных заболеваний было получено нашим соотечественником — физиологом растений Дмитрием Иосифовичем Ивановским (1864-1920 гг.) при изучении мозаичных заболеваний табака. Это неудивительно, так как инфекционные заболевания эпидемического характера часто наблюдались и у растений. Еще в 1883-84 гг. голландский ботаник и генетик де Фриз наблюдал эпидемию позеленения цветов и предположил инфекционную природу заболевания. В 1886 г. немецкий ученый Майер, работавший в Голландии, показал, что сок растений, больных мозаичной болезнью, при инокуляции вызывает у растений такое же заболевание. Майер был уверен, что виновником болезни является микроорганизм, и безуспешно искал его. В 19 веке заболевания табака наносили огромный вред сельскому хозяйству и в нашей стране. В связи с этим, для изучения заболеваний табака на Украину была направлена группа исследователей, в которую, будучи студентом Петербургского университета, входил Д.И. Ивановский. В результате изучения заболевания, описанного в 1886 г. Майером как мозаичная болезнь табака, Д.И. Ивановский и В.В. Половцев пришли к выводу, что оно представляет собой два различных заболевания. Одно из них — «рябуха» — вызывается грибком, а другое — неизвестного происхождения. Изучение мозаичной болезни табака было продолжено Ивановским в Никитском ботаническом саду под руководством академика А.С. Фамицина. Используя сок пораженного болезнью листа табака, профильтрованный через свечу Шамберлана, задерживающую самые мелкие бактерии, Ивановский вызвал заболевание листьев табака. Культивирование зараженного сока на искусственных питательных средах не дало результатов и Ивановский приходит к выводу, что возбудитель болезни имеет необычную природу — он фильтруется через бактериальные фильтры и не способен расти на искусственных питательных средах. Прогревание сока при

температуре от 60 °С до 70 °С лишало его инфекционности, что свидетельствовало о живой природе возбудителя. Ивановский сначала назвал новый тип возбудителя «фильтрующиеся бактерии» (рисунок 1). Результаты работы Д.И. Ивановского были положены в основу его диссертации, представленной в 1888 г., и опубликованы в книге «О двух болезнях табака» в 1892 году. Этот год и считается годом открытия вирусов.



А – Электронная микрофотография после косого напыления углеродом и платиной; 65 000 ×. (Фото H. Frank.) Б – Модель. (Karlson, Kurzes Lehrbuch der Biochemie, Stuttgart, Thieme, 1980).

Рисунок 1 – Вирус табачной мозаики

Определенный период времени в зарубежных публикациях открытие вирусов связывали с именем голландского ученого Бейеринка (1851-1931 гг.), который также занимался изучением мозаичной болезни табака и опубликовал свои опыты в 1898 г. Профильтрованный сок зараженного растения Бейеринк поместил на поверхность агара, проинкубировал и получил на его поверхности бактериальные колонии. После этого верхний слой агара с колониями бактерий был удален, а внутренний слой был использован для заражения здорового растения. Растение заболело. Из этого Бейеринк сделал вывод, что причиной заболевания являются не бактерии, а некая жидкая субстанция, которая могла проникнуть внутрь агара, и назвал возбудителя

«жидкий живой контагий». В связи с тем, что Ивановский только подробно описал свои опыты, но не уделил должного внимания небактериальной природе возбудителя, возникло недопонимание ситуации. Известность работы Ивановского приобрели только после того, как Бейеринк повторил и расширил его опыты и подчеркнул, что Ивановский впервые доказал именно небактериальный характер возбудителя самой типичной вирусной болезни табака. Сам Бейеринк признал первенство Ивановского и в настоящее время приоритет открытия вирусов Д.И. Ивановским признан во всем мире.

Слово ***ВИРУС*** означает яд. Этот термин применял еще Пастер для обозначения заразного начала. Следует отметить, что в начале 19 века все болезнетворные агенты назывались словом вирус. Только после того, как стала понятна природа бактерий, ядов и токсинов терминами «ультравирус», а затем просто «вирус» стали обозначать «новый тип фильтрующегося возбудителя». Широко термин «вирус» укоренился в 30-е годы нашего столетия.

В настоящее время ясно, что вирусы характеризуются убиквитарностью, то есть повсеместностью распространения. Вирусы поражают представителей всех царств живого: человека, позвоночных и беспозвоночных животных, растения, грибы, бактерии.

Первое сообщение, имеющее отношение к вирусам бактерий было сделано Ханкин в 1896 г. В Летописи Института Пастера он заявил, что «... вода некоторых рек Индии обладает бактерицидным действием...», что без сомнения связано с вирусами бактерий. В 1915 г. Туорт в Лондоне, изучая причины лизиса бактериальных колоний, описал принцип передачи «лизиса» новым культурам в ряду поколений. Его работы, как это часто бывает, фактически оказались не замеченными, и два года спустя, в 1917 г., канадец де Эрелль повторно обнаружил явление лизиса бактерий, связанного с фильтрующимся агентом. Он назвал этот агент бактериофагом. Де Эрелль предполагал, что бактериофаг один. Однако исследования Барнета, работавшего в Мельбурне в 1924-34 гг., показали широкое разнообразие бактериальных вирусов по физическим и биологическим свойствам. Открытие многообразия бактериофагов вызвало большой научный интерес. В конце 30-х годов трое исследовате-

лей — физик Дельбрюк, бактериологи Лурия и Херши, работавшие в США, создали так называемую «Фаговую группу», исследования которой в области генетики бактериофагов в конечном итоге привели к рождению новой науки — молекулярной биологии.

Изучение вирусов насекомых существенно отстало от вирусологии позвоночных животных и человека. В настоящее время ясно, что вирусы, поражающие насекомых, условно можно разделить на 3 группы: собственно вирусы насекомых, вирусы животных и человека, для которых насекомые являются промежуточными хозяевами, и вирусы растений, которые также поражают насекомых.

Первый вирус насекомых, который был идентифицирован — вирус желтухи шелковичного червя (вирус полиэдроза тутового шелкопряда, названный Bollea stilpotiae). Еще в 1907 г. Провачек показал, что фильтрованный гомогенат больных личинок является инфекционным для здоровых личинок тутового шелкопряда, но только в 1947 г. немецкий ученый Бергольд обнаружил палочковидные вирусные частицы.

Одним из наиболее плодотворных исследований в области вирусологии является изучение Ридом природы желтой лихорадки на волонтерах армии США в 1900-1901 гг. Убедительно было продемонстрировано, что желтая лихорадка вызывается фильтрующимся вирусом, который передавался комарами и москитами. Было также установлено, что москиты после впитывания инфекционной крови в течение двух недель остаются неинфекционными. Таким образом, был определен внешний инкубационный период заболевания (время, необходимое для репродукции вируса в насекомом) и установлены основные принципы эпидемиологии арбовирусных инфекций (вирусных инфекций, передаваемых кровососущими членистоногими).

Способность размножения вирусов растений в своем переносчике — насекомом была показана в 1952 г. Мараморошу. Исследователь, используя технику инъекций насекомым, убедительно показал способность вируса желтухи астр размножаться в своем переносчике — шеститочечной цикаде.

1.2 Этапы развития вирусологии

История достижений вирусологии напрямую связана с успехами развития методической базы исследований.

Конец XIX — начало XX-го века. Основным методом идентификации вирусов в этот период был метод фильтрации через бактериологические фильтры (свечи Шамберлана), которые использовались как средство разделения возбудителей на бактерии и небактерии. С использованием фильтруемости через бактериологические фильтры были открыты следующие вирусы:

– 1892 г. – вирус табачной мозаики;

– 1898 г. – вирус ящура;

– 1899 г. – вирус чумы рогатого скота;

– 1900 г. – вирус желтой лихорадки;

– 1902 г. – вирус оспы птиц и овец;

– 1903 г. – вирус бешенства и вирус чумы свиней;

– 1904 г. – вирус оспы человека;

– 1905 г. – вирус чумы собак и вирус вакцины;

– 1907 г. – вирус денге;

– 1908 г. – вирус оспы и трахомы;

– 1909 г. – вирус полиомиелита;

– 1911 г. – вирус саркомы Рауса;

– 1915 г. – бактериофаги;

– 1916 г. – вирус кори;

– 1917 г. – вирус герпеса;

– 1926 г. – вирус везикулярного стоматита.

30-е годы – основным вирусологическим методом, используемым для выделения вирусов и их дальнейшей идентификации, являются лабораторные животные (белые мыши – для вирусов гриппа, новорожденные мыши – для вирусов Коксаки, шимпанзе – для вируса гепатита В, куры, голуби – для онкогенных вирусов, поросята-гнотобионты – для кишечных вирусов и т. д.). Первым, кто начал систематически

использовать лабораторных животных при изучении вирусов, был Пастер, который еще в 1881 г. проводил исследования по инокуляции материала от больных бешенством в мозг кролика. Другая веха – работы по изучению желтой лихорадки, следствием которых явилось использование в вирусологической практике новорожденных мышей. Кульминацией этого цикла работ стало выделение Сайклзом в 1948 г. на мышах-сосунках группы вирусов эпидемической миалгии.

1931 г. – в качестве экспериментальной модели для выделения вирусов стали использоваться куриные эмбрионы, которые обладают высокой чувствительностью к вирусам гриппа, оспы, лейкоза, саркомы кур и некоторым другим вирусам. И в настоящее время куриные эмбрионы широко используются для выделения вирусов гриппа.

1932 г. – английский химик Элфорд создает искусственные мелкопористые коллоидные мембраны — основу для метода ультрафильтрации, с помощью которого стало возможным проводить определение размера вирусных частиц и дифференцировать вирусы по этому признаку.

1935 г. – применение метода центрифугирования дало возможность кристаллизации вируса табачной мозаики. В настоящее время методы центрифугирования и ультрацентрифугирования (ускорение на дне пробирки превышает 200000 g) широко используются для выделения и очистки вирусов.

В 1939 г. для изучения вирусов впервые был применен электронный микроскоп, обладающий разрешающей способностью от 0,2 до 0,3 нм. Использование ультратонких срезов тканей и метода негативного контрастирования водных суспензий позволило проводить изучение взаимодействия вирусов с клеткой и исследовать структуру (архитектуру) вирионов. Сведения, полученные с помощью электронного микроскопа, были значительно расширены с помощью рентгеноструктурного анализа кристаллов и псевдокристаллов вирусов. Совершенствование электронных микроскопов завершилось созданием сканирующих микроскопов, позволяющих получать объемные изображения. С использованием метода электронной микроскопии изучена архитектура вирионов, особенности их проникновения в клетку хозяина.

В этот период была открыта основная масса вирусов. В качестве примера мо-

гут быть приведены следующие:

– 1931 г. – вирус гриппа свиней и вирус западного энцефаломиелита лошадей;

– 1933 г. – вирус гриппа человека и вирус восточного энцефаломиелита лошадей;

– 1934 г. – вирус паротита;

– 1936г. – вирус рака молочной железы мышей;

– 1937г. – вирус клещевого энцефалита.

40-е годы. В 1940 г. Хогланд с коллегами установили, что вирус осповакцины содержит ДНК, но не РНК. Стало очевидным, что вирусы отличаются от бактерий не только размерами и неспособностью расти без клеток, но и тем, что они содержат только один вид нуклеиновой кислоты — ДНК или РНК.

1941 г. – американский ученый Херст на модели вируса гриппа открыл феномен гемагглютинации (склеивания эритроцитов). Это открытие легло в основу разработки методов выявления и идентификации вирусов и способствовало изучению взаимодействия вируса с клеткой. Принцип гемагглютинации положен в основу ряда методов:

РГА – реакция гемагглютинации – применяется для обнаружения и титрования вирусов;

РТГА – реакция торможения гемагглютинации – применяется для идентификации и титрования вирусов.

1942 г. – Херст устанавливает наличие у вируса гриппа фермента, который позднее идентифицирован как нейраминидаза.

1949 г. – открытие возможности культивирования клеток животных тканей в искусственных условиях. В 1952 г. Эндерс, Уэллер и Роббинс получили Нобелевскую премию за разработку метода культуры клеток.

Введение в вирусологию метода культуры клеток явилось важным событием, давшим возможность получения культуральных вакцин. Из широко применяемых в настоящее время культуральных живых и убитых вакцин, созданных на основе аттенуированных штаммов вирусов, следует отметить вакцины против полиомиелита, паротита, кори и краснухи.

Создателями вакцин против полиомиелита являются американские вирусологи Сэбин (трехвалентная живая вакцина на основе аттенуированных штаммов полиовирусов трех серотипов) и Солк (убитая трехвалентная вакцина). В нашей стране советскими вирусологами М.П. Чумаковым и А.А. Смородинцевым разработана технология производства живой и убитой вакцин против полиомиелита. В 1988 г. Всемирная ассамблея здравоохранения поставила перед ВОЗ задачу ликвидации полиомиелита во всем мире с полным прекращением циркуляции дикого полиовируса. К настоящему времени достигнут огромный прогресс в этом направлении. Применение глобальной вакцинации против полиомиелита с применением «туровых» схем вакцинации позволило не только кардинально снизить заболеваемость, но и создать территории, свободные от циркуляции дикого полиовируса.

Открыты вирусы:

– 1945 г. – вирус Крымской геморрагической лихорадки;

– 1948 г. – вирусы Коксаки.

50-е годы. В 1952 г. Дульбекко разрабатывает метод титрования бляшек в монослое клеток эмбриона цыпленка, что позволило ввести в вирусологию количественный аспект. 1956-62 гг. Уотсон, Каспар (США) и Клуг (Великобритания) разрабатывают общую теорию симметрии вирусных частиц. Структура вирусной частицы стала одним из критериев в системе классификации вирусов.

Этот период характеризовался значительными достижениями в области бактериофагов:

– установлена индукция профага лизогенизирующих фагов (Львов и др., 1950 г.);

– доказано, что инфекционность присуща фаговой ДНК, а не белковой оболочке (Херши, Чейз, 1952 г.);

– открыто явление общей трансдукции (Циндер, Ледерберг, 1952 г.).

Реконструирован инфекционный вирус табачной мозаики (Френкель-Конрад, Вильяме, Сингер, 1955-1957 гг.), в 1955 г. получен в кристаллическом виде вирус полиомиелита (Шаффер, Шверд, 1955 г.).

Открыты вирусы:

– 1951 г. – вирусы лейкоза мышей и ECHO;

– 1953 г. – аденовирусы;

– 1954 г. – вирус краснухи;

– 1956 г. – вирусы парагриппа, цитомегаловирус, респираторно-синцитиальный вирус;

– 1957 г. – вирус полиомы;

– 1959 г. – вирус аргентинской геморрагической лихорадки.

60-е годы характеризуются расцветом молекулярно-биологических методов исследования. Достижения в области химии, физики, молекулярной биологии и генетики легли в основу методической базы научных исследований, которые стали применяться не только на уровне методик, но и целых технологий, где вирусы выступают не только как объект исследований, но и как инструмент. Ни одно открытие молекулярной биологии не обходится без вирусной модели.

1967 г. – Катес и МакАуслан демонстрируют присутствие в вирионе осповакцины ДНК-зависимой РНК-полимеразы. В следующем году обнаруживается РНК-зависимая РНК-полимераза у реовирусов, а затем у парамиксо- и рабдовирусов. В 1968 г. Якобсон и Балтимор устанавливают наличие у полиовирусов геномного белка, соединенного с РНК, Балтимор и Бостон устанавливают, что геномная РНК полиовируса транслируется в полипротеин.

Открыты вирусы:

– 1960 г. – риновирусы;

– 1963 г. – австралийский антиген (HBsAg).

70-е годы. Балтимор одновременно с Темином и Мизутани сообщают об открытии в составе РНК-содержащих онкогенных вирусов фермента обратной транскриптазы (ревертазы). Становится реальным изучение генома РНК содержащих вирусов.

Изучение экспрессии генов у вирусов эукариот дало фундаментальную информацию о молекулярной биологии самих эукариот – существование кэп-структуры мРНК и ее роль в трансляции РНК, наличие полиадениловой последовательности на 3'-конце мРНК, сплайсинг и роль энхансеров в транскрипции впервые

выявлены при изучении вирусов животных.

1972 г. – Берг публикует сообщение о создании рекомбинантной молекулы ДНК. Возникает новый раздел молекулярной биологии – генная инженерия. Применение технологии рекомбинантных ДНК позволяет получать белки, имеющие важное значение в медицине (инсулин, интерферон, вакцины). 1975 г. – Келер и Мильштейн получают первые линии гибридов, продуцирующих моноклональные антитела (МКА). На основе МКА разрабатываются самые специфичные тест-системы для диагностики вирусных инфекций. 1976 г. – Бламберг за открытие HBsAg получает Нобелевскую премию. Установлено, что гепатит А и гепатит В вызываются разными вирусами.

Открыты вирусы:

– 1970 г. – вирус гепатита В;

– 1973 г. – ротавирусы, вирус гепатита А;

– 1977 г. – вирус гепатита дельта.

80-е годы. Развитие заложенных отечественным ученым Л.А. Зильбером представлений о том, что возникновение опухолей может быть связано с вирусами. Компоненты вирусов, ответственные за развитие опухолей, назвали онкогенами. Вирусные онкогены оказались в числе лучших модельных систем, помогающих изучению механизмов онкогенетической трансформации клеток млекопитающих.

– 1985 г. – Мюллис получает Нобелевскую премию за открытие полимеразной цепной реакции (ПЦР). Это – молекулярно-генетический метод диагностики, позволивший, кроме того, усовершенствовать технологию получения рекомбинантных ДНК и открыть новые вирусы.

Открыты вирусы:

– 1983 г. – вирус иммунодефицита человека;

– 1989 г. – вирус гепатита С;

– 1995 г. – с использованием ПЦР открыт вирус гепатита G.

1.3 Развитие концепции о природе вирусов

Ответы на вопросы «Что такое вирусы?» и «Какова их природа?» составляли предмет дискуссии многие годы со времени их открытия. В 20-30 гг. никто не сомневался, что вирусы являются живой материей. В 30-40 гг. считалось, что вирусы – это микроорганизмы, так как способны размножаться, обладают наследственностью, изменчивостью и приспособляемостью к меняющимся условиям среды обитания, и, наконец, подвержены биологической эволюции, которая обеспечивается естественным и искусственным отбором. В 60-е годы первые успехи молекулярной биологии определили закат концепции о вирусах как организмах. В онтогенетическом цикле вируса выделены две формы – внеклеточная и внутриклеточная. Для обозначения внеклеточной формы вируса введен термин *ВИРИОН*. Установлены отличия его организации от строения клеток. Обобщены факты, указывающие на совершенно отличный от клеток тип размножения, названный дисъюнктивная репродукция. Дисъюнктивная репродукция – это временная и территориальная разобщенность синтеза вирусных компонентов – генетического материала и белков – от последующей сборки и формирования вирионов. Показано, что генетический материал вирусов представлен одним из двух типов нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК). Сформулировано, что основным и абсолютным критерием отличия вирусов от всех других форм жизни является отсутствие у них собственных белоксинтезирующих систем.

Накопившиеся данные позволили прийти к выводу, что вирусы не являются организмами, пусть даже мельчайшими, так как любые, даже минимальные организмы типа микоплазм, риккетсий и хламидий имеют собственные белоксинтезирующие системы. Согласно определению, сформулированному академиком В.М. Ждановым, вирусы являются автономными генетическими структурами, способными функционировать только в клетках с разной степенью зависимости от клеточных систем синтеза нуклеиновых кислот и полной зависимостью от клеточных белоксинтезирующих и энергетических систем, и подвергающимися самостоятельной эволюции.

С точки зрения паразитологии, вирусы – облигатные внутриклеточные парази-

ты. Паразитизм (от греческого parasitos – нахлебник) – состояние симбиоза, при котором один организм (паразит) живет за счет другого, нанося ему вред. При этом паразит физически и физиологически зависит от хозяина. Внутриклеточный паразитизм – это высшая стадия облигатного паразитизма, суть которого заключается в абсолютной зависимости метаболизма паразита от организма хозяина и характеризуется полной невозможностью размножения паразита за пределами клетки. Однако уровень паразитизма вирусов качественно иной, чем у внутриклеточных паразитов-микроорганизмов. Вирусы – это генетические паразиты. Крайним проявлением генетического паразитизма является способность ряда вирусов интегрировать в геном клетки хозяина. С этой точки зрения вирусы могут быть определены как особая неклеточная форма жизни, которой присущ строгий внутриклеточный паразитизм на молекулярном и молекулярно-генетическом уровнях,

Таким образом, вирусы представляют собой многообразную и многочисленную группу неклеточных форм жизни, не являющихся микроорганизмами, и объединенных в царство *Vira*, Вирусы изучаются в рамках вирусологии, которая представляет собой самостоятельную научную дисциплину, имеющую свой объект и методы исследования.

Вирусологию разделяют на общую и частную, а вирусологические исследования – на фундаментальные и прикладные. Предметом фундаментальных исследований в вирусологии является архитектура вирионов, их состав, особенности взаимодействия вирусов с клеткой, способы переноса наследственной информации, молекулярные механизмы синтеза элементов и процесс их объединения в целое, молекулярные механизмы изменчивости вирусов и их эволюция. Прикладные исследования в вирусологии связаны с решением проблем медицины, ветеринарии и фитопатологии.

1.4 Происхождение вирусов

По вопросу о происхождении вирусов высказывались разные предположения. Одни авторы считали, что вирусы являются результатом крайнего проявления рег-

рессивной эволюции бактерий или других одноклеточных организмов. Гипотеза регрессивной эволюции не может объяснить разнообразия генетического материала у вирусов, неклеточной их организации, дисьюнктивного способа репродукции и отсутствия белоксинтезирующих систем. Поэтому в настоящее время эта гипотеза имеет скорее историческое значение в не разделяется большинством вирусологов.

Согласно второй гипотезе вирусы являются потомками древних, доклеточных форм жизни – протобионтов, предшествовавших появлению клеточных форм жизни, с которых и началась биологическая эволюция. Эта гипотеза также не разделяется в настоящее время большинством вирусологов, так как она не объясняет тех же вопросов, разрешить которые оказалась бессильной первая гипотеза.

Третья гипотеза предполагает, что вирусы произошли от генетических элементов клеток, ставших автономными, хотя не ясно, какие из этих элементов дали начало столь большому разнообразию генетического материала у вирусов. Эта гипотеза, которую иронически назвали гипотезой «взбесившихся генов», находит наибольшее число сторонников, однако не в том первоначальном виде, в каком она была высказана, так как и она не объясняет наличие у вирусов форм генетического материала (однонитчатая ДНК, двунитчатая РНК), отсутствующих в клетках, образование капсида, существование двух форм симметрии и т.п.

Вероятно, вирусы действительно являются дериватами генетических элементов клеток, но они возникали и эволюционировали вместе с возникновением и эволюцией клеточных форм жизни. Природа как бы испробовала на вирусах все возможные формы генетического материала (разные виды РНК и ДНК), прежде чем окончательно остановила свой выбор на канонической его форме – двунитчатой ДНК, общей для всех клеточных форм организмов, начиная от бактерии и кончая человеком. Будучи, с одной стороны, автономными генетическими структурами, с другой стороны, неспособными развиваться вне клеток, вирусы на протяжении миллиардов лет биологической эволюции проделали настолько разнообразные пути развития, что отдельные их группы не имеют преемственной связи между собой. По-видимому, разные группы вирусов возникали в исторически разные времена из разных генетических элементов клеток и поэтому существующие в настоящее время

разные группы вирусов имеют полифилетическое происхождение, т.е. не имеют единого общего предка. Тем не менее, универсальность генетического кода распространяется и на вирусы, свидетельствуя тем самым, что и они являются порождением органического мира земли.

2 Химический состав вирусов

Основными химическими соединениями, которые входят в состав всех вирусов, являются белки и нуклеиновые кислоты. В состав ряда вирусов входят липиды и углеводы.

Белки. Локализация вирусных белков. Белки, связанные с жизненным циклом вируса, разделяют на белки, детерминируемые геномом вируса и белки, имеющие клеточное происхождение. В качестве примера клеточных белков, которые обнаружены в составе некоторых вирионов, могут быть приведены белок цитоскелета – актин, и ядерные белки – гистоны. Белки клеточного происхождения, участвующие в процессе репликации вируса, будут рассмотрены в разделе взаимодействия вируса с клеткой.

По месту локализации белки, детерминируемые вирусным геномом, разделяют на две группы: 1) ***структурные белки*** – это белки, входящие в состав ВЧ, их обозначают как VP; 2) ***неструктурные белки*** – это предшественники структурных белков, регуляторные белки и ферменты, обслуживающие процесс внутриклеточной репродукции вируса и не входящие в состав ВЧ. Их обозначают как NS-белки.

Свойства вирусных белков. В состав вирионов входят белки с различной молекулярной массой (от 4 до 100 кД), состоящие из одной или нескольких полипептидных цепей. Количество этих белков также различно у разных вирусов. В состав нуклеокапсида ВТМ входит один белок. У других вирусов в состав вириона может входить несколько десятков белков, имеющих различные физико-химические свойства. Белки, формирующие капсид, нуклеокапсид и коровую оболочку, обладают одним общим свойством – способностью к самосборке.

В состав ВЧ могут входить низкомолекулярные белки, не участвующие в

формировании капсида. Например, геномные белки пикорнавирусов и аденовирусов. Геномный белок ковалентно связан с нуклеиновой кислотой и участвует в ее репликации.

Сложные белки представлены ***гликопротеинами*** (обозначают как gp) и ***липопротеинами***. Наличие гликопротеина определяет присутствие в вирионе углеводного компонента, который может быть представлен олигосахаридами маннозного типа, галактозой, N-ацетилглюкозамином или нейраминовой кислотой. Вирусные гликопротеины, как правило, экспонированы на наружной поверхности ВЧ и выполняют три основные функции: обеспечивают связывание вириона с клеточным рецептором (функция прикрепительного белка), обладают фузионной активностью (обеспечивают слияние мембран) и определяют антигенные свойства вирусов. В то же время, вирусные гликопротеины могут быть и неструктурными белками и, оставаясь в интегральной форме в мембране шероховатого эндоплазматического ретикулюма (ШЭР), выполнять функции транслоказ, обеспечивая транспорт вирусных компонентов в его просвет.

Вирусные ***липопротеины*** представлены белками, ацилированными, как правило, миристиновой (C_{14}) кислотой. Остатки жирных кислот, соединенные с молекулой белка, выполняют функцию липофильного якоря.

Вирусные ***белки-ферменты*** могут входить в состав вирусной частицы или являться неструктурными белками и появляться в клетке после экспрессии вирусного генома. Наиболее оснащенным ферментами является вирион вируса оспы, который имеет практически полный набор энзимов, необходимых для независимой внутриклеточной репликации вируса. В то же время, мелкие просто организованные изометрические вирусы с позитивным РНК-геномом могут не иметь никаких ферментов в составе вириона.

Функционально активные белки вирусов представлены, в первую очередь, ферментами нуклеинового обмена, обеспечивающими сложные механизмы репликации/транскрипции вирусного генома; ферментами, осуществляющими посттрансляционный процессинг и модификацию белков, и ферментами, участвующими в проникновении вирионов в клетку хозяина.

Первая группа ферментов наиболее многочисленна и включает как аналоги клеточных ферментов, так и вирус-специфические ферменты.

ДНК-зависимая ДНК-полимераза – осуществляет синтез ДНК на матрице ДНК (вирус оспы).

ДНК-зависимая РНК-полимераза – осуществляет синтез мРНК на матрице ДНК (вирус оспы).

РНК-зависимая РНК-полимераза – осуществляет синтез РНК на матрице РНК. Выполняет функции транскриптазы и репликазы. Впервые обнаружена в 1970 г. Балтимором у вируса везикулярного стоматита. Входит в состав вирионов или является NS-белком РНК-содержащих вирусов.

Обратная транскриптаза или ***ревертаза*** или ***РНК-зависимая ДНК-полимераза*** осуществляет синтез ДНК на матрице РНК. Впервые открыта в 1970 г. у ретровирусов Темином и Мизутани.

Хеликаза – осуществляет расплетете двухнитевой структуры ДНК. Кроме этого хеликазы обладают нуклеотидтрифосфат-зависимой РНК-хеликазной активностью, которая включает три процесса: связывание дезоксинуклеотидтрифосфата, его гидролиз и за счет этой энергии расплетение двухнитевой РНК.

мРНК-модифицирующие ферменты: поли-А-полимераза – аденилирует 3'-конец РНК за счет энергии АТФ; Кэп-энзим и метилтрансферазный комплекс – катализирует образование на 5'-конце кэп-структуры.

АТФ-аза, ГТФ-аза – осуществляют гидролиз соответствующих энергетических субстратов.

Рибонуклеаза Н – разрушает РНК, находящуюся в дуплексе с ДНК. Вторая группа вирусных ферментов – ферменты белкового обмена.

Здесь мы приведем лишь некоторые из них:

Протеиназы – ферменты, участвующие в посттрансляционном процессинге полипротеинов. Являются NS-белками РНК-содержащих вирусов;

Протеинкиназы – ферменты, фосфорилирующие структурные белки вирионов. Обнаружены в составе вируса везикулярного стоматита, вируса бешенства, альфавирусов и ретровирусов. Примерами ферментов, участвующих в проникнове-

нии вирусов в клетку, являются лизоцим бактериофагов и нейраминидаза вируса гриппа.

Липиды. Все оболочечные РНК-содержащие почкующиеся вирусы имеют липиды клеточного происхождения, входящие в состав суперкапсида (от 15 % до 30 % от сухого веса). От 50 % до 60 % липидов представлены фосфолипидами, от 20 % до 30 % составляет холестерин.

У ДНК-геномных вирусов липиды содержат вирусы оспы, герпеса, гепатита В. Это непочкующиеся вирусы. У вируса оспы липиды не образуют дифференцированной оболочки, которая формируется в цитоплазме в процессе морфогенеза поксвириона. Липиды вируса гепатита В образуются путем инвагинации мембран эндоплазматического ретикулюма (ЭПР). Липидсодержащая оболочка вируса герпеса формируется при прохождении внутреннего компонента вириона через ядерную мембрану. Следовательно, в состав вирусной оболочки герпесвирусов входят липиды ядерной мембраны.

Нуклеиновые кислоты. Клетки всех живых организмов содержат два вида нуклеиновой кислоты – ДНК (двухнитевая ДНК клеточного генома) и РНК (мРНК, тРНК, рРНК). В отличие от клеток, вирионы содержат только один вид нуклеиновой кислоты – ДНК или РНК. И та и другая являются хранителями наследственной информации и выполняют функции генома. Однако следует учитывать, что наличие одного вида нуклеиновой кислоты является характеристикой вириона, но не вируса. В жизненном цикле вируса его геномная нуклеиновая кислота транскрибируется, то есть ДНК-содержащие вирусы образуют РНК. Ряд РНК-содержащих вирусов имеют в цикле репродукции стадию обратной транскрипции и синтезируют ДНК на матрице РНК. Примерно 20 % всех вирусов имеют ДНК-геном, 80 % – РНК-геном. Способность РНК хранить наследственную информацию – уникальное свойство вирусов. Размеры вирусных геномов (длина нуклеотидных последовательностей, выраженная в нуклеотидах) варьируют в широких пределах – от 1,7 тысяч нуклеотидов (т.н.) у цирковируса свиней до 300 т.н. у фикоднавирусов архибактерий.

Кроме того, что геном вирусов может быть представлен или ДНК или РНК, он может находиться в разных видах – в виде двухнитевой (дн) или однонитевой (он)

формы, в виде линейной или кольцевой, в виде непрерывной или сегментированной формы.

Многообразие видов РНК геномов расширяется за счет существования последовательностей, отличающихся направлением связей сахаро-фосфатного остова.

Однонитевые РНК могут иметь позитивную полярность – (+) РНК, негативную полярность – (-) РНК или могут быть представлены обоюдозначащей цепью – (+,-) РНК (амбисенс стратегия кодирования). В свою очередь, РНК позитивной полярности могут иметь разную структурную организацию: могут, являясь матричной РНК, иметь на 5'-конце кэп (7-метилгуанозин, Cap), а на 3'-конце – поли-А (poly-A) последовательность; могут не иметь кэпа или поли-А; могут иметь на 5'-конце геномный белок; могут иметь на 3'-конце тРНК-подобную или шпильковую структуру.

Виды геномов вирусов легли в основу их классификации. Однако следует учитывать, что вид генома в настоящее время не является формальным таксоном и используется для удобства ориентации в многообразии вирусов.

Углеводы. Углеводный компонент вирусов находится в составе гликопротеидов. Количество сахаров в составе гликопротеидов может быть достаточно большим, достигая от 10 % до 13 % от массы вириона. Химическая специфичность их полностью определяется клеточными ферментами, обеспечивающими перенос и присоединение соответствующих сахарных остатков. Обычными сахарными остатками, обнаруживаемыми в вирусных белках, являются фруктоза, сахароза, манноза, галактоза, нейраминовая кислота, глюкозамин. Таким образом, подобно липидам, углеводный компонент определяется клеткой-хозяином, благодаря чему один и тот же вирус, выращенный в клетках разных видов, может значительно отличаться по составу сахаров в зависимости от специфичности клеточных гликозилтрансфераз.

Углеводный компонент гликопротеидов играет существенную роль в структуре и функции белка. Он является каркасом для локальных участков гликопротеида, обеспечивая сохранение конформации белковой молекулы, и обусловливает защиту молекулы от протеаз. Возможны и другие функции углеводов, пока достоверно не установленные.

Компоненты клетки-хозяина. В составе вирионов могут находиться компоненты клетки-хозяина. К таким компонентам могут относиться белки, и даже целые клеточные структуры. Так, например, в составе ряда оболочечных вирусов может находиться белок цитоскелета актин, в составе паповавирусов содержатся клеточные гистоны. Ряд вирусов содержит клеточные ферменты, например, протеинкиназы. В составе аренавирусов обнаружены рибосомы.

Клеточные компоненты могут включаться в вирион случайно или закономерно, В некоторых случаях они играют существенную роль в репродукции вируса, как, например, гистоны в репродукции паповавирусов.

3 Морфология, морфогенез, биофизические свойства и генетика вирусов

3.1 Архитектура вирионов

Внеклеточная форма вируса – вирион, предназначенная для сохранения и переноса нуклеиновой кислоты вируса, характеризуется собственной архитектурой, биохимическими и молекулярно-генетическими особенностями. Под архитектурой вирионов понимают ультратонкую структурную организацию этих надмолекулярных образований, различающихся размерами, формой и сложностью строения. Для описания архитектуры вирусных структур разработана номенклатура терминов:

Белковая субъединица – единая, уложенная определенным образом полипептидная цепь.

Структурная единица (структурный элемент) – белковый ансамбль более высокого порядка, образованный несколькими химически связанными идентичными или неидентичными субъединицами.

Морфологическая единица – группа выступов (кластер) на поверхности капсида, видимая в электронном микроскопе. Часто наблюдаются кластеры, состоящие из пяти (пентамер) и шести (гексамер) выступов. Это явление получило название

пентамерно-гексамерной кластеризации. Если морфологическая единица соответствует химически значимому образованию (сохраняет свою организацию в условиях мягкой дезинтеграции), то применяют термин ***капсомер***.

Капсид – внешний белковый чехол или футляр, образующий замкнутую сферу вокруг геномной нуклеиновой кислоты.

Кор (core) – внутренняя белковая оболочка, непосредственно примыкающая к нуклеиновой кислоте.

Нуклеокапсид – комплекс белка с нуклеиновой кислотой, представляющий собой упакованную форму генома.

Суперкапсид или пеплос – оболочка вириона, образованная липидной мембраной клеточного происхождения и вирусными белками.

Матрикс – белковый компонент, локализованный между суперкапсидом и капсидом.

Пепломеры и шипы – поверхностные выступы суперкапсида.

Как уже отмечалось, вирусы могут проходить через самые микроскопические поры, задерживающие бактерии, за что и были названы фильтрующимися агентами. Свойство фильтруемости вирусов обусловлено размерами, исчисляемыми нанометрами (нм), что на несколько порядков меньше, чем размеры самых мелких микроорганизмов. Размеры вирусных частиц, в свою очередь, колеблются в относительно широких пределах. Самые мелкие просто устроенные вирусы имеют диаметр чуть больше 20 нм (парвовирусы, пикорнавирусы, фаг Qβ), вирусы средних размеров – от 100 до 150 нм (аденовирусы, коронавирусы). Наиболее крупными признаны вирусные частицы осповакцины, размеры которых достигают 170 × 450 нм. Длина нитевидных вирусов растений может составлять 2000 нм.

Представители царства *Vira* характеризуются разнообразием форм. По своей структуре вирусные частицы могут быть простыми образованиями, а могут представлять собой достаточно сложные ансамбли, включающие несколько структурных элементов.

Существует два типа вирусных частиц (ВЧ), принципиально отличающихся друг от друга:

1) ВЧ, лишенные оболочки (безоболочечные или непокрытые вирионы);

2) ВЧ, имеющие оболочку (оболочечные или покрытые вирионы).

Строение вирионов, лишенных оболочки. Выделено три морфологических типа вирионов, лишенных оболочки: палочковидные (нитевидные), изометрические и булавовидные (рис. 2). Существование первых двух типов непокрытых вирионов определяется способом укладки нуклеиновой кислоты и ее взаимодействием с белками.

1 Белковые субъединицы ***связываются*** с нуклеиновой кислотой, располагаясь вдоль нее периодическим образом так, что она сворачивается в спираль и образует структуру под названием ***нуклеокапсид***. Такой способ регулярного, периодического взаимодействия белка и нуклеиновой кислоты определяет образование палочковидных и нитевидных вирусных частиц.

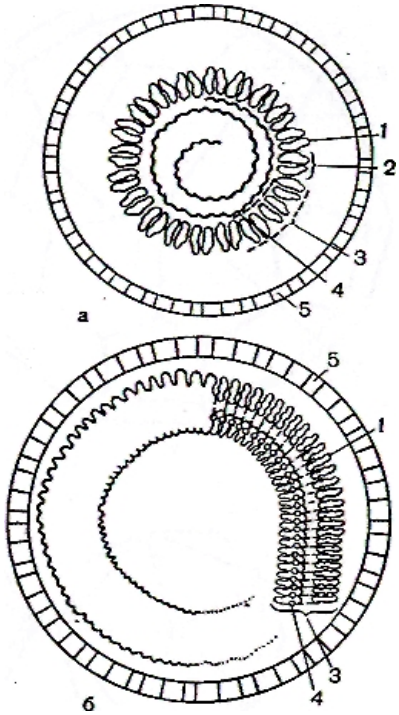
2 Нуклеиновая кислота ***не связана*** с белковым чехлом (возможные нековалентные связи очень подвижны). Такой принцип взаимодействия определяет образование изометрических (сферических) вирусных частиц. Белковые оболочки вирусов, не связанные с нуклеиновой кислотой, называют ***капсидом***.

3 Булавовидные вирионы обладают дифференцированной структурной организацией и состоят из ряда дискретных структур. Основными структурными элементами вириона являются изометрическая головка и хвостовой отросток. В зависимости от вируса в структуре вириона также могут присутствовать муфта, шейка, воротничок, хвостовой стержень, хвостовой чехол, базальная пластинка и фибриллы. Наиболее сложную дифференцированную структурную организацию имеют бактериофаги Т-четной серии, вирион которых состоит из всех перечисленных структурных элементов.

Вирионам или их компонентам могут быть присущи два основных типа симметрии (свойство тел повторять свои части) – спиральный и икосаэдрический. В том случае, если компоненты вириона обладают разной симметрией, то говорят о комбинированном типе симметрии ВЧ (рисунок 2 а).

Спиральная укладка макромолекул описывается следующими параметрами: числом субъединиц на виток спирали (u, число необязательно целое); расстоянием

между субъединицами вдоль оси спирали (p); шагом спирали (P); P = pu. Классическим примером вируса со спиральным типом симметрии является вирус табачной мозаики (ВТМ). Нуклеокапсид этого палочковидного вируса размером 18 × 300 нм состоит из 2130 идентичных субъединиц, на виток спирали приходится 16 1/3 субъединиц, шаг спирали составляет 2,3 нм (рисунок 2 б).



1-структурная единица капсида; 2-морфологическая единица капсида (капсомер); 3-капсид; 4-нуклеиновая кислота; 5-суперкапсид.

Рисунок 2 – Кубическая (а) и спиральная (б) симметрия капсидов сложно устроенных вирусов (схема)

Икосаэдрическая симметрия – самая эффективная для конструирования замкнутого чехла из отдельных субъединиц. При рассмотрении элементов икосаэдрической симметрии следует различать понятия симметрия и форма. Симметрия в данном случае – это набор поворотов, которые переводят объект сам в себя, форма – это лишь общий вид кубической поверхности объекта (тетраэдр, октаэдр, додекаэдр и т.д.). Многие объекты, имея икосаэдрическую симметрию, не имеют икосаэдрической формы. Икосаэдр – это геометрическая фигура, имеющая 12 вершин, 20 граней, 20 ребер.

Наименьшее число структурных элементов, способных образовать икосаэдр, равно 60, однако капсиды сложноустроенных вирусов могут быть образованы 60 n структурными элементами. Для описания икосаэдрической упаковки структурных элементов в капсиде введено так называемое ***триангуляционное число*** (Т). Это число, равное частному от деления числа субъединиц на 60. Так, у вируса некроза табака и фага φX174 Т = 1 (60 субъединиц), многие вирусы растений имеют Т = 3 (180 субъединиц), вирус Синдбис имеет Т = 4 (240 субъединиц), ротавирус имеет Т = 13 (780 субъединиц).

Многие крупные икосаэдрические вирусы для получения плотной упаковки капсида формируют субтриангуляции на основе структур меньших размеров, что предполагает наличие разных типов субъединиц на вершинах икосаэдра и нарушение локальной симметрии в местах их контактов. В этом случае наблюдается расхождение между реально существующей симметрией ВЧ и видом структуры с соответствующим числом Т. Наиболее простую конструкцию капсида, построенного по такому принципу, имеют паповавирусы. Их капсид образован 72 морфологическими единицами, каждая построена из трех белковых субъединиц, организованных в пентамеры, а ВЧ имеет вид структуры с Т = 7.

Более сложная структура вириона наблюдается у аденовируса, капсид которого организован по принципу ансамблей, обладает строгой икосаэдрической симметрией и имеет вид структуры с Т = 25. На вершинах икосаэдра находятся кластеры – пентоны, содержащие в основании так называемые фибры – стержень с утолщением на конце. Остальная структура капсида построена из гексонов. Гексоны и пентоны – это простейшие подструктуры капсида аденовирусов. Всего в состав аденовириона входит 12 оснований пентонов и 240 гексонов. При диссоциации в мягких условиях образуются надструктуры (капсомеры), состоящие из 9-ти гексонов.

Еще более сложноустроенные вирионы, на пример частицы бактериофагов Т-чётной серии, обладают ***комбинированным*** типом симметрии. Так, головка бактериофага Т4 имеет икосаэдрический тип симметрии, а сокращенный чехол хвостового отростка обладает спиральным типом симметрии. В целом вирион фага Т4 обладает комбинированным типом симметрии.

Строение вирионов с оболочкой. Другой тип вирусных частиц – это покрытые или оболочечные вирионы. Оболочечные вирионы, также как и непокрытые, могут быть палочковидными, нитевидными и изометрическими разной формы – от четко очерченных кирпичеобразных вирионов вируса оспы до плейоморфных частиц вирусов герпеса и коронавирусов, имеющих различные размеры и форму.

Оболочка вириона (пеплос, суперкапсид) состоит из липидсодержащей мембраны клеточного происхождения (цитоплазматической мембраны, мембраны эндоплазматического ретикулюма или аппарата Гольджи, ядерной мембраны) и вирусных гликопротеинов, встроенных в мембрану. Оболочку вирионы приобретают в процессе почкования через ту или иную мембрану.

Вирусные гликопротеины, находящиеся в мембране, как правило, формируют поверхностные выступы, называемые шипами и пепломерами. Эти поверхностные выступы характеризуются разной степенью упорядоченности и могут быть представлены одним белком (вирус кори) или двумя разными белками (вирусы гриппа, ретровирусы), могут быть образованы мономерами белка или его димерами и тримерами.

Таким образом, структурная организация вириона описывается двумя характеристиками – наличием/отсутствием оболочки и типом симметрии капсида. Оболочечные вирионы могут обладать икосаэдрической, спиральной и комбинированной симметрией капсида, также как и безоболочечные.

3.2 Морфогенез вирусов

При внутриклеточной репродукции вирусов формируются структуры, отсутствующие в незаряженных вирусом клетках. Эти образования – места синтеза и сборки субвирусных структур (компонентов дочерних вирионов) получили разные наименования – клеточные матриксы «фабрики», виропласты, включения. Эти структуры являются продуктами кооперативных процессов клетки и вируса, где главенствующая роль принадлежит клетке.

Морфологически матриксы выглядят по-разному у разных вирусов. Обычно

это места синтеза белков, и поэтому в матриксах обнаруживаются значительные скопления рибосом (полисомы). В их состав входят также разные клеточные структуры – мембраны, микротрубочки, и т. п. При этом матриксы проделывают определенный цикл развития. Если вначале в них превалируют полисомы, то позже являются субвирусные компоненты, которые можно выявить при использовании серологических методов исследования типа ИФ или ИЭМ, а нередко и при обычной ЭМ. При ряде инфекций матриксы связаны с мембранами эндоплазматической сети, аппаратом Гольджи и другими клеточными структурами, куда транспортируются все вирусные компоненты.

Образования, сходные с цитоплазматическими матриксами, обнаружены также в ядрах, где происходит репродукция большинства ДНК-содержащих вирусов. При окрашивании клеток они имеют вид внутриядерных включений. На поздних стадиях инфекции в матриксах или по соседству с ними накапливается большое число вирионов, часто образующих кристаллоподобные формирования. Внутриядерные кристаллоподобные включения обнаружены, например, у реовирусов, аденовирусов, паповавирусов, парвовирусов. Процесс формирования вирионов у вирусов, имеющих липопротеидные оболочки, значительно более сложен, чем у просто устроенных вирусов, и протекает многоступенчато. Так, например, изометрические нуклеокапсиды вируса герпеса формируются в ядрах и в дальнейшем транспортируются в цитоплазму путем почкования через ядерную мембрану. После этого вирионы транспортируются к аппарату Гольджи, проходя через мембрану эндоплазм этической сети и захватывая ее, как это было при прохождении через ядерную мембрану. Поэтому внеклеточный вирус имеет две оболочки, одна из которых формируется из ядерной, вторая – из цитоплазматической мембраны.

Формирование РНП вирионов парамиксовирусов происходит в цитоплазме, где они накапливаются в виде тяжей и затем транспортируются к плазматической мембране. В это время плазматическая мембрана клетки уже модифицирована, так как в нее встроены с наружной стороны вирусные гликопротеиды, а с внутренней стороны – матриксный белок. При приближении к таким модифицированным участкам плазматической мембраны рибонуклеопротеидные тяжи свертываются в плотно

упакованные клубки и, проходя через плазматическую мембрану, покрываются ею, приобретая таким путем внешнюю оболочку. Этот тип формирования вирионов называется почкованием. Почкование может происходить и во внутриклеточные вакуоли.

Морфогенез вируса оспы еще более сложен. В цитоплазме образуются сложные матриксы, в которых происходит синтез многочисленных вирусспецифических структур. Здесь же происходит и формирование вирионов, которые вначале представляют пузырчатые образования, и лишь позже из этих предшественников формируются зрелые вирионы. Выход вирусных частиц из клетки осуществляется либо путем почкования через мембраны во внутриклеточные вакуоли, либо при разрушении клетки.

3.3 Биофизические свойства вирусов

Биофизические свойства вирусов характеризуются многими показателями – седиментацией, плотностью, вязкостью вирусных суспензий, диффузионными свойствами. Все эти характеристики относятся также к субвирусным компонентам. Наиболее важными биофизическими характеристиками вирусов являются седиментационные и плотностные свойства. Они чаще всего измеряются при исследовании вирусов.

Седиментационные свойства вирусов и субвирусных компонентов измеряют с помощью центрифугирования в аналитических и препаративных ультрадентрифугах. Коэффициент седиментации выражают в единицах Сведберга в переводе на стандартные условия при температуре 20 °С в воде и обозначают как S_{20w}.

Коэффициенты седиментации вирионов зависят от многих факторов: от их размера и массы, плотности, формы. Для определения плотности вирионов и субвирусных структур применяют равновесное центрифугирование в градиентах плотности. Для вирионов и вирусных нуклеопротеидов обычно используют градиенты плотности сахарозы и хлорида цезия.

Плотность вирионов и субвирусных структур зависит, прежде всего, от их со-

става. Она увеличивается с увеличением процента содержания нуклеиновых кислот и уменьшается при повышении содержания белков и липидов.

3.4 Устойчивость вирусов в окружающей среде

Разные группы вирусов обладают неодинаковой устойчивостью во внешней среде. Наименее устойчивыми являются вирусы, имеющие липопротеидные оболочки, наиболее устойчивыми – изометрические вирусы. Так, например, ортомиксовирусы и парамиксовирусы инактивируются на поверхностях в течение нескольких часов, тогда как вирусы полиомиелита, аденовирусы, реовирусы сохраняют инфекционную активность в течение нескольких дней.

Однако из этого общего правила имеются и исключения. Так, вирус оспы устойчив к высыханию и сохраняется в экскретах в течение многих недель и месяцев. Вирус гепатита В устойчив к действию неблагоприятных внешних факторов и сохраняет свою активность в сыворотке даже при кратковременном кипячении.

Чувствительность вирусов к ультрафиолетовому и рентгеновскому облучению зависит преимущественно от размеров их генома. Поэтому, например, вирус осповакцины (молекулярная масса генома около 2×10^8) инактивируется при рентгеновском облучении около 5×10^4 рад, в то время как мелкий вирус папилломы (молекулярная масса генома 3×10^6) для инактивации требует облучения 4×10^5 рад.

Чувствительность вирусов к инактивации формальдегидом и другими химическими веществами, инактивирующими генетический материал, зависит от многих условий, среди которых следует назвать плотность упаковки нуклеиновой кислоты в белковый футляр, размеры генома, наличие или отсутствие внешних оболочек и т.п. Вирусы, имеющие липопротеидные оболочки, чувствительны к эфиру, хлороформу и детергентам, в то время как просто устроенные изометрические и палочковидные вирусы устойчивы к их действию.

Наконец, важной особенностью вирусов является чувствительность к pH. Есть вирусы, устойчивые к кислым значениям pH (2,2—3,0), например, вирусы, вызы-

вающие кишечные инфекции и проникающие в организм алиментарным путем. Однако большинство вирусов инактивируется при кислых и щелочных значениях pH.

3.5 Классификация вирусов

Современная классификация вирусов является универсальной для вирусов позвоночных, беспозвоночных, растений и простейших. Она основана на фундаментальных свойствах вирионов, из которых ведущими являются признаки, характеризующие нуклеиновую кислоту, морфологию, стратегию генома и антигенные свойства (рисунок 3). Фундаментальные свойства поставлены на первое место, поскольку вирусы со сходными антигенными свойствами обладают и сходным типом нуклеиновой кислоты, сходными морфологическими и биофизическими свойствами.

Рисунок 3 – Схематическое строение семейств вирионов, поражающих позвоночных

Важным признаком для классификации, который учитывается наряду со структурными признаками, является стратегия вирусного генома, под которой понимают используемый вирусом способ репродукции, обусловленный особенностями его генетического материала. Например, полярность вирусной РНК является основным критерием для группировки вирусов и при отсутствии общих антигенных свойств.

Антигенные и другие биологические свойства являются признаками, лежащими в основе формирования вида и имеющими значение в пределах рода.

В основу современной классификации положены следующие основные критерии:

1) тип нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК), ее структура (количество нитей);

2) наличие липопротеидной оболочки;

3) стратегия вирусного генома;

4) размер и морфология вириона, тип симметрии, число капсомеров;

5) феномены генетических взаимодействий;

6) круг восприимчивых хозяев;

7) патогенность, в том числе патологические изменения в клетках и образование внутриклеточных включений;

8) географическое распространение;

9) способ передачи;

10) антигенные свойства.

На основании перечисленных признаков вирусы делятся на семейства, подсемейства, роды и типы. Деление на семейства произведено по критериям, изложенным в пунктах 1 и 2, деление на роды и типы – на основании нижеперечисленных признаков. Схематически строение семейств вирионов, поражающих позвоночных, приведено на рисунке 5 Дополнительно выделены еще 2 семейства: Gepadnaviridae и Flaviviridae (выделенные из семейства Togaviridae).

Современная классификация вирусов человека и животных охватывает более 4/5 всех известных вирусов, которые распределены в 19 семейств, из них 7 – ДНК-содержащих и 12 – РНК-содержащих вирусов. Некоторые допускаются привычные

латинизированные обозначения, цифры при обозначении типов, сокращения, буквы и их сочетания.

3.6 Характеристика геномов вирусов

В начале 1940-х годов стало более или менее ясно, что вирусы, как и другие живые организмы, содержат нуклеиновые кислоты. Однако, особенность строения вирусного генома заключается в том, что наследственная информация может быть записана как на ДНК, так и РНК в зависимости от типа вируса. Уникальное свойство вирусной РНК хранить наследственную информацию впервые было продемонстрировано Гирером, Шраммом и Френкель-Конратом при изучении инфекционности РНК вируса табачной мозаики (ВТМ). Было показано, что очищенные препараты РНК ВТМ сохраняют инфекционность при полном отсутствии белка. Это открытие противоречило всеобщему убеждению, что единственная роль РНК заключается в передаче информации от ДНК к белку. В настоящее время способность РНК служить хранилищем генетической информации уже ни у кого не вызывает сомнений.

Следует учитывать, что наличие одного вида нуклеиновой кислоты является характеристикой вириона, но не вируса. В жизненном цикле ДНК-содержащих вирусов геномная нуклеиновая кислота транскрибируется, образуя РНК. Присутствие у ДНК-содержащих вирусов (вирус осповакцины) ДНК-зависимой РНК-полимеразы было показано в 1967 г. Катес и МакАусланом. РНК-содержащие вирусы транскрибируют свой геном с использованием РНК-зависимой РНК-полимеразы, впервые обнаруженной у реовирусов в 1968 г. Целый ряд РНК-содержащих вирусов имеют в жизненном цикле стадию обратной транскрипции и синтезируют ДНК на матрице РНК с помощью фермента обратной транскриптазы (РНК-зависимая ДНК-полимераза или ревертаза). Открытие этого фермента в составе онкогенных РНК-содержащих вирусов сделано Балтимором в 1970 г.

Примерно 20 % вирусов имеют ДНК-геном, 80 % – РНК-геном. При этом РНК-геномные вирусы более древние в эволюционном отношение, нежели ДНК-геномные. Современные гипотезы предполагают, что примерно 4 миллиарда лет на-

зад существовал мир РНК, в основе которого лежала РНК-самокопирующаяся система, обладающая каталитической активностью. Не исключается, что на этом этапе молекулярной эволюции уже существовали примитивные самореплицирующиеся вирусоподобные системы, отражением чего являются дошедшие до нашего времени вироиды – кольцевые РНК, обладающие рибозимазной активностью. На следующем этапе молекулярной эволюции РНК приобрела РНК-связывающие белки, которые выполняли роль кофакторов, стабилизирующих рибозимы. Возникновение систем РНК/белок явилось основой для появления сначала грубо-специфических белков-ферментов, а затем полимераз, совершенствование которых составило предмет эволюции механизмов репликации нуклеиновых кислот.

3.6.1 Особенности организации нуклеиновых кислот вирусов

По своей химической природе нуклеиновые кислоты вирусов не отличаются от нуклеиновых кислот клеток (организмов) и представляют собой полинуклеотидные цепи, образованные чередованием четырех дезоксирибонуклеотидов в случае ДНК или рибонуклеотидов в случае РНК, соединенных фосфодиэфирными связями. Нуклеотид представляет собой азотистое основание (аденозин (A), гуанозин (G), цитидин (C), тимидин (T) или уридин (U) в случае РНК), связанное с дезоксирибозой (в ДНК), или рибозой (в РНК) гликозидной связью. Фосфорная кислота в нуклеиновых кислотах присоединяется сложноэфирной связью к 3’- и 5’-OH группам сахаров смежных нуклеотидов. Отличительной особенностью ДНК целого ряда вирусов бактерий является наличие метилированных оснований (5’-метилцитозина, 6’-метиламинопурина), которые могут входить в состав ДНК в качестве минорных или мажорных оснований. Так, ДНК фагов fd и φX174 (колифаги) содержит 1-2 метилированных основания, а в ДНК фага X12, лизирующего морскую бактерию *Xantomonas oryza*, вообще нет обычного цитозина, который полностью замещен 5-метилцитозином. Источником происхождения таких оснований является энзиматическое метилирование уже синтезированной цепи ДНК. Данный процесс осуществляют вирусспецифические метилазы, которые используют в качестве донора ме-

тильных групп S-аденозилметионин клетки хозяина.

Вирусные нуклеиновые кислоты характеризуются поразительным разнообразием форм. Вирусный геном может быть представлен как однонитчатыми, так и двунитчатыми молекулами РНК и ДНК. ДНК может быть как линейной, так и кольцевой молекулой (таблица 1), РНК – как непрерывной, так и фрагментированной и кольцевой молекулой (таблица 2, рисунок 4).

Таблиц 1 – Виды ДНК-геномов вирусов

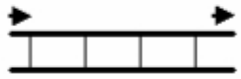
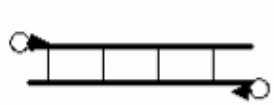
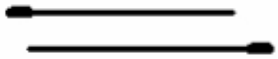
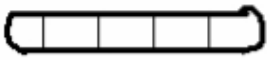
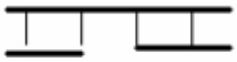
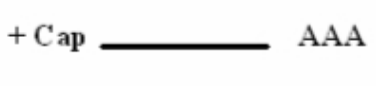
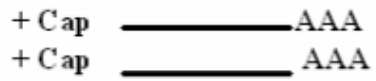
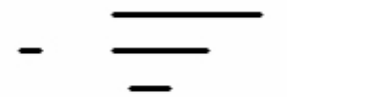
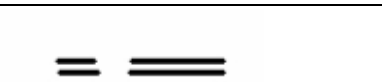
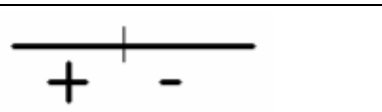
	двунитевая, линейная с прямыми концевыми повторами	Герпесвирусы, Фаги Т2, Т7
	двунитевая, линейная с инвертированными повторами и терминальными белками	Аденовирусы
	двунитевая, линейная с липкими концами	Фаг λ
	двунитевая с ковалентно-замкнутыми концами (терминальные петли)	Поксвирусы, Иридовирусы
	двунитевая с разрывами одной цепи	Фаг Т5
	частично двунитевая, кольцевая	Гепаднавирусы
	двунитевая, кольцевая	Папиломавирусы, Фаг RM2
	двунитевая, кольцевая, сегментированная	Полиднавирусы
	однонитевая, кольцевая	Фаги φX174, M13
	однонитевая, линейная с самокомплиментарной 3’-последовательностью	Парвовирусы

Таблица 2 – Виды РНК-геномов вирусов

	5’-Кэп, 3’-поли-А	Флавивирусы Коронавирусы
	5’-Кэп, 3’-тРНК-подобная структура	ВТМ
	5’-терминальный белок	Калицивирусы Пикорнавирусы Потивирусы
	диплоидный набор	Ретровирусы
	однонитевая, линейная	Парамиксовирусы Рабдовирусы
	однонитевая, линейная, сегментированная	Ортомиксовирусы (8сегментов)
	однонитевая, кольцевая, сегментированная	Буньямвирусы, Аренавирусы
	Двунитевая, линейная, сегментированная	Реовирусы (10-11 сегментов)
	Обоюдозначащая (амбисенс-РНК)	S-сегмент аренавирусов Тосповирусы

При обсуждении вопроса организации генома вирусов необходимо выделить ряд его характерных отличий от геномов организмов.

Размеры. Если ориентировочно учесть, что геном эукариот имеет размер $4Ч10^9$ п.н. и длину, достигающую 1,5-2 метра, а геном прокариот – $6Ч10^6$ п.н., то размеры геномов вирусов значительно меньше. Так, размер генома крупных ДНК-содержащих вирусов составляет только $2\text{-}4Ч10^5$ п.н. (200-450 т.п.н. у поксвирусов и вирусов герпеса), минимальные вирусы имеют геном длиной 1 мкм и состоящий из

1,2 т.п.н. Самый маленький геном среди вирусов, поражающих человека, имеет вирус гепатита В (3,2 т.п.н.).

Экономичность. Размеры геномов вирусов определяются емкостью капсида вириона. В связи с этим, вирусы очень экономно хранят генетическую информацию, что проявляется отсутствием многократно повторяющихся генов и, часто, наличием перекрывающихся открытых рамок считывания.

Наличие двух типов геномов. Носителем генетической информации у вирусов может быть как ДНК, так и РНК.

Многообразие структурных форм ДНК и РНК. Природа как бы испробовала на вирусах все возможные варианты структурной организации нуклеиновых кислот, которые представлены на рисунок 4.

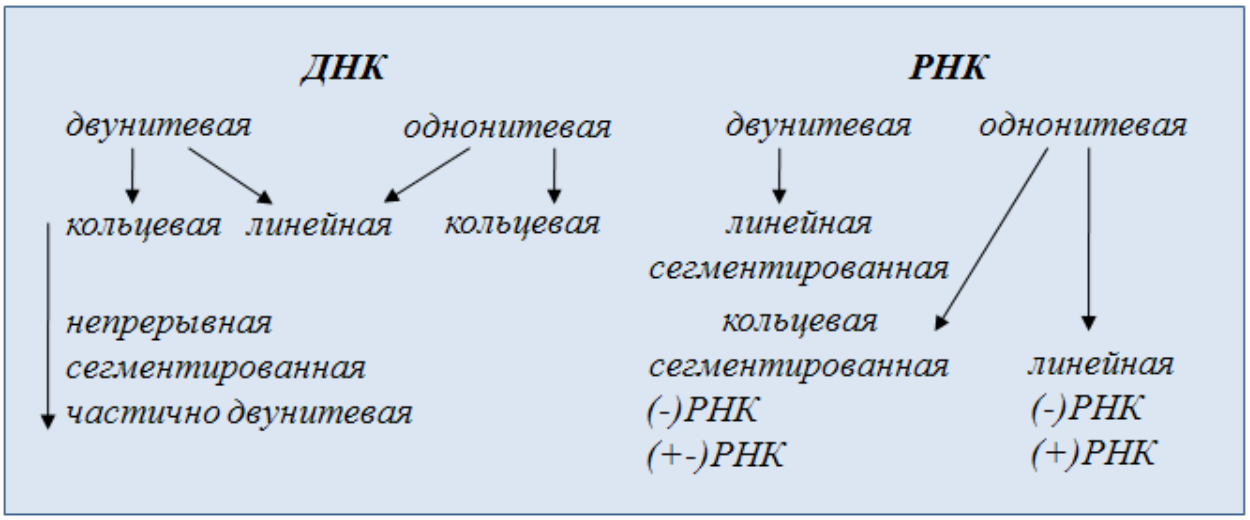


Рисунок 4 – Схема, иллюстрирующая виды нуклеиновых кислот вирусов

Способ укладки. Способ укладки зависит от вида генома: (+)РНК может быть «голой»; (-)РНК, как правило, ассоциирована с белками нуклеокапсида и образует структуру под названием рибонуклеопротеид (РНП); ДНК вирусов ассоциирована с белками, подобными гистонам эукариот, и организована в виде типичных нуклеосом.

Разнообразие стратегий репликации, основанных на ДНК-зависимом синтезе ДНК, РНК-зависимом синтезе РНК и РНК-зависимом синтезе ДНК.

Изменчивость РНК. Полимеразы, катализирующие репликацию РНК, и обратная транскриптаза имеют минимальные возможности для исправления ошибок синтеза. В результате, частота возникновения ошибок при синтезе РНК приблизительно в 10 тысяч раз выше, чем при репликации ДНК, и она зависит от числа нуклеотидов, составляющих вирусный геном. Это означает, что геном любой индивидуальной частицы РНК- содержащего вируса будет содержать одну или несколько мутаций, отличающих его от последовательности дикого типа данной вирусной разновидности. Этот простой факт имеет далеко идущие последствия для биологии и эволюции РНК-содержащих вирусов, потому что потомство РНК-вируса (природное или лабораторное) представляет собой не совокупность однородных двойников, а скорее молекулярный рой родственных нуклеотидных последовательностей, сгруппированных в месте синтеза последовательностей. Этот молекулярный рой или “квази-разновидность” обеспечивает источник фенотипических вариантов, которые могут быстро ответить на изменяющееся давление естественного отбора. Как следствие, РНК-содержащие вирусы могут эволюционировать в миллион раз быстрее чем, ДНК-организмы. В тоже время высокая изменчивость РНК не обеспечивает быструю эволюцию РНК-содержащих вирусов, так, как размеры генома вирусов налагают верхние пределы на высокую норму ошибок полимеразы. Комбинация уровня репликационных ошибок и размера генома определяют “порог ошибки”, выше которого вирус не может поддерживать целостность последовательности квазиразновидностей. В результате, немногие РНК вирусы имеют размер генома более 30 килобаз (kb), чаще всего он колеблется в пределах 5-15 kb.

Принимая во внимание, что генетически разнообразное потомство может нести летальные мутации, что снижает потенциал для быстрого эволюционного ответа, РНК-геномы этого размера сбалансированы ниже их порогов ошибки.

Детально рассмотрим особенности организации вирусных ДНК и РНК.

Вирусные ДНК

Молекулярная масса вирусных ДНК варьирует в широких пределах от 1Ч10^6 до 250Ч10^6. Самые большие вирусные геномы содержат несколько сотен генов, а самые маленькие содержат информацию, достаточную для синтеза лишь нескольких

белков.

В геномах, представленных двунитчатыми ДНК, информация обычно закодирована на обеих нитях ДНК. Это свидетельствует о максимальной экономии генетического материала у вирусов, что является неотъемлемым свойством их как генетических паразитов. В связи с этим оценка генетической информации не может быть проведена по молекулярной массе молекул.

Хотя в основном структура ДНК уникальна, т. е. большинство нуклеотидных последовательностей встречаются лишь по одному разу, однако на концах молекул имеются повторы, когда в концевом фрагменте линейной ДНК повторяется ее начальный участок. Повторы могут быть прямыми и инвертированными.

Способность к приобретению кольцевой формы, которая потенциально-заложена в концевых прямых и, инвертированных повторах, имеет большое значение для вирусов. Кольцевая форма обеспечивает устойчивость ДНК к экзонуклеазам. Стадия образования кольцевой формы обязательна для процесса интеграции ДНК с клеточным геномом. Наконец, кольцевые формы представляют собой удобный и эффективный способ регуляции транскрипции и репликации ДНК.

В составе вирионов, содержащих однонитчатую ДНК, обычно содержатся молекулы ДНК одной полярности. Исключение составляют аденоассоциированные вирусы, вирионы которых содержат ДНК либо одной полярности (условно называемой «плюс»), либо ДНК с противоположным знаком (условно – «минус»). Поэтому тотальный препарат вируса состоит из двух типов частиц, содержащих по одной молекуле «плюс» – ДНК или «минус» – ДНК.

Инфекционный процесс при заражении этими вирусами возникает лишь при проникновении в клетку частиц обоих типов.

Вирусные РНК

Из нескольких сотен известных в настоящее время вирусов человека и животных РНК-геном содержит около 80% вирусов. Способность РНК хранить наследственную информацию является уникальной особенностью вируса.

У просто организованных и некоторых сложно организованных вирусов вирусная РНК в отсутствие белка может вызвать, инфекционный процесс. Впервые

инфекционная активность РНК вируса табачной мозаики была продемонстрирована Х. Френкель-Конратом и соавт. в 1957 г. и А. Гирером и Г. Шраммом в 1958 г. Впоследствии положение об инфекционной активности РНК было перенесено на все РНК-содержащие вирусы, однако долголетние усилия доказать это для таких вирусов, как вирусы гриппа, парамиксовирусы, рабдовирусы (так называемые минус-нитевые вирусы), оказались бесплодными: у этих вирусов инфекционной структурой являются не РНК, а комплекс РНК с внутренними белками. Таким образом, геномная РНК может обладать инфекционной активностью в зависимости от своей структуры.

Структура вирусных РНК чрезвычайно разнообразна. У вирусов обнаружены однонитчатые и двунитчатые, линейные, фрагментированные и кольцевые РНК. РНК-геном в основном является гаплоидным, до геном ретровирусов – диплоидный, т.е. состоит из двух идентичных молекул РНК (таблица 2).

Многообразие видов РНК-геномов расширяется за счет существования последовательностей, отличающихся направлением связей сахаро-фосфатного остова. Однонитевые РНК могут иметь позитивную полярность – (+)РНК, негативную полярность – (-)РНК или могут быть представлены обоюдозначащей цепью – (+/-)РНК (амбисенс стратегия кодирования). В свою очередь, РНК позитивной полярности могут иметь разную структурную организацию. Являясь матричной РНК, могут иметь на 5’- конце кэп (7-метилгуанозин), а на 3’-конце – поли-А последовательность; могут не иметь кэпа или поли-А; могут иметь на 5’-конце геномный белок; могут иметь на 3’-конце тРНК-подобную или шпильковую структуру.

Однонитчатые РНК. Молекулы однонитчатых вирусных РНК существуют в форме одиночной полинуклеотидной цепи со спирализованными ДНК-подобными участками. При этом не комплементарные нуклеотиды, разделяющие комплементарные участки, могут выводиться из состава спирализованных участков в форме различных «петель» и «выступов» (рисунок 5). Суммарный процент спирализации вирусных РНК не обнаруживает, каких-либо особенностей по сравнению с таковыми у клеточных РНК.

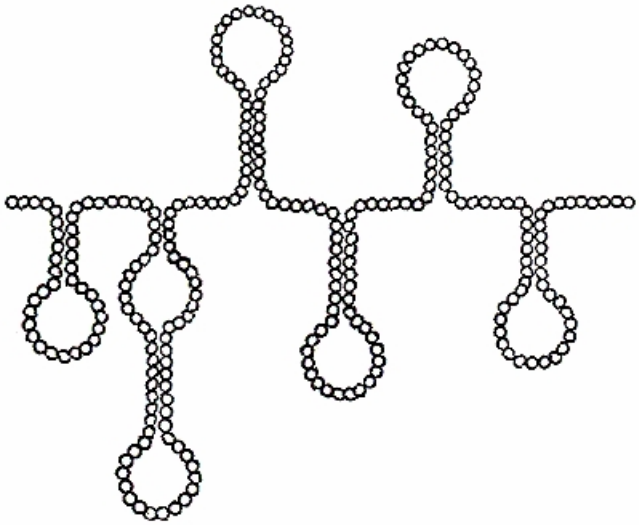


Рисунок 5 – Вторичная структура вирусных РНК

Вирусы, содержащие однонитчатые РНК, делятся на две группы. У вирусов первой группы вирусный геном обладает функциями информационной РНК, т.е. может непосредственно переносить закодированную в нем информацию на рибосомы. По предложению Д. Балтимора (1971) РНК со свойствами информационной условно обозначена знаком «плюс» и в связи с этим вирусы, содержащие такие РНК (пикорнавирусы, тогавирусы, коронавирусы, ретровирусы), обозначены как «плюс-нитевые» вирусы, или вирусы с позитивным геномом.

Вторая группа РНК-содержащих вирусов содержит геном в виде однонитчатой РНК, которая сама не обладает функциями иРНК. В этом случае функцию иРНК выполняет РНК, комплементарная геному. Синтез этой РНК (транскрипция) осуществляется в зараженной клетке на матрице геномной РНК с помощью вирусоспецифического фермента – транскриптазы. В составе «минус-нитевых» вирусов обязательно присутствие собственного фермента, осуществляющего транскрипцию геномной РНК и синтез иРНК, так как аналога такого фермента в клетках нет. Геном этих вирусов условно обозначают как «минус»-РНК, а вирусы этой группы как «минус-нитевые» вирусы, или вирусы с негативным геномом. К этим вирусам относятся ортомиксовирусы, парамиксовирусы, буньявирусы, рабдовирусы. РНК этих вирусов не способна вызвать инфекционный процесс.

В соответствии с разными свойствами вирусных РНК между двумя группами вирусов есть и структурные различия. Поскольку РНК «плюс-нитевых» вирусов выполняет функцию иРНК, она имеет специфические структурные особенности, характерные для 5'- и 3'-концов этих РНК. 5'-Конец клеточных и вирусных РНК обычно имеет структуру так называемой шапочки (по-английски «cap»):

$5'm^7GpppG^m\ C...AAAA3',$

где m^7G представляет собой 7-метилгуанин, присоединенный через пирофосфатную связь к гуаниловому нуклеотиду, сахарный остаток которого также метилирован по второму углеродному атому. Эти модификации концов иРНК, осуществляемые после синтеза долинуклеотидной цепи, имеют существенное значение для функции иРНК: «шапочка» нужна для специфического узнавания иРНК рибосомами, функции поли (А) менее точно определены и, по-видимому, заключаются в придании стабильности молекулам иРНК. Такими же модифицированными концами обладают геномные РНК «плюс-нитевых» вирусов. Исключение составляет 5'-конец геномной РНК вируса полиомиелита, которая не содержит «шапочку», и вместо нее имеет на 5'-конце ковалентно присоединенный к остатку урацила низкомолекулярный терминальный белок. Геномные РНК «минус-нитевых» вирусов не имеют ни «шапочки», ни поли (А); модифицированные концы характерны для иРНК этих вирусов, синтезирующихся в клетке на матрице вирионной РНК и комплементарных ей. Геномная РНК ретровирусов, хотя и является «плюс-нитевой», однако не содержит «шапочку»; эту структуру содержит гомологичная РНК, синтезируемая на матрице интегрированной провирусной ДНК.

Существуют вирусы, содержащие как «плюс-нитевые», так и «минус-нитевые» РНК гены (амбисенс-вирусы). К ним относятся аренавирусы.

В основном однонитчатые РНК являются линейными молекулами, однако РНК-фрагменты буньявирусов обнаружены в виде кольцевой формы. Кольцевая форма возникает за счет образования водородных связей между концами молекул.

Двунитчатые РНК. Этот необычный для клетки тип нуклеиновой кислоты, впервые обнаруженный у реовирусов, широко распространен среди вирусов животных, растений и бактерий. Вирусы, содержащие подобный геном, называют диплор-

навирусы.

Общей особенностью диплорнавирусов является фрагментированное состояние генома. Так, геном реовирусов состоит из 10 фрагментов, ротавирусов – из 11 фрагментов.

3.6.2 Хранение генетической информации. Способы увеличения информационной емкости вирусного генома

Как и в других живых системах, у вирусов соответствие между аминокислотной последовательностью белка и нуклеотидной последовательностью геномной нуклеиновой кислоты устанавливается с помощью универсального вырожденного генетического кода, где кодирующей единицей является триплет нуклеотидов (кодон). В вирусных системах используются те же наборы кодоновых значений, что и в бактериальных, архейных и эукариотических системах. Однако у вирусов генетическая информация может храниться, как в смысловой полинуклеотидной цепи, так и в последовательности матричной цепи.

Для сохранения генетической информации в окружающей среде и передачи ее новому поколению вирусы упаковывают геномные нуклеиновые кислоты в белковый капсид и часто в суперкапсид (липидсодержащая оболочка), формируя внеклеточную форму вируса – вирион. Как правило, вирионы, попадая в клетку, обеспечивают продуктивный инфекционный цикл, давая вирусное потомство. Однако целый ряд так называемых интегративных вирусов встраивают свой геном в хромосомы хозяина, в том числе клеток зародышевой линии, обеспечивая длительное сохранение генетической информации вируса в ряду поколений хозяина.

Несмотря на микроскопические размеры, нуклеиновые кислоты вирусов несут информацию не только о капсидных белках, но и о ферментах, необходимых для синтеза ДНК, РНК и их модификации, для синтеза РНК транскриптов и их процессинга, для обеспечения синтеза белков и их посттрансляционной модификации и воздействия на биосинтетические процессы клетки-хозяина. Данный факт объясняется наличием разнообразнейших механизмов увеличения генетической информа-

ции. Так, к способам увеличения информационной емкости вирусного генома являются: 1) двукратное считывание одной и той же иРНК, но с другого инициирующего кодона; 2) сдвиг рамки трансляции; 3) сплайсинг; 4) транскрипция с перекрывающихся областей ДНК и др.

Так, генетический материал мелкого бактериофага φX174 представлен одноцепочечной ДНК и состоит всего из 9 генов, продукты которых хорошо изучены. ДНК, необходимая для кодирования этих продуктов, должна состоять минимум из 6078 нуклеотидов. На самом же деле хромосома фага состоит из 5374 нуклеотидов. Этот парадокс был разрешен после проведения в 1978 г. группой Ф.Сенгера полного секвенирования ДНК этого фага. Оказалось, что кодирующие последовательности двух генов (B и E) локализованы внутри кодирующих последовательностей двух других генов (A и D). При этом рамка считывания в каждом случае оказывалась сдвинутой на одну пару нуклеотидов. Например, в определенном участке внутри гена D находится последовательность, которая в полипептиде D кодирует последовательность Валин-тирозин-глицин-треонин. Рамка считывания гена E смещена вправо на один нуклеотид от рамки считывания гена D. Поэтому триплет ATG распознается РНК-полимеразой как стартовый и в полипептиде E появляется формилметионин, за которым последует Валин, кодируемый триплетом GTA, и т.д.

Сходным образом кодирующая последовательность гена B оказывается внутри кодирующей последовательности гена A. В результате сдвига рамки считывания кодируемые перекрывающимися генами полипептиды полностью отличаются друг от друга по последовательностям аминокислот. Вместе с тем в случае замены или делеции одного нуклеотида инактивируются сразу два гена.

Подобная ситуация «ген внутри гена» обнаружена в ряде других случаев. Частично перекрывающиеся кодирующие последовательности обнаружены в ДНК вируса млекопитающих SV40. У РНКового фага MS2 один из генов перекрывает два

других и, следовательно, не перекрывается лишь один из фаговых генов.

В составе иРНК обычно встречается несколько инициирующих кодонов. В соответствии с принятой в настоящее время гипотезой «сканирующей модели» малая рибосомальная субъединица связывается с иРНК около 5'-конца и скользит вниз до встречи с инициирующим кодоном. Однако инициация в большинстве случаев происходит не с первого инициирующего кодона, а с последующих АУГ-кодонов. «Правильный» функционирующий АУГ-кодон узнается рибосомой благодаря окружающим его последовательностям («фланкирующим нуклеотидам»). В том случае, если первый инициирующий кодон находится в менее благоприятном окружении, чем последующие АУГ-кодоны, большинство малых рибосомальных субъединиц пройдут этот кодон и начнут инициацию трансляции с последующих АУГ-кодонов, однако некоторые субъединицы начнут инициацию с первого АУГ-кодона. В этом случае одна иРНК может направить синтез двух белков разной длины. Такие иРНК имеются у многих вирусов: SV40, герпеса, аденовирусов, буньявирусов, реовирусов и др.

Трансляция может происходить без сдвига рамки и со сдвигом рамки. Генетический код является триплетным, это означает, что три нуклеотида, составляющих триплет, или кодон, кодируют одну аминокислоту. В том случае, если триплеты сохранены и генетический код не изменился, то при трансляции с двух разных инициирующих кодонов будут синтезироваться полипептиды, представляющие собой укороченную копию первого полипептида (трансляция без сдвига рамки).

В том случае, если произошел сдвиг на один или два нуклеотида, образуются новые триплеты (кодоны) и появляется новый генетический код. В этом случае одна молекула иРНК может транслироваться с образованием двух уникальных белков, т.е. таких белков, у которых нет идентичных аминокислотных последовательностей.

Сплайсинг со сдвигом рамки широко используется у ряда вирусов (вирусы гриппа, парамиксовирусы, буньявирусы, аденовирусы, паповавирусы, парвовирусы и др.). Например, все три иРНК аденоассоциированного вируса образуются при транскрипции одного гена и имеют общий 3'-конец, самая короткая иРНК образуется путем сплайсинга и транслируется с образованием трех структурных белков, ос-

тальные две иРНК транслируются с образованием неструктурных белков. В результате сплайсинга и сдвига рамки иРНК 7-го и 8-го генов вируса гриппа транслируются с образованием двух белков: полипептидов M_1 и M_2 (продукты 7-го гена) и NS_1 и NS_2 (продукты 8-го гена). Белки NS_1 а NS_2 имеют лишь первые 10 идентичных аминокислот, а затем – уникальные аминокислотные последовательности. Один и тот же ген парамиксовирусов (вирус Сендай) кодирует два уникальных белка: структурный белок Р и неструктурный белок С.

Одним из способов экономии генетического материала является нарезание полипептида-предшественника на участки разной длины, в результате чего образуются разные полипептиды с перекрывающимися аминокислотными последовательностями. Подобный механизм нарезания имеет место у аденоассоциированных вирусов и у SV40.

Таким образом, число реальных генов превосходит молекулярную массу генома. В результате перекрывания генов и сдвига рамки трансляции «размываются» границы генов, и понятие «ген» в известном смысле утрачивает первоначальное значение как дискретный фрагмент генома и приобретает скорее функциональное значение.

3.7 Реализация генетической информации у вирусов

Процесс репродукции вирусов может быть условно разделен на две фазы (рисунок 6). Первая фаза охватывает события, которые ведут к адсорбции и проникновению вируса в клетку, освобождению его внутреннего компонента и модификации его таким образом, что он способен вызвать инфекцию. Стадии первой фазы направлены на то, чтобы вирус был доставлен в соответствующие клеточные структуры, и его внутренний компонент был освобожден от защитных оболочек. Как только эта цель достигнута, начинается вторая фаза репродукции, в течение которой происходит экспрессия вирусного генома. Эта фаза включает в себя стадии:

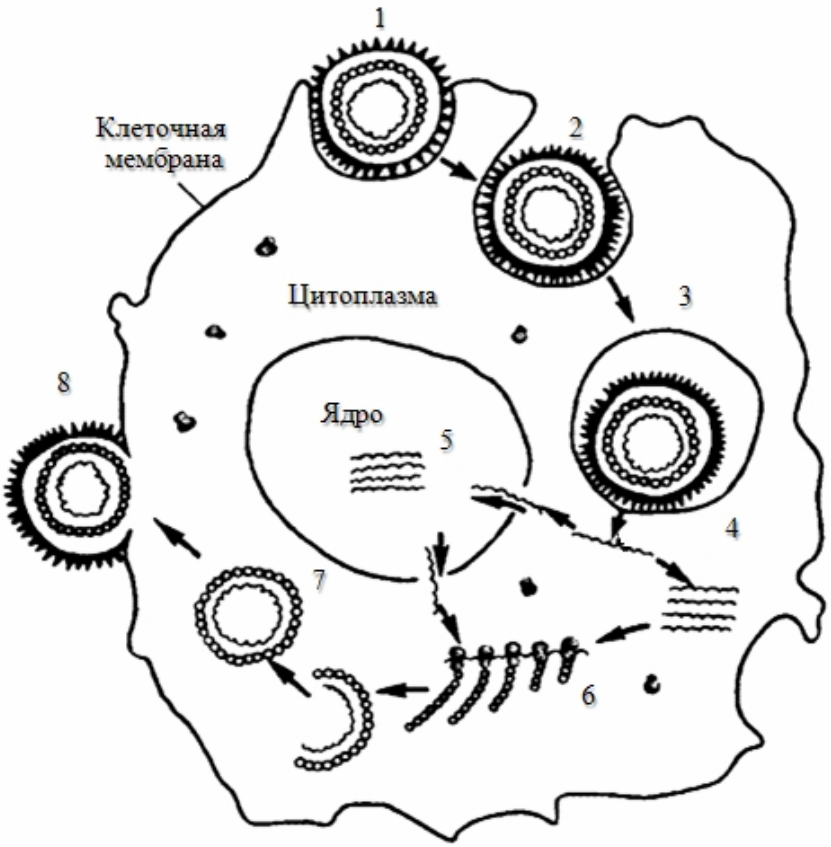
1) репликации генома,

2) транскрипции,

3) трансляции информационных РНК,

4) сборки вирусных компонентов.

Заключительной стадией репродукции является выход вируса из клетки.



1 – адсорбция вириона на клетке; 2 – проникновение вириона в клетку путем виропексиса; 3 – вирус внутри вакуоли клетки; 4 – раздевание вириона вируса; 5 – репликация вирусной нуклеиновой кислоты; 6 – синтез вирусных белков на рибосомах клетки; 7 – формирование вириона; 8 - выход вириона из клетки путем почкования

Рисунок 6 – Стадии репродукции вирусов (Микробиология и иммунология Под редакцией Воробьева А.А., М., 1999)

Адсорбция вируса обеспечивается взаимодействием его поверхностных белков со специфическими рецепторами чувствительных клеток. Проникновение вируса в клетку происходит либо путем виропексиса (рецепторного эндоцитоза), либо слияния оболочки вируса с клеточной мембраной (при наличии белка слияния), или

в результате сочетания этих двух механизмов. В процессе проникновения вириона в клетку при участии клеточных ферментов происходит его депротеинизация, в результате которой удаляются поверхностные структуры вируса, и высвобождается его внутренний компонент (сердцевина, нуклеокапсид, нуклеиновая кислота).

Вирусная нуклеиновая кислота доставляется в соответствующие клеточные структуры и под действием лизосомальных ферментов клетки освобождается от защитных белковых оболочек. В итоге формируется уникальная биологическая структура: инфицированная клетка содержит 2 генома (собственный и вирусный) и 1 синтетический аппарат (клеточный).

При реализации внутриклеточной стадии жизненного цикла вирус осуществляет три молекулярных процесса: репликацию геномной нуклеиновой кислоты, транскрипцию и трансляцию. На каждой стадии вирус вмешивается в клеточные синтетические механизмы и подчиняет их своим задачам, создавая приоритеты для вирусных нуклеиновых кислот.

Биосинтез вирусных компонентов осуществляется в разных частях клетки, поэтому называется дизъюнктивным (от лат. disjunctus - разобщенный). Белки вируса синтезируются в результате транскрипции, т.е. переписывания информации с генома вируса на информационную РНК (иРНК) и последующей трансляции (считывание иРНК на рибосомах) с образованием белка вируса. Вирусная нуклеиновая кислота кодирует синтез структурных и неструктурных белков вируса. Структурные белки входят в состав вириона, а неструктурные – являются ферментами и обеспечивают репродукцию вируса. Одновременно с синтезом белка в клетке происходит и репликация (от лат. replicatio - повторение), т.е. синтез вирусных нуклеиновых кислот.

Формирование вирионов происходит путем самосборки: составные части вириона транспортируются в места сборки вируса в ядре или цитоплазме. Сборка компонентов вириона происходит за счет гидрофобных, ионных, водородных связей и стерического соответствия. В результате самосборки капсомеров, образовавшихся из вирусных полипептидов, и взаимодействия их с нуклеиновыми кислотами вируса образуются нуклеокапсиды. Суперкапсидная оболочка сложноорганизованных ви-

русов включает в себя кроме вирусспецифических белков еще компоненты мембраны клетки. Вновь сформировавшиеся вирионы пассивно в результате гибели клетки или активно путем почкования покидают клетку и оказываются в окружающей ее среде.

Таким образом, синтез вирусных нуклеиновых кислот и белков и сборка новых вирионов происходят в определенной последовательности (разобщены во времени) и в разных структурах клетки (разобщен в пространстве), в связи с чем способ репродукции вирусов и был назван дизъюнктивным (разобщенным). При абортивной вирусной инфекции процесс взаимодействия вируса с клеткой по тем или иным причинам прерывается до того, как произошло подавление клеточного генома. Очевидно, что в этом случае генетическая информация вируса реализована не будет и репродукции вируса не происходит, а клетка сохраняет свои функции неизменными.

При латентной вирусной инфекции в клетке одновременно функционируют оба генома, а при вирус-индуцированных трансформациях вирусный геном становится частью клеточного, функционирует и наследуется вместе с ним.

3.7.1 Репликация

Репликация геномов вирусов – это матричный комплементарный синтез нуклеиновых кислот, преследующий целью наработку геномных последовательностей для инкапсидации в вирион. ДНК-геномы реплицируются клеточными или вирусоспецифическими ДНК-полимеразами. РНК-геномы реплицируются вирусоспецифическими РНК-полимеразами, которые также являются и транскриптазами.

3.7.1.1 Основные принципы и механизмы репликации у вирусов

Репликация вирусных геномов происходит или одновременно с транскрипцией, или эти два процесса разделены во времени. Механизмы репликации геномов вирусов многообразны и определяются видом генома. Существует три модели репликации – полуконсервативная, консервативная и дисперсная.

Консервативная и дисперсная модели репликации нуклеиновых кислот установлены только у вирусов. Полуконсервативная модель предполагает, что после первого раунда репликации одна цепь в каждой из двух дочерних молекул является родительской, другая – синтезируемой заново. По такой схеме реплицируются вирусов, геном которых представлен двунитевой ДНК. При реализации консервативной модели репликации одна дочерняя молекула состоит из двух родительских цепей, а другая – из вновь синтезированных цепей. Согласно консервативной модели реплицируются двунитевые РНК ротавирусов (семейство *Reoviridae*). ДНК-содержащие вирусы, реплицирующиеся таким образом, неизвестны. Дисперсная модель репликации приводит к образованию молекулы нуклеиновой кислоты, состоящей из фрагментов, как родительских цепей, так и вновь синтезированных. Дисперсная модель реализуется, например, на промежуточной стадии репликации онДНК-генома парвовирусов (семейство *Parvoviridae*).

Инициация синтеза цепи ДНК может происходить только при наличии затравки для ДНК-полимеразы. Вид затравки и способ ее образования различаются у разных вирусов и определяют своеобразие вирусных репликативных систем. Различают три основных способа инициации синтеза ДНК:

1 Инициация на внутренних участках ДНК – характерна для кольцевых матриц. Затравкой служит олигорибонуклеотид, который может быть синтезирован ДНК-зависимой РНК-полимеразой, праймазой или праймосомой. Эти ферменты могут иметь клеточное происхождение, или быть вирус-специфическими. Синтезироваться может одна затравка или несколько затравок.

На однонитевой матрице затравка синтезируется на определенном участке, узнаваемом ферментом. Двухнитевая матрица сначала подготавливается к инициации. На участке ori происходит присоединение хеликазы. Этот фермент расплетает участок матрицы, что приводит к образованию репликативной вилки с последующим синтезом затравки.

2 Инициация на концах ДНК (терминальная инициация) – характерна для линейных матриц. Различают две группы способов концевой инициации ДНК-синтеза: с использованием нуклеотидбелковой затравки и с использованием самозатравочно-

го механизма.

3 Инициация синтеза с использовании разрывов и брешей – затравкой для дальнейшего удлинения цепи может быть 3'-ОН конец разорванной цепи ДНК.

Элонгация цепи при репликации вирусных геномов принципиально не отличается от процесса синтеза клеточных ДНК. Используются ферменты, вспомогательные белки и репликационные белки, принадлежащие как клетке хозяина, так и вирусу. Синтез ДНК, как правило, осуществляет ДНК-зависимая ДНК-полимераза II, в редких случаях – ДНК-полимераза III. Основным свойством синтеза является его полярность, при которой очередной нуклеотид присоединяется к 3'-концу растущей цепи. То есть направление синтеза идет от 5'- к 3'-концу, считывание – от 3'- к 5'-концу. Особенности синтеза комплементарных нитей связаны со способом инициации. На днДНК матрице синтез идет через образование репликативной вилки или с вытеснением цепи, на онДНК-матрице – по репарационному механизму.

Стандартный механизм полуконсервативной репликации ДНК с образованием репликативной вилки включает следующие стадии:

1 Инициация репликации расплетением днДНК хеликазой. Репликация начинается не в случайной точке, а в специфическом месте, называемом точкой начала репликации (ori), которых может быть одна или несколько.

2 Синтез РНК-затравки ДНК-зависимой РНК-полимеразой, праймазой или праймосомой.

3 Синтез комплементарных цепей ДНК-полимеразой (II, III). Цепи ДНК синтезируются в результате присоединения дезоксинуклеотидов к 3'-концу растущей цепи, то есть в направлении от 5'- к 3'-концу вдоль матричной цепи. Синтеза цепей в обратном направлении не происходит. Поэтому синтезируемые цепи в репликативной вилке растут в противоположных направлениях. Синтез одной цепи происходит непрерывно – это ведущая, или лидирующая цепь. Синтез другой цепи идет импульсами – это отстающая цепь. Лидирующая цепь синтезируется в направлении роста репликативной вилки, отстающая – в обратном направлении в результате нескольких актов инициации. В итоге образуется несколько коротких цепей (фрагментов Оказаки), которые затем соединяются с образованием непрерывной отстающей це-

пи. Механизм репликации лидирующей и отстающей цепей в принципе одинаков и требует синтеза коротких РНК-затравок, комплементарных матричной цепи. Скорость копирования в репликативной вилке постоянна и равна 1,5 т.п.н./с.

4 Дезинтеграция РНК-затравки РНКазой Н.

5 Сшивание фрагментов Оказаки ДНК-лигазой.

6 Снятие сверхспирализации топоизомеразами (топоизомераза I – вносит разрывы в одну цепь, топоизомераза II – вносит разрывы в обе цепи).

Терминация синтеза

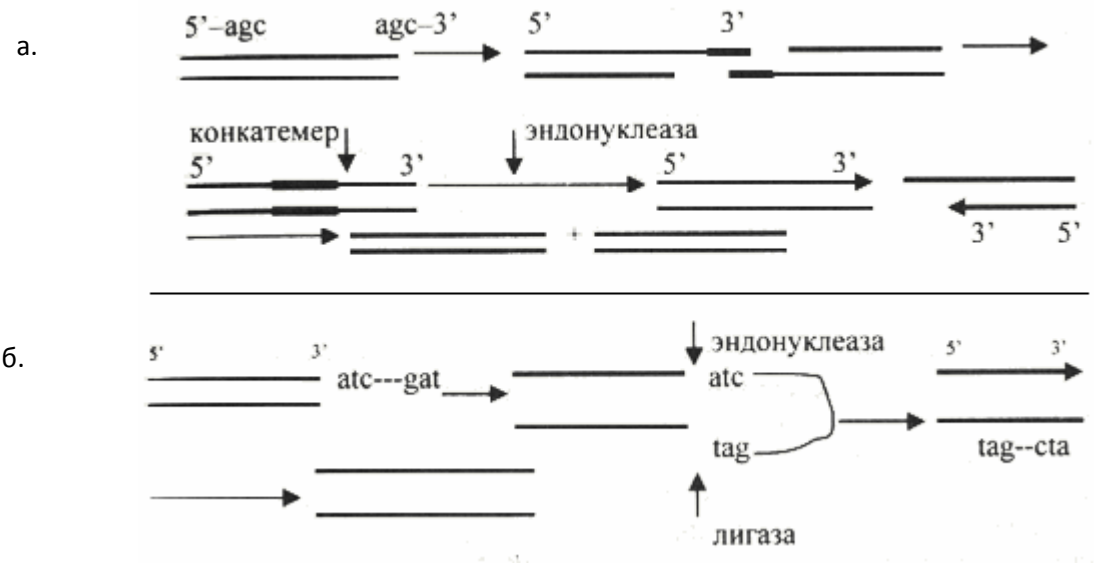
1 Терминация синтеза и расхождение кольцевых геномов упрощены, поскольку синтез цепи идет по кругу и в конце полного оборота в точке ori или при двунаправленной репликации в середине кольца 3'- и 5'-концы вновь синтезированной цепи совмещаются и лигируются. Попарно сцепленные кольца разъединяются топоизомеразой.

2 В линейных ДНК, синтезированных с помощью РНК-затравок, все обстоит сложнее. Удаление РНК-праймера дает молекулу ДНК с выступающим 3'-концом и пробелом на 5'-конце. Предложено 2 способа завершения репликации с образованием полной копии матричной цепи (рисунок 7).

В 1972 г. Уотсон предложил модель завершения репликации ДНК с прямыми повторами на концах через образование конкатемеров, которые представляют собой несколько тандемно-повторяющихся единиц генома. После образования конкатемера специфическая эндонуклеаза вносит ступенчатый разрыв в месте воссоединения. Это приводит к образованию выступающих 5'-концов и пробелов на 3'-конце, которые наращиваются ДНК-полимеразой. Бреши закрываются или путем репарации или лигирования.

Синтез полноразмерных линейных ДНК с инвертированными повторами на концах может быть завершен через образование шпильки. Инвертированные повторы – это две копии одной и той же последовательности ДНК в составе одной молекулы, находящиеся в противоположной ориентации. Прилежащие друг к другу инвертированные повторы образуют палиндромы. На рисунке 7 показано, что терминация 3'-конца через образование шпильки включает лигирование 3'-конца шпильки

с 5'-концом комплементарной цепи, внесение одноцепочечного разрыва с образованием выступающего 3'-конца и его удлинение.



а – через образование конкатемеров; б – через образование шпильки

Рисунок 7 – Схемы терминации синтеза линейных ДНК

3.7.1.2 Основные принципы и механизмы репликации РНК-геномов

РНК-содержащие вирусы – единственные известные создания природы, использующие РНК в качестве генетического материала. Чтобы осуществить экспрессию, репликацию и перенос генов, различные семейства РНК-содержащих вирусов развили разнообразные генетические стратегии и жизненные циклы, которые эксплуатируют биологию и биохимию их хозяев многими различными способами. Эти вирусы копируют свои геномы с использованием одного из двух уникальных биохимических путей: или путем РНК-зависимого синтеза РНК (репликация РНК) или, как ретровирусы, РНК-зависимого синтеза ДНК (обратная транскрипция), который сопровождается репликацией ДНК и транскрипцией. Эти пути требуют работы ферментов, которые обычно отсутствуют в неинфицированных клетках-хозяевах. В связи с этим, данные ферменты должны быть генетически детерминированы вирусом и экспрессированы в течение инфекции. В некоторых семействах РНК-содержащих вирусов эти уникальные синтетические процессы необходимы на первых стадиях

инфекционного цикла, что требует наличия упакованных в вирион полимеразы и других ферментов, необходимых для осуществления следующего цикла инфекции.

Внутриклеточные места репликации РНК-геномов вирусов. Основная масса РНК-содержащих вирусов реплицируется в цитоплазме. Однако известен ряд исключений из этого правила. В дополнение к ретровирусам, которые синтезируют ДНК копии своих геномов и встраивают их в клеточные хромосомы, ортомиксо- и борнавирусы, чей геном представлен линейной (-)РНК, и кольцевая РНК вируса гепатита дельта, подобная вироидам растений, также реплицируются в ядре. Каждый компартмент клетки имеет свои возможности и резервы, определяемые доступностью клеточных компонентов и биохимических путей, которые могут быть использованы и скоординированы вирусами.

Уровни сегментации: гены, мРНК и белки. Разделение эукариотических клеток на ядерные и эндоплазматические компартменты глубоко влияет на биологию вирусов. Рибосомы эукариот требуют метилированной кэп-структуры на 5'-конце мРНК, которая играет критическую роль в передаче сигналов инициирования белкового синтеза. В результате, эукариоты подчиняются правилу – «одна мРНК – одна полипептидная цепь», и, за немногими исключениями, каждая мРНК функционирует как отдельная единица трансляции. РНК-зависимые РНК-полимеразы вирусов обладают ограниченной способностью к взаимодействию с внутренними инициирующими сайтами РНК-матриц, что создает проблему получения нескольких индивидуальных белков на основе единственного генома. В процессе эволюции различные семейства РНК-содержащих вирусов нашли три решения этой проблемы: фрагментация на уровне белков, образование субгеномных мРНК, сегментация генома. Например, РНК-вирусы семейств *Picorna-, Toga-, Flavi-* и *Retroviridae* для того, чтобы получить функциональные белковые продукты используют протеолитическое расщепление полипротеина-предшественника. Вирусы других семейств – *Corona-, Arteri-, Rhabdo-, Paramyxoviridae* – зависят от сложных механизмов транскрипции и чтобы произвести несколько различных моноцистронных мРНК с единственной РНК- матрицы вынуждены синтезировать субгеномные мРНК. Представители семейств *Reo-, Orthomyxo-, Bunya-, Arenaviridae* и др. решили проблему, фрагментируя

геномы. При этом вирионы содержат многократные доли генома, каждый из которых часто представлен единственным геном. У вирусов растений такие доли РНК генома могут пакетироваться в отдельные вирионы (явление мультипартитности), требуя инфекции несколькими вирусными частицами для обеспечения инвазивной способности вируса, в то время, как сегменты генома вирусов животных обычно пакетированы совместно. Напротив, ДНК вирусы редко используют или сегментацию генома или синтез полипротеина. Это вероятно связано с относительной простотой синтеза моноцистронных мРНК, которая может быть транскрибирована с внутренних промоторов на двунитевой ДНК и подвергнута альтернативному сплайсингу, подобно ядерным транскриптам клетки.

Каждая разновидность РНК-генома имеет свои стратегии репликации, экспрессии генов и упаковки в вирионы.

Одно- и двунитевые РНК-геномы вирусов. Хотя все РНК-геномы реплицируются обычным способом комплементарного спаривания нуклеотидных оснований матрицы и дочерней нити, различные семейства РНК-содержащих вирусов реализуют различные молекулярные стратегии репликативного цикла РНК и ее инкапсидации. Семейства однонитевых РНК-вирусов превосходят численностью семейства вирусов с двунитевой РНК геномом почти в 10 раз.

Чтобы ограничить накопление промежуточных репликативных форм, содержащих области двунитевых РНК, вирусы разработали стратегии, различающиеся у (+)РНК и (-)РНК. Все (+)РНК-содержащие вирусы синтезируют непропорционально низкие уровни негативных нитей – от 1 % до 5 % от уровня положительной РНК и таким образом минимизируют потенциал для накопления двунитевой РНК. Наоборот, (-)РНК-вирусы нуждаются в существенных количествах (+)РНК нитей, чтобы использовать их в качестве матрицы для синтеза геномного потомства. Обычно (-)РНК-вирусы предотвращают отжиг (+) и (-) нитей, сохраняя геномную РНК в составе нуклеокапсида.

(+)РНК и (-)РНК геномы. Различия между положительным и отрицательным РНК-геномами определяются полярностью нитей, инкапсидированных в вирионы. (+)РНК-геном в начале инфекции использует синтезированные на рибосомах виру-

соспецифические белки и клеточные РНК-связывающие белки. После того, как синтезированные вирусоспецифическая РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp) и другие неструктурные белки покидают рибосомы, начинается репликация РНК. Затем вновь синтезированные структурные белки вириона и РНК ассемблируют с образованием вирусного потомства. В противовес этому, (-)РНК-геномы и их антигеномные комплементы остаются связанными с белками нуклеокапсида, как в пределах вирусных частиц, так и в течение всего цикла вирусной репликации. Эти фундаментальные адаптационные различия основаны на том, что геномы положительной полярности должны удовлетворять трансляционным критериям, которые диктуются клеткой-хозяином, в то время как негативные геномы и антигеномы должны удовлетворять только матричным требованиям вирусоспецифической RdRp, в связи с тем, что они копируются, но никогда не транслируются. Хотя до настоящего времени остается неясным, как полимераза может копировать покрытые белком РНК-матрицы. днРНК-геномы являются промежуточными между этими крайностями: родительские доли генома остаются изолированными в субвирусных частицах на протяжении всего инфекционного цикла.

Однако следует учитывать, что положительные нити-предшественники двунитевого РНК потомства изначально не инкапсидированы. Вероятно, эти вариации отражают существенные различия в структурах вирусных комплексов RdRp-матрицах и в молекулярных механизмах репликации положительных, отрицательных и двунитевых РНК-геномов.

Линейные и кольцевые РНК-геномы. Репликация РНК не только требует сохранения приемлемого уровня ошибок, как обсуждено ранее, но также должна избегать систематических делеций или вставок нуклеотидов. Особенно подвержены изменениям концевые последовательности геномов, дублирование которых представляет проблему.

При репликации ДНК проблема терминации синтеза усилена тем, что ДНК-полимераза не может начать синтез дочерней нити *de novo*, для чего требуется наличие затравки. Это создает дополнительные сложности, связанные с копированием праймер-связывающей последовательности. Одним из нескольких известных, наи-

более экономичных и широко распространенных в природе решений этой проблемы является устранение концов путем образования кольцевой ДНК, как в прокариотических геномах. В отличие от ДНК-полимераз, большинство РНК-полимераз не требует затравок, так что РНК-геномы менее восприимчивы к проблеме концов. Соответственно, большинство РНК-геномов вирусов – линейные молекулы. Ковалентно замкнутые кольцевые РНК найдены только у вируса гепатита дельта животных, среди вироидов и некоторых других субвирусных РНК-патогенов, которые инфицируют растения. Однако концы линейных рибонуклеиновых кислот особенно чувствительны к деградации и их репликация особенно склонна к ошибкам. Следовательно, каждое семейство РНК-вирусов имеет особенности, разработанные для сохранения концов генома. Например, множество РНК-геномов положительной полярности несут 5’-кэп и 3’-поли-А трек, которые защищают от деградации концы последовательности эукариотических мРНК. Подобную роль, вероятно, выполняет геномный белок (Vpg), который ковалентно связан к 5’-концом РНК пикорнавирусов, а также устойчивые вторичные структуры РНК, найденные на 3’-конце РНК флавивирусов и в других геномах. 3’-концы многих рибонуклеиновых кислот вирусов растений формируют структуры типа «кленового листа», которые подобны клеточным тРНК. Кроме этого, в (+)РНК вирусов обнаружены модификации, которые могут служить для соединения ее концов. Эти модификации опосредуют взаимодействие 3’-конца с клеточными белками типа поли-А-связывающего белка и кэп-связывающего комплекса, что приводит к формированию нековалентно замкнутых функциональных комплексов, которые могут повторно промотировать трансляцию рибосомами и повторно реплицироваться RdRp's. В отличие от (+)РНК-геномов вирусов, негативные – и амбисенс РНК-геномы редко несут ковалентные концевые модификации. Эти рибонуклеиновые кислоты обычно обладают некоторой степенью комплементарности концевой последовательности, которая, как думают, стабилизирует вирусный нуклеокапсид и промотирует репликацию РНК, возможно, делая матрицу функционально кольцевой, как описано для рибонуклеиновых кислот положительной полярности. Концевая комплементарность последовательности также позволяет концам РНК выступать в роли теломеров и служить 5’-концевой матрицей для восстановле-

ния разрушенных 3’-концевых нуклеотидов. Другое решение проблемы концов имеется у некоторых (+/-)РНК-содержащих аренавирусов. Эти вирусы устойчивы к концевым изменениям и способны допустить существенный уровень вариабельности концевых последовательностей генома, возможно, располагая необходимыми внутренними cisacting сигналами, далеко отстоящими от концов РНК. Ретровирусные геномы наоборот избыточны, и имеют прямые повторы между 12 и 235 нуклеотидами на каждом конце. Эти прямые повторы поддерживают и восстанавливают целостность концов РНК в течение обратной транскрипции и вирусной репликации. Сегментированные и несегментированные РНК-геномы. Сегментация генома вирусов облегчает производство индивидуальных продуктов в эукариотических клетках. В тоже время это означает, что каждая доля генома для обеспечения экспрессии, репликации и 28 сборки вирионов должна содержать соответствующие регуляторные cis-acting сигналы. В некоторых семействах вирусов с сегментированным геномом (*Orthomyxoviridae, Reoviridae)* эти сигналы включают консервативные для всех сегментов концевые последовательности, но у вирусов других семейств (бипартитные *Noda-* и *Tetraviridae*), существенных консервативных последовательностей у разных долей генома не выявлено.

В этих случаях специфичность репликации РНК и сборки вирионов, возможно, определяется консервативностью вторичной или третичной структуры РНК. Однако механизмы, которые координируют репликацию и упаковку различных сегментов генома, остаются плохо понятыми для любого вируса эукариот.

Сегментация генома вируса оказывает существенное влияние на его биологию, потому что индивидуальные сегменты могут часто подвергаться реассортации в клетках, инфицрованных двумя штаммами вируса, позволяя вирусам с сегментированным геномом делать существенные эволюционные прыжки посредством горизонтальной передачи генов. Этот механизм лежит в основе антигенных изменений (антигенный шифт), обеспечивающих возникновение новых пандемичных штаммов вируса гриппа из семейства *Orthomyxoviridae*.

Cis-acting сигналы и специфичность репликации. Репликация и упаковка вирусных РНК являются удивительно специфичными процессами. Оба этих процес-

са безошибочно выбирают правильные вирусные молекулы из числа тысяч рибонуклеиновых кислот, содержащихся в клетке. Это в основном связано с присутствием cis-acting сигналов, которые селективно определяют репликацию вирусных РНК и сборку вирионов, но в большинстве РНК-геномов вируса эти сигналы до конца ясно не идентифицированы.

Сигналы, которые были охарактеризованы, включают не линейные нуклеотидные последовательности, а вторичные структуры в виде петель, тРНК-подобных структур и псевдоузлов, которые создают специфические трехмерные молекулярные формы, способные взаимодействовать только с вирусными ферментами и структурными белками вируса. Однако понимание молекулярных основ специфичности репликации РНК и сборки вирионов ограничено недостатком знаний трехмерных структур вирусной РНК и ее действующих cis-acting сигналов.

Сателлитные РНК и дефектные РНК геномы. Иногда в инфицированных клетках обнаруживаются молекулы РНК, которые не являются ни независимо инфекционными, ни существенными для инвазионной способности вируса, но однако содержат действующие cis-acting сигналы, активирующие их собственную репликацию и/или упаковку в белки, кодируемые другим вирусом. Такие спутниковые (сателлитные) РНК, паразитирующие на материнском вирусе, могут модулировать его репликацию и вирулентность. Среди РНК-содержащих вирусов животных основным примером вируса сателлита является вирус гепатита дельта, который упаковывает свой геном в белки, кодируемые вирусом гепатита В, и может существенно усиливать его патогенность. Паразитирование РНК-сателлита на ДНК-содержащем вирусном родителе необычно; как правило, спутниковые РНК копируются и инкапсидируются в белки РНК-содержащего вируса-родителя, с которым они имеют, по крайней мере, некоторую, гомологию последовательностей. В ряде случаев, сателлитные РНК кодируют собственные белки капсида, или белки, требуемые для репликации РНК (как в случае вируса гепатита дельта), но чаще они с точки зрения трансляции не активны. Сателлитные РНК чаще встречаются среди вирусов растений, чем среди вирусов животных, возможно, потому что трансмиссия животных вирусов между хозяевами происходит путями, которые не оптимальны для сателли-

тов.

В отличие от передачи вирусной инфекции между хозяевами, распространение инфекции в пределах одного организма животного обычно вовлекает последовательные эпизоды ограниченной вирусной репликации. Эти состояния формируют поколение и увеличивают число дефектных вирусных РНК, которые являются результатом, как простых делеций, так и более сложных перестроек генома, происходящих в процессе репликации РНК. Подобно сателлитным РНК, дефектные РНК паразитируют на материнском вирусе и мешают его репликации. Однако дефектные вирусы в своем выживании полностью зависят от материнского вируса. Большинство семейств рибовирусов животных с готовностью производят дефектные интерферирующие РНК в культуре клеток, но их влияние на развитие вирусной болезни до конца не изучено.

Структурные и неструктурные белки вирусов. По определению, вирусоспецифические структурные белки включены в вирусные частицы, а неструктурные белки найдены только в инфицированных клетках. Однако вирусы с негативным, амбиполярным и двунитевыми РНК-геномами включают в потомство вирионов RdRp и ассоциированные ферменты и поэтому кодируют преимущественно или исключительно структурные белки. В дополнение к полимеразе, кодируемые вирусом ферменты часто включают одну или несколько протеаз, РНК-хеликазу, гуанилил- и метилтрансферазы, поли-А-полимеразу, иногда нуклеазу, а в случае ретровирусов – ДНК-интегразу. В тоже время, для нескольких РНК-вирусов установлено участие в репликативном цикле ферментов клетки-хозяина.

Протеазы расщепляют продукт первичной трансляции, частью которого они являются, в высоко определенных последовательностях (сайтах). В некоторых клетках, инфицированных пикорнавирусами, они также выборочно запрещают синтез белка клетки-хозяина путем протеолиза клеточного кэп-связывающего белка. Хеликазы необходимы большим РНК-содержащим вирусам для разрушения внутримолекулярного спаривания оснований в течение синтеза РНК, хотя некоторые RdRp способны расплетать дуплексы РНК без ее помощи. Гуанилил- и метилтрасферазы строят 5’-кэп на мРНК почти у всех РНК-вирусов эукариот, кроме пикорнавирусов,

РНК которых не кэпирована, и ортомиксо- и буньявирусов, которые крадут кэп у клеточных мРНК посредством кэп-специфической эндонуклеазы. На 3’-конце мРНК большинства вирусов животных находится поли-А трек, а у РНК-вирусов растений, как правило, тРНК-подобная структура. Полиаденилирование обычно происходит в результате побочной реакции (пробуксовывания) вирусной RdRp, а не в результате работы поли-А-полимеразы, как у поксвирусов.

Белки клетки-хозяина. Существенную роль в репликации РНК-содержащих вирусов могут играть белки клетки-хозяина. Следует отметить, что в различных вирусных системах в этот процесс вовлечены различные клеточные белки. Самым ярким примером является РНК-репликаза бактериофагов Qb и MS2, у которых, в дополнение к единственному фагоспецифическому полипептиду для обеспечения полимеразной активности необходимо четыре клеточных субъединицы: рибосомальный белок S1 *E.coli*, два фактора элонгации трансляции и РНК-связывающий белок.

У некоторых вирусов эукариот в репликацию РНК также могут быть вовлечены факторы трансляции хозяина. Например, у бромовирусов (вирусы растений) субъединица инициирующего фактора eIF-3 связывается с RdRp и увеличивает ее активность. В инфицированных клетках несколько других белков хозяина взаимодействуют с концевыми нуклеотидными последовательностями вирусных РНК. Среди них – поли-А- и полипиримидин-связывающие белки, карлетикулин и белки Ro и L, взаимодействующие с малыми ядерными РНК. Хотя следует отметить, что отличить случайные взаимодействия от тех, которые играют функциональные роли, часто затруднительно.

Мембраны клетки-хозяина. В отличие от фаговых репликаз, RdRp вирусов эукариот неизменно связана с надмолекулярными структурами: мембранами клетки-хозяина у (+)РНК-вирусов, нуклеокапсидом у (-)РНК-вирусов и субвирусными частицами у днРНК-вирусов. Внутриклеточные мембраны клеток, инфицированных вирусами с (+)РНК-геномом, подвергаются быстрому перераспределению, формируя места заякоривания вирусных репликативных комплексов. Когда эти комплексы отсоединяются от мембран, они теряют способность катализировать истинную репликацию РНК, хотя часто сохраняют ограниченную способность копировать РНК-

матрицу. При изучении нодавирусной инфекции истинная РНК-репликазная активность частично очищенной RdRp была восстановлена путем добавления к бесклеточному экстракту глицеролфосфолипидов. Эти результаты подтвердили идею, что мембранная организация играет центральную роль в репликации (+)РНК. То же самое заключение получено при ингибировании репликации РНК полиовируса брефелдином А, который блокирует внутриклеточные мембранные взаимодействия. Хотя определенная роль мембран неясна, вероятно, они могут ускорять сборку репликативных комплексов, сокращая время процесса и отделяя дочерние молекулы от матриц.

Механизмы репликации РНК-геномов. Как уже отмечалось, репликация РНК-геномов осуществляется вирусоспецифической RdRp, которая может входить в состав вириона или детерминироваться геномом. В отличие от ферментов, которые копируют ДНК с использованием затравки, большинство RdRp могут начать синтез РНК *de novo*. Исключением является RdRp пикорнавирусов, которая для инициирования синтеза использует маленький вирусный белок (VPg), ковалентно связанный с урацилом. VPg удаляется при трансляции генома, но сохраняется при его инкапсидации.

Интересно, что у тогавирусов (вирус Синдбис), репликация (+)РНК на стадии синтеза минус-нити (образование РФ) осуществляется только переходной версией RdRp, которая впоследствии протеолитически процессируется, что переключает матричную специфику RdRp на синтез положительных нитей.

Репликациция (+)РНК полиовирусов

Полиовирусы – мелкие (27 нм) безоболочечные икосаэдрические вирусы, поражающие позвоночных. Геном – линейная однонитевая РНК позитивной полярности. На 5'-конце РНК ковалентно связана с терминальным геномным белком через остаток тирозина, 3'-конец полиаденилирован (рисунок 8).

Репликацию/транскрипцию генома осуществляет РНК-полимераза, детерминированная 3'-концом генома, который транслируется сразу после попадания вируса в клетку. На первой стадии репликации происходит образование двухнитевой РФ за счет синтеза минус-нити, инициированного присоединением молекулы урацила к 3'-

поли-А концу.

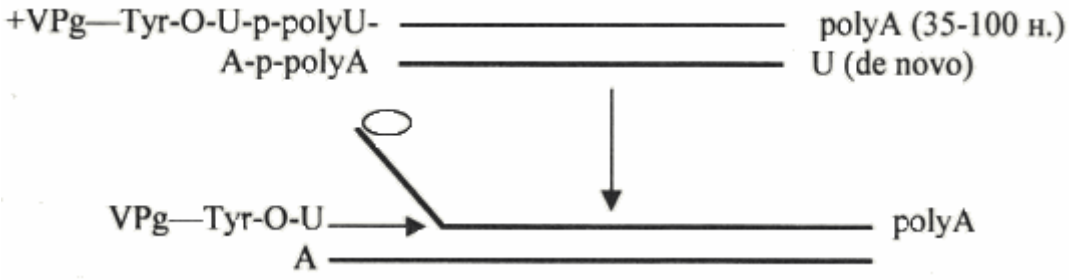


Рисунок 8 – Схема репликации РНК полиовирусов

Кроме РНК-полимеразы в клетке синтезируется вирус-специфический терминальный низкомолекулярный белок (VPg), который через тирозин связывается с молекулой урацила. Данная структура используется РНК-полимеразой в качестве затравки – то есть происходит терминальная инициация с использованием нуклеотид-белковой затравки. Синтез идет с вытеснением цепи. Образующиеся молекулы (+)РНК до накопления достаточного количества вирусоспецифических белков используются как мРНК, после чего они начинают инкапсидироваться в вирусную частицу.

Следует отметить, что представленная схема репликации геномной (+)РНК полиовирусов не является универсальной. Вирусные (+)РНК-геномы различаются организацией 5'- и 3'-концевых структур, что определяет особенности их репликации, связанные с инициацией синтеза.

Репликациция (-)РНК-геномов

Вирусные (-)РНК-геномы могут быть непрерывными или сегментированными. Во всех случаях РНК находится в составе рибонуклеопротеина, что и определяет особенности ее репликации, поскольку депротеинизированная РНК не может служить матрицей для полимеразы. Все вирусы с (-)РНК-геномом имеют собственную РНК-зависимую РНК-полимеразу, входящую в состав РНП. Для получения полноразмерного генома должна быть синтезирована репликативная полноразмерная плюс-нить. Однако на первом этапе репродуктивного цикла геномная (-)РНК служит

матрицей для транскрипции, которая протекает с последующим процессингом мРНК, и не может служить матрицей для синтеза полноразмерной копии. Синтез репликативной полноразмерной (+)РНК начинается только после накопления соответствующих вирусных белков, подавляющих преждевременную терминацию РНК на внутренних участках матрицы. Каким образом это происходит, остается пока неизвестным. Синтез антигеномной и геномной РНК происходит в составе РНП.

Репликациция днРНК реовирусов

Реовирусы – двукапсидные (60-75 нм) частицы с икосаэдрическим типом симметрии, инфицируют позвоночных, беспозвоночных, растения. Геном состоит из 10-12 фрагментов днРНК.

Репликация днРНК неразрывно связана с транскрипцией, которая является ее первой стадией.

1 Синтез (+)РНК на двухнитевой матрице протекает по консервативному типу без вытеснения цепи и происходит в составе однокапсидной вирусной частицы при участии белков кора – вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы (VP2) и гуанидилтрансферазы (VP3). мРНК покидают частицу через поры внутреннего капсида.

2 Плюс-нити РНК объединяются с вновь синтезированными белками кора и неструктурными (NS) белками. При созревании вириона РНК-полимераза осуществляет синтез минус-нитей на матрице (+)РНК по репарационному механизму, затягивая ее внутрь формирующегося капсида. Сформированная однокапсидная частица может снова начать синтез плюс-нитей РНК.

Как и в случае полиовирусов, представленный способ репликации генома реовирусов не является универсальным для вирусов с днРНК геномом. Например, у фага φб синтез плюс-нитей на родительском дуплексе происходит по полуконсервативной модели и всегда сопряжен с вытеснением предшествующей нити (+)РНК.

3.7.1.3 Основные принципы и механизмы репликации ДНК-геномов вирусов

В процессе репликации ДНК-содержащие вирусы осуществляют некоторые

шаги, которые отсутствуют у РНК-геномных вирусов. Для большинства ДНК-содержащих вирусов генетические стратегии включают: транспорт ДНК вириона в ядро клетки, инициирование транскрипции с этой ДНК, индукцию транскрипции дополнительных вирусных генов, подготовку клетки для репликации ДНК вируса, дублирование ДНК-генома, упаковку ДНК в вирионы и выход вирусных частиц из ядра. Кроме этого, многие ДНК-вирусы развили уникальные механизмы уклонения от иммунной защиты организма и способность вызывать опухоли у животных. В процессе близких отношений со своими хозяевами, вирусы эксплуатируют ключевые клеточные регуляторные системы и узурпируют важные клеточные процессы. В связи с этим, изучение различных аспектов репликации ДНК-вирусов обеспечивает новые фундаментальные знания о молекулярных процессах, происходящих в клетке, включая выражение генов, репликацию ДНК и контроль за циклом клеточного деления.

Подготовка клеток для репликации вирусной ДНК. В ходе продуктивной вирусной инфекции многие ДНК-вирусы из единственной молекулы генома могут получить 100000 или больше копий генома в течение нескольких дней. Для этого требуется работа множества белков, включая ДНК-связывающие белки и полимеразы, а также обильная поставка нуклеотидов. Репликация некоторых ДНК-вирусов происходит только в клетках, которые естественно реплицируют свою собственную ДНК, обеспечивая тем самым необходимую клеточную среду для репликации вирусной ДНК. Другие ДНК-вирусы также в значительной степени полагаются на клеточные системы репликации ДНК, но эти вирусы кодируют белки, стимулирующие клеточный цикл деления. Наконец, некоторые из самых больших ДНК-содержащих вирусов ограничено используют клеточный репликативный аппарат, т.к. сами кодируют вирусные версии многих из необходимых белков.

К первой группе вирусов относятся самые простые ДНК-содержащие вирусы семейства *Parvoviridae*, которые имеют линейный однонитевой геном. Парвовирусы могут реплицировать свою ДНК и осуществлять полный инфекционный цикл только в клетках, находящихся в стадии репликации ДНК – то есть в S-фазе клеточного цикла.

Фактически, экспрессия вирусных генов не активизируется до тех пор, пока клетка не войдет в S-фазу и ДНК-геном вируса не будет преобразован в двунитевую РФ, которая является матрицей для транскрипции. Однако, в отличие от других вирусов, которые требуют, чтобы клетки активно копировали свою ДНК, парвовирусы неспособны стимулировать переход клетки в S-фазу. В связи с этим, они могут выполнять успешную репродукцию только в том случае, если попадают в клетку, уже осуществляющую синтез ДНК. Некоторые парвовирусы, особенно аденассоциированный вирус (AAV), имеют даже более строгие требования и могут копироваться только в присутствии помощника -аденовируса или вируса герпеса, генные продукты которых активируют экспрессию геновпарвовируса и репликацию его ДНК.

Другие ДНК-вирусы для того, чтобы создать условия для репликации своей ДНК, стимулируют клетки к делению. Для этих вирусов репликация вирусной ДНК является результатом взаимодействия между клеточными репликативными белками и вирусными белками, которые прямым образом участвуют в репликации, а также белками- инициаторами, которые локализуются в точке начала репликации вирусного репликативного аппарата. Эти ДНК-вирусы перестраивают репликативный аппарат клетки на вирусную репликацию, участвуя в белок-белковых взаимодействиях с ключевыми клеточными регуляторными молекулами, некоторые из которых выполняют роль шаперонов, что позволяет им стабилизировать белковые комплексы. Часто, эти взаимодействия приводят к нейтрализации клеточных белков-репрессоров опухоли типа транскрипционного фактора p53 и членов семейства ретинобластомых белков (Rb) и, как следствие, к активации клеточного роста.

Вирусные белки, которые стимулируют репликативное состояние клетки, обычно инактивируют членов семейства Rb – P105Rb, p107, и p130. Инактивация Rb предотвращает репрессию клеточного деления и разрешает E2F-опосредованную транскрипцию, что стимулирует выражение многочисленных клеточных белков, требуемых для S-фазы, включая ДНК-полимеразу α, тимидинкиназу, рибонуклеотидредуктазу и тимидилатсинтазу. Некоторые вирусные белки, например, E1A аденовирусов и E7 папиломавирусов человека, непосредственно связывают Rb белки и ингибируют их функцию, и таким образом активируют E2F. Другие вирусные белки

регулируют активность циклин-зависимых киназ (Cdks), которые катализируют фосфорилирование Rb, приводя к активации E2F и транскрипции E2F-регулируемых генов. Ряд вирусных белков могут косвенно влиять на регуляцию клеточного цикла деления. Например, E1B-55КБ и E4orf6 белки аденовирусов и E6 папиломавирусов запрещают действие транскрипционного фактора p53 через взаимодействие с CBP/p300, который является коактиватором гена p53. Отмена функции p53 приводит к уменьшенной экспрессии ингибитора клеточного деления p21 (репрессор комплекса Cdk–циклин), таким образом активируя Cdk и соответственно переход клеток в S–фазу. Точно так же, аденовирусный E1A связывает p27, который является ингибитором Cdk, нейтрализуя его эффекты. Большой Т антиген обезъяньего вируса SV40 не только связывает и инактивирует Rb и p53, но и выполняет несколько функций, непосредственно требуемых для репликации ДНК вируса. Другой механизм используют средний Т-антиген полиомавирусов и белок E5 папиломавирусов быка. Эти белки активируют сигнальный каскад, опосредованный рецептором фактора роста, и возможно стимулируют экспрессию регуляторной субъединицы Cdk – циклина D, таким образом стимулируя активность Cdk и фосфорилирование белков семейства Rb. Некоторые белки вирусов герпеса и гепаднавирусов по всей вероятности также стимулируют каскады сигнальных путей, активизируя внутриклеточные белки передачи сигнала NFKB, P21ras и pp60c-src.

Индукция набора клеточных репликативных белков имеет глубокие последствия на клетку-хозяина, которая насильно побуждается к репликации ДНК. Когда пролиферативный сигнал устойчиво поддерживается, например, в непермиссивных клетках, которые не способны поддерживать репликацию вирусной ДНК, клетки могут подвергнуться устойчивой трансформации. Таким образом, мало того, что многие ДНК- вирусы стимулируют статические клетки к повторным циклам деления, они также трансформируют клетки в культуре и вызывают опухоли у животных. Рассмотренная способность многих опухолеродных ДНК-вирусов стимулировать неограниченный рост клеток не является особенностью нормальной репликации вирусов, а скорее представляет собой аберрантный ответ клеток на вирусную инфекцию. В соответствии с этим, парвовирусы, неспособные стимулировать реп-

ликацию клеточной ДНК, являются одними из немногих ДНК-содержащих вирусов, которые не трансформируют клетки. Однако способность вирусов стимулировать синтез клеточной ДНК не всегда коррелирует с их способностью трансформировать клетки. Например, одни вирусы герпеса стимулируют синтез ДНК, другие нет, и, тем не менее, они фактически запрещают быстрое клеточное деление. Такие большие вирусы с их большой кодирующей емкостью способны создать надлежащую среду для репликации вирусной ДНК без активации клеточного репликативного аппарата.

Необходимость нуклеотидов для репликации ДНК. Как описано выше, для репликации парвовирусов необходимо, чтобы клетки находились в S-фазе, а папиломавирусы, полиомавирусы и аденовирусы стимулируют клетки, чтобы ввести S-фазу, требующую для синтеза ДНК большой концентрации дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ). Через воздействие на членов белковых семейств Rb и E2F, папиломавирусы и аденовирусы стимулируют синтез фермента рибонуклеотидредуктазы, который требуется для поддержания достаточного для вирусной репликации уровня дНТФ. Напротив, вирусы герпеса и поксвирусы способны реплицироваться в покоящихся клетках. Одной из причин того, что эти вирусы могут обходить требование к S-фазе является их способность кодировать ферменты для синтеза дНТФ – рибонуклеотидредуктазу и тимидинкиназу. В случаях вируса герпеса и вируса опоясывающего лишая/ветряной оспы вирусная тимидинкиназа является ключевой точкой для противовирусной химиотерапии, потому что этот вирусный фермент фосфорилирует аналоги нуклеозида, такие, как ацикловир, более эффективно, чем это делают клеточные ферменты. Преобразованные в фосфорнокислую форму эти аналоги дНТФ выборочно вредят репликации ДНК герпесвирусов.

Независимо от вида ДНК-генома единицей его репликации является так называемый ***репликон*** – единица генома, способная к автономной репликации. Репликон представляет собой нуклеотидную последовательность, расположенную между точкой начала репликации (origin или ori) и точкой окончания репликации (terminus). Процесс репликации ДНК разделен на три стадии: инициация цепи, элонгация (удлинение) цепи и терминация синтеза. Вирусы с различными видами ДНК-генома

реализуют оригинальные стратегии репликации. При этом главные особенности наблюдаются при инициации синтеза.

Основные принципы репликации ДНК-геномов вирусов.

Инициация синтеза ДНК. Большинство ДНК вирусов эукариот (кроме поксвирусов) копирует свои геномы в ядре. Репликация ДНК-геномов вирусов инициируется в специфических точках ori.

В отличие от клеточных ориджинов, которые активируются один раз в течение клеточного цикла, вирусные точки ori могут срабатывать много раз в течение отдельного цикла репликации. Инициация синтеза цепи ДНК может происходить только при наличии затравки для ДНК-полимеразы. Вид затравки и способ ее образования различаются у разных вирусов и определяют своеобразие вирусных репликативных систем. Различают три основных способа инициации синтеза ДНК (смотри пункт 3.7.1.1, с. 63).

Элонгация цепи при репликации вирусных геномов принципиально не отличается от процесса синтеза клеточных ДНК. Используются ферменты, вспомогательные белки и репликационные белки, принадлежащие как клетке-хозяину, так и вирусу. Синтез ДНК, как правило, осуществляет ДНК-зависимая ДНК-полимераза α. Основным свойством синтеза является его полярность, при которой очередной нуклеотид присоединяется к 3’- концу растущей цепи. То есть направление синтеза идет от 5’- к 3’-концу, считывание – от 3’- к 5’-концу. Особенности синтеза комплементарных нитей связаны со способом инициации. На днДНК-матрице синтез идет через образование репликативной вилки (рисунок 9) или с вытеснением цепи, на онДНК матрице – по репарационному механизму.

В репликативных вилках одна нить (ведущая) копируется непрерывно в направлении от 5’- к 3’-концу. Поскольку другая нить (отстающая) должна также синтезироваться от 5’- к 3’-концу, она копируется с перерывами, многократно инициируя синтез и соединяя короткие фрагменты Оказаки. Синтез ДНК в репликативной вилке обеспечивается целым набором белков-ферментов, которые могут иметь разное происхождение. Мелкие ДНК-содержащие вирусы используют клеточные репликативные белки. Лучше всех изучена репликация полиомавируса SV40, где вовле-

ченные репликативные белки были идентифицированы в бесклеточной системе *in vitro*.

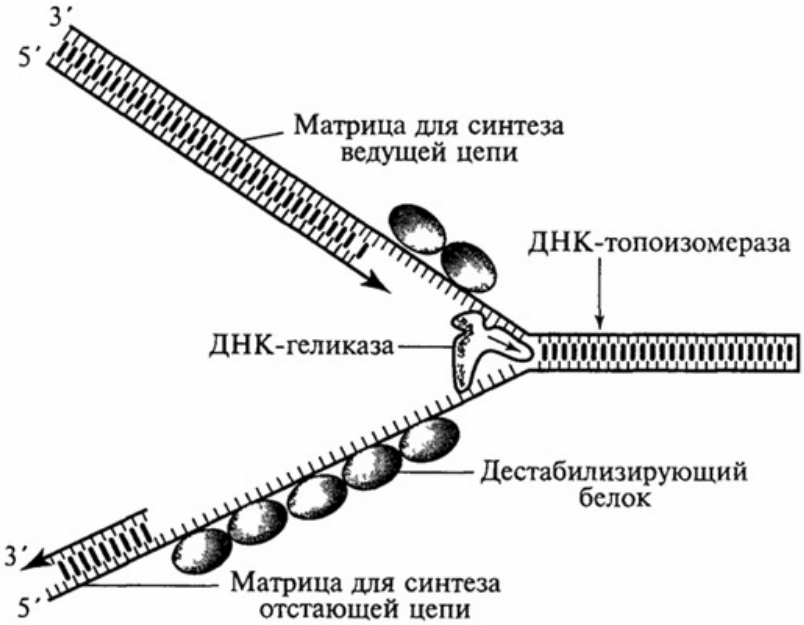


Рисунок 9 – Схема репликации ДНК с использованием репликативной вилки

Установлено, что в репликации ДНК SV40 принимают участие 10 белков. Девять из них имеют клеточное происхождение: ДНК-полимераза α (ответственна за инициацию синтеза ДНК в точке ori и синтез отстающей нити); праймаза (связана с ДНК-полимеразой и праймирует синтез фрагментов Оказаки); ДНК-полимераза d (ответственна за синтез лидирующей нити и завершение синтеза фрагментов Оказаки); пролиферативный клеточный ядерный антиген (PCNA), который связывается с ДНК-полимеразой d и формирует кольцо вокруг ДНК, увеличивая процессивность полимеразы; гетеропентамерный репликативный фактор С – RF-C (присоединяет кольцо PCNA на ДНК и стимулирует полимеразу d); RPA – онДНК-связывающий белок; РНаза Н (удаляет все кроме одного рибонуклеотиды РНК-праймера); экзонуклеаза FEN-1, также известная как MF-1 (удаляет оставшейся рибонуклеотид); ДНК-лигаза I (лигирует фрагменты Оказаки); топоизомераза I и/или топоизомераза II (снимает сверхспирализацию в течение синтеза). Единственный вирусный белок, который требуется для репликации ДНК SV40 – это большой Т-антиген, который

обладает свойствами хеликазы и обеспечивает расплетение двунитевой структуры в репликативной вилке.

Другие вирусы сами обеспечивают почти все белки репликативной вилки. Например, фаза элонгации при репликации ДНК аденовируса в условиях in vitro обеспечивается одной аденовирусной субъединицей ДНК-полимеразы, аденовирусным однонитевым ДНК-связывающим белком, который может увеличивать процессивность полимеразы, и клеточной топоизомеразой I или II. Это простота частично связана с необычным характером репликации ДНК аденовируса, в которой отсутствует синтез отстающей цепи.

Крупные ДНК-вирусы еще в большей степени обеспечивают себя ферментами репликации. Например, вирусы герпеса кодируют ДНК-полимеразу, фактор элонгации, праймазо-хеликазный комплекс, однонитевой ДНК-связывающий белок и, вероятно, еще ряд вирусных белков, которые не идентифицированы.

Терминация синтеза. В случае кольцевых геномов окончание синтеза и расхождение геномов упрощены, поскольку синтез дочерней цепи идет по кругу и в конце полного оборота в точке ori или при двунаправленной репликации в середине кольца 3’- и 5’-концы вновь синтезированной цепи совмещаются и лигируются. Попарно сцепленные кольца разъединяются топоизомеразой. В линейных ДНК, синтезированных с помощью РНК-затравок, все обстоит сложнее. Удаление РНК-праймера дает молекулу ДНК с выступающим 3’-концом и пробелом на 5’-конце. Предложено два способа завершения репликации с образованием полной копии матричной цепи: с использованием конкатамеров или через образование шпильки.

Основные схемы репликации ДНК-геномных вирусов.

1 Терминальная инициация с помощью самозатравочного механизма.

2 Терминальная инициация с помощью белок-нуклеотидной (Б-Н) затравки.

3 Механизм катящегося кольца.

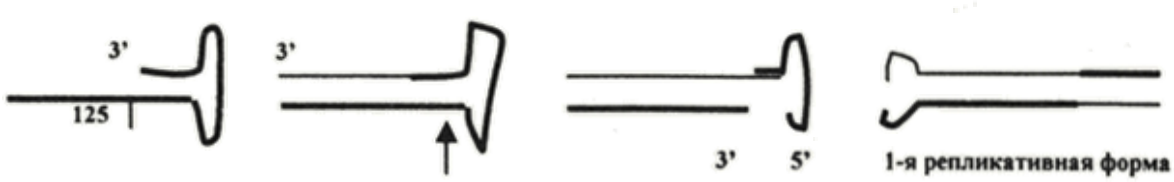
4 Схема Кернса.

5 Репликация через интеграцию.

1 Репликация с использованием терминальной инициации при помощи самозатравочного механизма (рисунок 10). Такой тип репликации геномной ДНК имеют

парвовирусы, у которых геном представлен линейной онДНК, имеющей на обоих конца самокомплементарные последовательности, формирующие шпилечные структуры. 3’-конец ДНК имеет уникальную последовательность размером 125 нуклеотидов, образующую двунитевую Т-образную шпилечную структуру, которая играет роль затравки для ДНК-полимеразы.

ДНК-полимераза в результате репарационного синтеза комплементарной цепи воссоздает дуплекс, обе цепи которого на одном конце ковалентно соединены. При этом 3’-концевой сегмент родительского генома в качестве матрицы не используется. Следовательно, полного воспроизведения вирусного генома пока не произошло. На следующем этапе вирусоспецифический фермент вносит разрыв в родительскую цепь на границе между реплицированным и нереплицированным участками последовательности (между 125 и 126 нуклеотидами).



матричная нить; вновь синтезированная нить

Рисунок 10 – Схема первых этапов репликации однонитевой ДНК парвовирусов

Концевые 125 нуклеотидов родительского генома становятся условной частью вновь синтезированной цепи и возникший таким образом 3’-конец родительской цепи используется для ее регенерации. В результате этих реакций возникает дисперсная двунитевая репликативная форма вирусной ДНК (рисунок 10). Далее следует цепь реакций, включающих образование на одном из концов ДНК-затравки в виде «заячьих ушек», синтез новой цепи с вытеснением родительской, образование еще одной репликативной формы. Вторая репликативная форма ДНК используется в качестве матрицы для дальнейшего синтеза вирусной ДНК, а вытесненная из дуплекса однонитевая молекула или вступает в репликативный цикл или входит в состав дочерней вирусной частицы.

2 Репликация с использованием терминальной инициации при помощи белок-нуклеотидной затравки (рисунок 11). Такой тип репликации геномной ДНК имеют аденовирусы, геном которых представлен линейной днДНК, имеющей на 5’-концах инвертированные повторы и ковалентно присоединенные геномные белки с м.м. 55 кДа.

В инфицированной аденовирусом клетке синтезируется вирусоспецифический белок массой 80 кДа, который связывается через серин с дезоксицитидином. Образовавшаяся структура **Б---Ser—dCTP** является затравкой, которая через цитозин комплементарно связывается с 3’-концевым гуанозином генома и инициирует синтез цепи ДНК.

Инициация может наблюдаться на любом конце родительской ДНК и может происходить или одновременно или последовательно. При последовательной инициации синтез дочерней цепи сопровождается вытеснением одной из родительских, а синтез комплементарной цепи идет на однонитевой матрице по репарационному механизму. В тоже время обсуждается и другой механизм синтеза второй нити. Замещенная родительская однонитевая ДНК имеет на концах самокомплементарные инвертированные повторы, которые отжигаются, восстанавливая двунитевую точку ori, узнаваемую инициирующими белками, обеспечивающими синтез родительско-дочернего дуплекса. Таким образом, каждый родительский дуплекс копируется полуконсервативно.

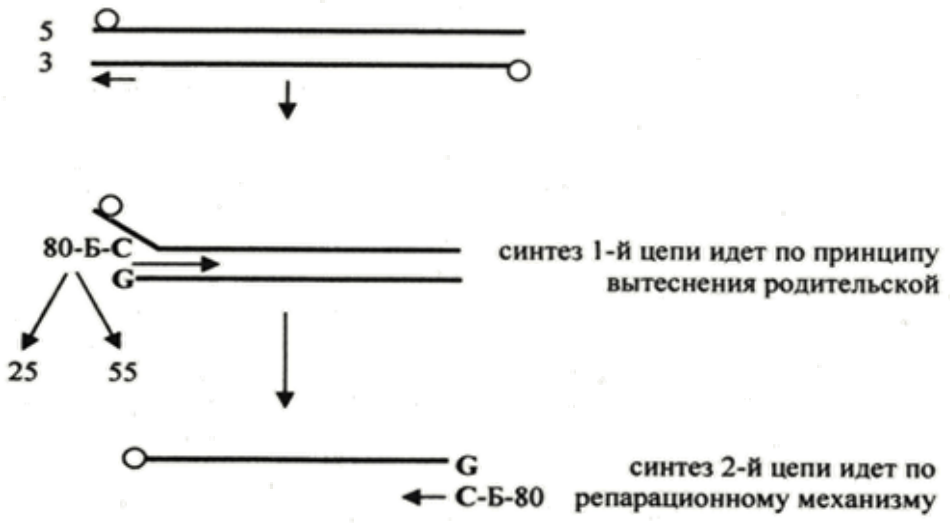


Рисунок 11 – Схема репликации генома аденовируса

Однако процесс протекает без синтеза отстающей цепи, т.е. без образования множественных сайтов инициации и синтеза фрагментов Оказаки.

3 Репликация кольцевых геномов по механизму катящегося кольца (рисунок 12). Катящееся кольцо – способ репликации, при котором репликационная вилка совершает множество оборотов на кольцевой матрице. Синтезирующаяся в каждом цикле нить вытесняет прежнюю (гомологичную) цепь двуцепочечной молекулы, синтезированную в предыдущем цикле, образуя хвост, состоящий из набора последовательностей, комплементарных одноцепочечному матричному кольцу. В общих чертах репликация по механизму катящегося кольца имеет следующие стадии:

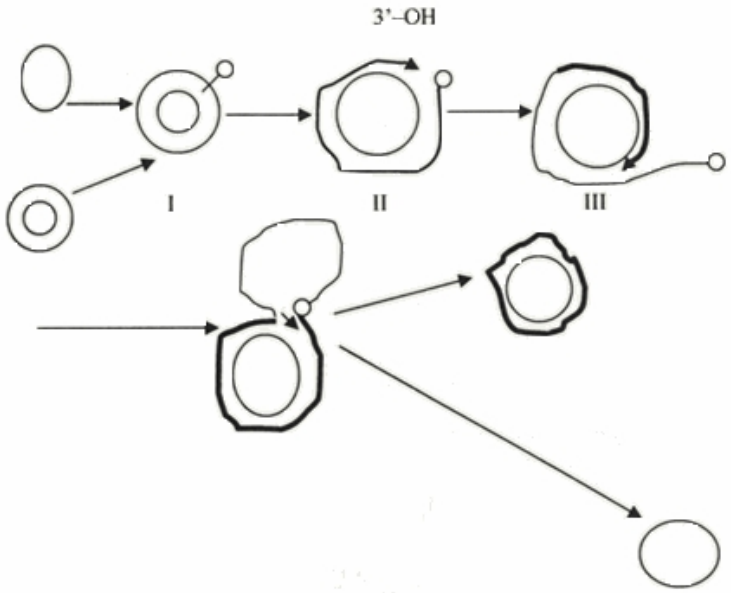


Рисунок 12 – Схема репликации ДНК-геномов по механизму катящегося кольца

1 Вирусоспецифический фермент вносит однонитевой разрыв в уникальном сайте родительской цепи репликативной формы.

2 Фермент остается связанным с 5’-концом, освободившийся 3’-концевой нуклеотид служит затравкой для ДНК-полимеразы.

3 ДНК-полимераза присоединяет нуклеотиды комплементарно замкнутой цепи, то есть синтезируется только лидирующая цепь. 5’-конец родительской цепи вытесняется. Наблюдается образование сигма-молекул (δ).

4 После того, как репликационная вилка завершит чуть больше полного оборота, вытесненная цепь замыкается в кольцо, а фермент перемещается на вновь синтезированную нить и цикл повторяется. Таким образом, вновь синтезированная нить, имеющая последовательность геномной, становится компонентом РФ, а предшествующая (родительская) оказывается в свободном виде.

Механизм катящегося кольца при репликации ДНК используют многие бактериофаги.

Однако этот механизм не игнорируют и вирусы эукариот. Например, линейная вирионная ДНК вируса герпеса при попадании в клетку переходит в кольцевую форму и, пройдя первую стадию тета-репликации (см. ниже), реализует механизм катящегося кольца.

Однако, вместо производства кольцевых дочерних молекул, репликация генерирует конкатамерные молекулы. Чтобы восстановить линейные дочерние молекулы ДНК вирусоспецифические белки расщепляют конкатамеры в определенных сайтах последовательности в процессе упаковки ДНК в капсиды.

4 Репликация ДНК по схеме Кернса (тета-репликация) включает несколько этапов (рисунок 13):

Рисунок 13 – Репликация ДНК по схеме Кернса

1) вирусоспецифический неструктурный белок, обладающий хеликазной активностью, связывается с ДНК-последовательностью в точке ori и расплетает двунитевую структуру;

2) праймаза синтезирует две РНК-затравки. Образуются две репликативные вилки (2 лидирующие и 2 отстающие цепи), которые в процессе комплементарного

синтеза удаляются друг от друга, двигаясь в разных направлениях. Наблюдается образование тета-молекул (θ);

3) сбрасывание внутримолекулярного напряжения обеспечивает топоизомераза I путем внесения точечных однонитевых разрывов, которые тут же лигируются. Образуются два двунитевых кольца, где родительские цепи соединены друг с другом. Разъединение осуществляет топоизомераза II, которая вносит разрывы в двунитевые кольца. Затем разрывы лигируются. Такой тип репликации используют в качестве промежуточной стадии многие крупные ДНК-содержащие вирусы, в том числе: бактриофаги, вирусы герпеса, а также, вирусы с кольцевым днДНК геномом, поражающие человека и животных. Это вирусы, относящиеся к семействам *Polyomaviridae* (см. вирион SV40) и *Papilomaviridae,* ранее входившие в одно семейство *Papovaviridae.* Полиома- и папиломавирусы – это б/о, относительно мелкие (45-55 нм) икосаэдрические вирусы. Капсид, образованный тремя белками, имеет четко выраженную капсомерную структуру (72 капсомера).

Реплицируются в ядре. Геном – двунитевая кольцевая сверхспирализованная ДНК размером 5-8 т.п.н., ассоциированная с 4-мя клеточными гистонами. Кодирует два неструктурных белка – большой и малый Т-АГ. Это трансформирующие антигены. Геном может интегрировать с геномом клетки хозяина. Большой Т-АГ обладает свойством хеликазы и принимает участие в репликации ДНК – связывается с ДНК в точке ori. Гены Т-АГ транскрибируются сразу после попадания ДНК в ядро. Т.о. транскрипция ДНК у этих вирусов опережает репликацию.

5 Репликация ДНК с использованием промежуточных конкатамерных форм. Простейшая схема такой репликации наблюдается у бактериофагов Т-нечетной серии, например Т7. ДНК фага Т7 – линейная двухнитевая молекула с прямыми концевыми повторами. Инициация репликации начинается на внутреннем участке, где расположен промотор для фаговой ДНК-зависимой РНК-полимеразы, которая синтезирует транскрипт, использующийся в качестве затравки для синтеза ДНК. Внутренняя инициация проходит без разрыва родительской цепи. Возникшие две репликативные вилки движутся в разных направлениях, осуществляя полуконсервативную репликацию вирусного генома. Первая стадия этого процесса заканчивается

образованием двух дочерних дуплексов, где вновь синтезированные нити не достроены, так как не произошло копирования 3'-концов родительских цепей, что неизбежно возникает при внутренней инициации на линейной матрице. Таким образом, один из 3'-концов образовавшихся дуплексов находится в однонитевой форме. Поскольку молекула ДНК фага Т7 имеет прямой концевой повтор, однонитевые 3'-концы сестринских молекул взаимно комплементарны и способны к ассоциации. Ассоциация комплементарных последовательностей приводит к образованию димерных молекул – конкатемеров. Далее созревание молекул идет аналогично рассмотренному нами выше способу терминации. Фагоспецифический фермент вносит в димер ступенчатый разрыв таким образом, что выступающими становятся 5'-концы, которые репарируются ДНК-полимеразой (рисунок 14).

•

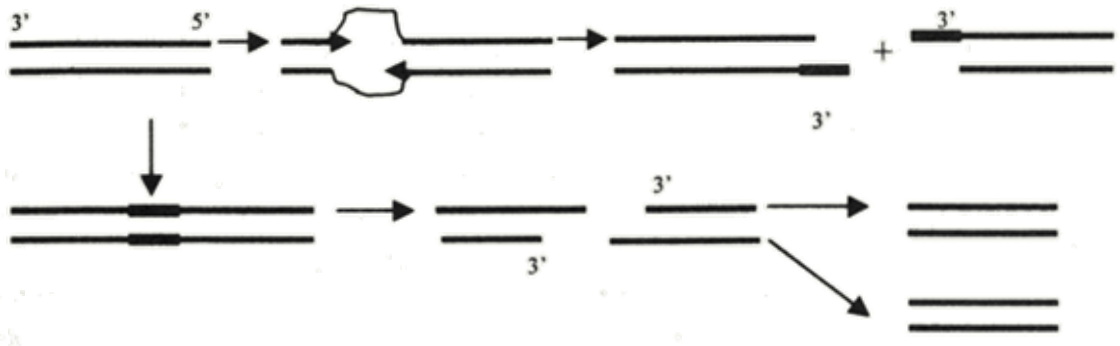


Рисунок 14 – Схема репликации фага Т7

6 Репликация вирусных ДНК через обратную транскрипцию и интеграцию. *Интеграция* – внедрение вирусной (или другой) последовательности ДНК в геном клетки хозяина, приводящее к ковалентному соединению с хозяйской последовательностью. В таком случае репликация вирусного генома и его транскрипция осуществляются по общим клеточным механизмам.

Интеграция вирусного генома в геном хозяина может происходить несколькими путями:

а) интеграция с использованием *сайт-специфической рекомбинации*. В общем смысле рекомбинация – это взаимодействие между специфическими участками ДНК. Сайт-специфическая рекомбинация – взаимодействие между специфическими

парами последовательностей, в пределах которых имеются гомологичные последовательности. Это консервативная рекомбинация. Например, при интеграции ДНК фага λ в рекомбинации участвуют два совершенно определенных участка вирусного и хозяйского геномов – attP и attB, соответственно. Эти участки имеют одинаковые сердцевины, но разные «плечи». Соответственно, фаговая последовательность обозначается как POP', клеточная – BOB'. В результате интеграции образуется участок BOP'-----POB'. Для осуществления интеграции необходима интеграза (топоизомераза I) и клеточный белок IHF (клеточный фактор интеграции). Интегрированный вирусный геном существует в виде *профага* и может выщепляться с участием вирусоспецифического белка;

б) интеграция и репликация в процессе *репликативной транспозиции*. Транспозон – последовательность ДНК, способная реплицироваться и внедрять одну из копий в новое место генома.

Явление репликативной транспозиции установлено для транспозирующего фага Mu. Геном фага – линейная днДНК, размером 30 т.п.н., имеет на концах клеточные, а не вирусные нуклеотидные последовательности, то есть всегда находится в состоянии профага. После попадания вируса в клетку, ДНК приобретает форму, близкую кольцевой, сближая концы. Вирус-специфический белок вносит однонитевые разрывы как в клеточные последовательности фаговой ДНК, так и в ДНК клетки-хозяина. Разрывы могут происходить практически в любом месте ДНК. Выступающие 5'-концы клеточной ДНК ковалентно соединяются с 3'-концами вирусной ДНК. Лишние концы удаляются, бреши репарируются и фаговый геном оказывается встроенным в геном клетки хозяина. Особенностью репликации фага Mu является то, что она идет без выщепления профага. Копии ДНК, образуемые в процессе репликации, эффективно внедряются в новые места ДНК хозяина.

3.7.2 Транскрипция

Транскрипция – первая стадия реализации генетической информации, на которой последовательность геномной нуклеиновой кислоты копируется в виде нуклео-

тидной последовательности мРНК. В основе механизма копирования лежит тот же структурный принцип комплементарного спаривания оснований, что и при матричном синтезе.

3.7.2.1 Основные принципы и механизмы транскрипции у вирусов

Транскрипция осуществляется ферментами РНК-полимеразами. В транскрипции ДНК-геномов вирусов принимает участие ДНК-зависимая РНК-полимераза II, в редких случаях – РНК-полимераза III. В транскрипции РНК-геномов участвует уникальный вирусный фермент РНК-зависимая РНК-полимераза.

Большинство ядерных ДНК-содержащих вирусов используют для транскрипции клеточную РНК-полимеразу II. Поксвирусы (цитоплазматические ДНК-содержащие вирусы) содержат свою ДНК-зависимую РНК-полимеразу, имеющую, тем не менее, сходство с РНК-полимеразой II. Часто вирусы бактерий для ранней транскрипции своих генов используют клеточную РНК-полимеразу II, а для поздней – собственную вновь синтезированную транскриптазу. В то же время, этот фермент может входить и в состав вириона.

В 1970 г. Балтимор с соавторами продемонстрировали наличие в составе вириона вируса везикулярного стоматита РНК-зависимой РНК-полимеразы. Позже этот фермент был найден у арена-, бунья-, орто- и парамиксо-, реовирусов, то есть у вирусов с (-)РНК и днРНК-геномом. У (+)РНК-содержащих вирусов РНК-полимераза детерминирована геномом. РНК-зависимые РНК-полимеразы обладают как транскриптазной, так и репликазной активностью.

Общие принципы транскрипции геномов вирусов сходны с таковыми для клеток про- и эукариот. Индивидуальные особенности проявляются на стадиях посттранскрипционного процессинга (созревания) мРНК и регуляции транскрипции. Синтез молекул РНК начинается в определенном месте матрицы, называемом промотором и заканчивается в определенном месте, называемом терминатором. Участок ДНК, ограниченный промотором и терминатором, представляет собой единицу транскрипции – транскриптон. В пределах транскриптона копируется только одна

цепь, которую называют значащей или матричной. У эукариот в состав транскриптона входит один ген. Транскриптон прокариот содержит несколько генов, его чаще называют оперон. Транскрипционный цикл включает несколько стадий: связывание транскриптазы с матричной цепью, инициацию цепи РНК, элонгацию, терминацию и посттранскрипционный процессинг. Процессинг может включать кэпирование 5'-конца, метилирование гуанидина, полиаденилирование 3'-конца, сплайсинг. При рассмотрении принципов транскрипции следует различать первичную транскрипцию (синтез на геномной матрице) и вторичную транскрипцию (синтез на вновь синтезированной матрице).

Многообразие видов вирусных геномов определяет существование различных подходов к синтезу вирусных мРНК в клетке хозяина. Однако все эти подходы могут быть суммированы в единой схеме стратегии синтеза мРНК (рисунок 15).

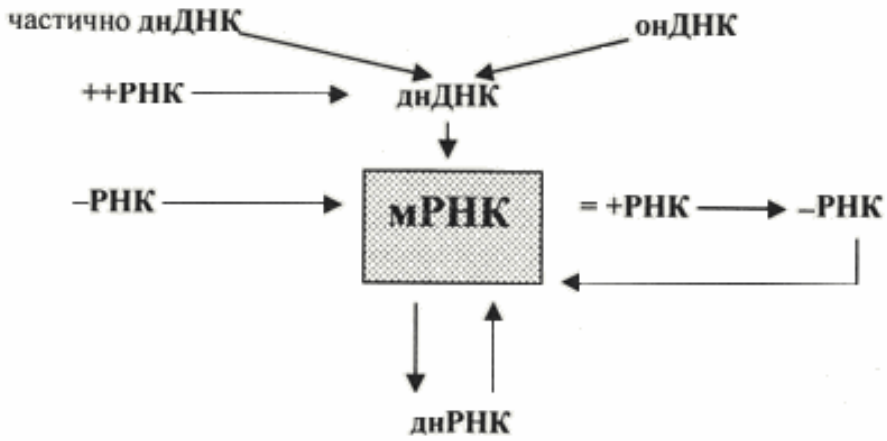


Рисунок 15 – Стратегия транскрипции геномов вирусов

3.7.2.2 Особенности транскрипции РНК-геномов вирусов

Независимо от структуры и стратегии репликации геномов, все вирусы должны экспрессировать гены на ранних этапах инфекции в виде функциональных мРНК, чтобы использовать трансляционный аппарат клетки для синтеза вирусных белков. Исходя из этого различные генетические стратегии, используемые РНК-

вирусами, сосредоточены вокруг вирусных мРНК, которые определены, как ключевая структура в этих процессах. Транскрипция РНК-геномов вирусов осуществляется тем же ферментом, что и репликация – вирусоспецифической RdRp, которая также является транскриптазой. У РНК-содержащих вирусов репликация и транскрипция процессы взаимосвязанные и часто их трудно разделить.

1 (+)РНК-геномы. Геномная (+)РНК – это мРНК, то есть геномная нуклеотидная последовательность соответствует последовательности мРНК. Для осуществления процесса транскрипции вирусам с таким геномом необходимо синтезировать минус-нить с использованием РНК-зависимой РНК-полимеразы, которая чаще детерминирована вирусным геномом и транслируется непосредственно с геномной РНК. Вирусные (+)РНК-геномы не всегда кодируют полную РНК-полимеразу, возможно детерминирование только одной из субъединиц, которая затем ассоциирует с клеточными белками (фаг Qβ, некоторые вирусы растений).

Транскрипция (+)РНК-геномов может протекать двумя путями:

а) с образованием субгеномных мРНК (необходимы для синтеза ранних белков);

б) без образования субгеномных мРНК. В этом случае транскрипция будет являться также и репликацией.

Субгеномные (+)РНК, так же, как и геномные, считываются с полноразмерной минус-нити. Это может происходить двумя способами.

В одном случае образуются субгеномные РНК (один или несколько видов), которые имеют 3'-концы, идентичные 3'-концу полноразмерной плюс-нити, но имеют разные 5'-последовательности. Это связано с тем, что минус-нити РНК имеют участки, подобные промоторам. РНК-полимераза узнает эти участки, связывается с ними и может начинать синтез РНК с них, а не только с 3'-конца. Таким способом образуются субгеномные РНК у альфавирусов и ряда вирусов растений, в том числе у ВТМ.

Другой вариант образования субгеномных РНК реализуется у коронавирусов. В зараженной клетке обнаруживаются 6 классов субгеномных РНК. Нуклеотидные последовательности этих РНК идентичны (+)РНК не только по 3'-, но и по 5'-

концам. Объясняется это тем, что синтез всех плюс-нитей начинается на 3'-конце антигенома с синтеза так называемой лидерной последовательности (-70 нуклеотидов). Этот «лидер» обладает слабой связью с матрицей и может отсоединяться от нее, а затем присоединяться к другому участку в последовательности антигенома. Минус-матрица содержит 6 участков, комплементарных лидерной последовательности, что и определяет существование 6 классов субгеномных РНК.

(+)РНК ⟶ (-)РНК ⟶ мРНК

2 (-)РНК-геномы. Геномная (-)РНК, нуклеотидная последовательность которой комплементарна мРНК, является матрицей для транскрипции и для репликации. Оба эти процесса протекают на матрице, находящейся в составе РНП, при участии вирионной РНК-полимеразы. Синтезируемые мРНК моноцистронны, так как все вирусы с (-)РНК геномом поражают только эукариот. (-)РНК геномы могут быть непрерывны, а могут быть сегментированы.

Механизм образования моноцистронных мРНК на матрице непрерывного (-)РНК-генома до конца не установлен. Наиболее вероятной является модель, установленная для вируса везикулярного стоматита, согласно которой на границах между участками (-)РНК, кодирующими индивидуальные белки, располагаются специальные сигналы, терминирующие и реинициирующие цепи (+)РНК. Каждый такой участок, если идти от 3'- к 5'-концу, заканчивается 7-ю остатками уридиловой кислоты. На этом участке РНК-полимераза как бы пробуксовывает, синтезируя поли-А последовательность, состоящую из нескольких десятков адениловой кислоты. 5'-концы молекул мРНК кэпируются, по всей вероятности, при участии вирусоспецифических ферментов.

Несколько иначе протекает транскрипция сегментированных (-)РНК геномов. Рассмотрим транскрипцию генома вируса гриппа, который представлен 8-ю сегментами (-)РНК. Транскрипция протекает в ядре в составе РНП. В качестве затравки для РНК-полимеразы используются фрагменты транскриптов клеточных мРНК. Вирусоспецифический белок (Р-белок) узнает кэпированные 5'-концы этих транскриптов и фиксирует их на 3-конце геномных РНК. Затем этот же или другой белок вносит

одноцепочечный разрыв на расстоянии 10-13 нуклеотидов от его 5'-конца. Возникающий при этом короткий кэпированный клеточный олигонуклеотид и является затравкой для синтеза вирусоспецифических мРНК. Поли-А последовательность на 3'-конце образуется за счет пробуксовывания полимеразы так же, как и у вируса везикулярного стоматита. Однако на этом особенности транскрипции генов вируса гриппа не заканчиваются. Два геномных сегмента вируса гриппа являются матрицей для синтеза четырех молекул мРНК, так как имеют альтернативные открытые рамки считывания, подобно ДНК-геномам. Два дополнительных вида мРНК образуются путем сплайсинга, осуществляемого клеточными ферментами по обычному механизму.

(-)РНК ⟶ мРНК

3 Диплоидный (+)РНК-геном ретровирусов. Прежде чем произойдет транскрипция ретровирусного генома, он претерпевает целый ряд молекулярных превращений, включающих обратную транскрипцию, интеграцию ДНК в геном хозяина и только после этого — синтез мРНК с использованием клеточного транскрипционного комплекса. Геном ретровирусов монолитен, кодирует полипротеин, то есть транскрибируется без образования субгеномных РНК. Первичные транскрипты подвергаются сплайсингу.

(+)РНК ⟶ ДНК ⟶ интеграция ⟶ мРНК

4 днРНК-геном реовирусов. Транскрипцию осуществляет вирионная транскриптаза — РНК-зависимая РНК-полимераза, находящаяся в составе однокапсидной вирусной частицы.

У сложно устроенных РНК-содержащих вирусов транскрипция происходит не на голой матрице, а в составе транскрипционных комплексов. Капсидные белки обеспечивают правильную конформацию РНК, защиту от клеточных нуклеаз, связь фрагментов генома друг с другом, а также регуляцию транскрипции.

(-)РНК ⟶ мРНК

5 Амбисенс (обоюдозначащая, амбиполярная) РНК. Амбиполярная РНК имеет 5'-конец позитивной полярности, а 3'-конец негативной полярности. При попадании в клетку с геномной РНК считываются два класса комплементарных РНК: с 3'-конца считывается субгеномная мРНК и полноразмерный антигеном. Антигеном, в свою очередь, опять служит матрицей для двух классов РНК. С антигенома считывается вторая субгеномная мРНК и полноразмерная обоюдозначащая геномная, которая идет на построение вирусных частиц.

3.7.2.3 Особенности транскрипции ДНК-геномов вирусов

Каждая клетка млекопитающих содержит приблизительно $6Ч10^9$ пар азотистых оснований ДНК и $> 10^4$ активных промотора. Это создает определенные трудности для вирусной ДНК, т.к. вирусные промоторы должны эффективно конкурировать за использование клеточного транскрипционного аппарата, а завербованный аппарат клетки должен эффективно генерировать вирусные транскрипты. Для этого ДНК-вирусы осуществляют стратегию эффективного инициирования транскрипции на вирусной ДНК в одном или более специфическом промоторе вскоре после того, как ДНК введена в ядро.

Эти промоторы непосредственно управляют транскрипцией так называемых ранних генов.

Энхансеры (гены – усилители). Для того чтобы элементы клеточного транскрипционного аппарата могли взаимодействовать с ранними вирусными промоторами и активизировать транскрипцию, многие ДНК-вирусы содержат гены-усилители или энхансеры – cis-acting регуляторные последовательности, выполняющие роль минимальных промоторов.

В отличие от промоторов, они могут активизировать транскрипцию, находясь выше или ниже сайта связывания, запускающего транскрипцию, со скоростью от тысячи пар азотистых оснований (биты) в секунду. Эта особенность определенных энхансеров подчеркивает конкурентоспособное преимущество к связыванию с вирусными промоторами. Действительно, высокая активность энхансера/промотора

ранних генов цитомегаловируса определяет его частое использование в векторах экспрессии. Хотя клеточные гены часто содержат энхансеры, первый ген-усилитель был обнаружен у полиомавируса SV40. Энхансер SV40 состоит из двух тандемных дупликаций 72 п.н., которые содержат сайты связывания, по крайней мере, для шести различных факторов транскрипции, включая множественные сайты связывания для некоторых факторов. Необходимым условием для оптимальной функции энхансера является его специфическое местоположение и кратность факторов, участвующих в транскрипции.

Многие энхансеры также содержат специфические сайты для "архитектурных" белков, которые не имеют функции активации транскрипции, а образуют с энхансером собственный, скорее стереоспецифический, трехмерный комплекс белка и гена, который назван энхансеосомой. Эти комплексы нуклеопротеида могут активировать транскрипцию со значительной мощностью и специфичностью за счет взаимодействия с РНК-полимеразой II.

Факторы транскрипции вириона. В дополнение к энхансерам некоторые ДНК-вирусы кодируют белки, которые упакованы в вирион, вводятся в клетку с вирусной ДНК и, затем, облегчают транскрипцию ранних генов. Классическим примером этого являются поксвирусы, которые реплицируются в цитоплазме, что делает бесполезным клеточный аппарат транскрипции. Поксвирусы кодируют и упаковывают в вирионы собственную РНК-полимеразу, ферменты кэппирования и полиаденилирования и факторы транскрипции. После проникновения в клетку и раздевания, вирусный транскрипционный аппарат активируется и синтезирует вирусные ранние транскрипты. Другой примером является трансактиватор VP16 вируса простого герпеса (HSV). HSV VP16 синтезируется на поздней стадии инфекции и упаковывается в часть вириона, известную как тегумент, который находится между капсидом и оболочкой. После проникновения HSV в клетку, VP16 транспортируется в ядро, где формирует комплекс, по крайней мере, с двумя клеточными белками – Oct-1, который является активатором транскрипции, узнающим 8 п.н. последовательность ДНК, и HCF-1. Этот трехмерный комплекс связывается со специфической ДНК-последовательностью HSV в области TAATGARAT (R = пурин), расположенной

выше ранних генов. Специфичность и аффинное сродство обеспечивает Oct-1. Комплекс служит мощным активатором транскрипции. Эта функция связана с С- терминальным активационным доменом VP16, который может связываться фактически с любой последовательностью ДНК, расположенной выше ТАТА-бокса промотора, в связи с чем, он может активизировать транскрипцию в любой клетке эукариот. Действительно, VP16 является универсальным активатором транскрипции, т.к. активационный домен VP16 может взаимодействовать со многими различными белками клеточного аппарата транскрипции, однако не ясно, какой именно белок наиболее важен для его действия.

Стимуляция генной экспрессии вирусными ранними белками. В процессе внутриклеточного жизненного цикла ДНК-содержащие вирусы экспрессируют свои гены в высоко упорядоченной последовательности. Хотя экспрессия геномов вирусов может регулироваться посттранскрипционно, главный контроль осуществляется на уровне транскрипции. Вирусные ранние гены кодируют белки, которые, будучи транслированы, стимулируют экспрессию так называемых поздних вирусных генов. Это происходит благодаря наличию ранних и поздних промоторов, которые обычно испытывают недостаток энхансеров или специфических сайтов для комплексов транскрипции, подобных тем, что формируются белками вириона или, например, VP16, для того, чтобы эффективно конкурировать с клеточными промоторами транскрипции. Выражение некоторых вирусных генов (например, поздних генов папиломавирусов) ограничено специфическим состоянием клеточной дифференцировки. В основе этого ограничения может лежать ткане-специфическая экспрессия клеточных факторов транскрипции.

Должно также быть отмечено, что несколько вирусов кодируют белки, которые дополнительно стимулируют экспрессию некоторых вирусных генов в специфическое время жизненного цикла вируса. Кроме того, многие вирусы влияют на экспрессию клеточных генов, что может повлечь за собой индукцию или репрессию специфических генов, а также неспецифическое выключение экспрессии генов. Имеется много механизмов, которые связаны с функцией ранних вирусных белков. Например, белок BZLF1 (также известный, как Zta) вируса Эпштейна-Барр (сем.

Herpesviridae), может вести себя подобно клеточным факторам транскрипции, которые связываются со специфической последовательностью выше генов и активизируют их транскрипцию.

Другие ранние белки увеличивают активность клеточных факторов транскрипции. Например, белок аденовируса E1A замещает членов транскрипции, разрушает комплекс белков семейства E2F и белков-репрессоров семейства Rb. Это увеличивает транскрипцию ранних генов аденовируса, которые содержат E2F-связывающие сайты, что имеет важные последствия для клеточной транскрипции и, косвенно, для репликации вирусной и клеточной ДНК. Другие ранние белки, подобные ICP4 вируса простого герпеса, могут стимулировать транскрипцию путем прямого взаимодействия с транскрипционным аппаратом без связывания со специфическими последовательностями ДНК целевого промотора, или стимулировать экспрессию вирусных генов с использованием механизмов посттранскрипционного процессинга. В любом случае результатом действий этих вирусных белков является то, что клеточный транскрипционный аппарат используется для реализации информационных программ вируса, а не клетки.

Принципы транскрипции ДНК-геномов. По механизму транскрипции ДНК-геномы вирусов можно разделить на 4 группы:

1 днДНК, транскрипцию которой осуществляют клеточные ферменты (ядерные полиома-, адено-, герпесвирусы, ряд бактериофагов, например λ, T4). Как правило, транскрипцию осуществляет РНК-полимераза II, реже – РНК-полимераза III (ряд транскриптов аденовируса). Возможны ситуации, когда транскрипцию ранних генов осуществляет клеточная РНК-полимераза, а поздних – вирусоспецифическая или модифицированная клеточная РНК-полимераза, содержащая вирусоспецифическую субъединицу (фаги T7 и T4, соответственно).

днДНК $\longrightarrow$ мРНК

2 днДНК, раннюю транскрипцию которой осуществляют вирусные полимеразы, входящие в состав вириона. Поздние гены транскрибируются вновь синтезированными вирусными полимеразами, детерминированными геномом вируса (поксви-

русы, фаг N4).

днДНК ⟶ мРНК

3 онДНК, которая прежде чем транскрибироваться должна перейти в двухнитевую форму (парвовирусы, включая дефектные вирусы, требующие для размножения наличия вируса-помощника).

онДНК ⟶ днДНК ⟶ мРНК

4 Кольцевая частично двухнитевая днДНК (вирус гепатита В, вирус мозаики цветной капусты). Прежде чем транскрибироваться, ДНК проходит стадию репарации.

3.7.2.4 Регуляция транскрипции

В вирусных и клеточных системах молекулярные механизмы транскрипции принципиально сходны. Отличие заключается в существовании различных способов регуляции транскрипции вирусных геномов. Необходимость такой регуляции определяется разной потребностью в вирусоспецифических белках. Структурные белки, как правило, требуются в больших количествах, чем белки-ферменты. Кроме того, на ранних стадиях инфекции нужны белки, обеспечивающие репликацию вирусного генома, а на поздних – структурные белки. Поэтому целесообразно, чтобы разные вирусные гены считывались с разной эффективностью, и эта эффективность менялась во времени.

Процесс транскрипции регулируется на уровне транскриптона (оперона) за счет работы репрессоров и активаторов белковой природы и энхансеров (усилителей), которые представляют собой определенные короткие последовательности геномной нуклеиновой кислоты. Транскрипция регулируется количественно и качественно и осуществляется как клеточными, так и вирус-специфическими механизмами.

У вирусов установлено существование целого ряда способов регуляции транс-

крипции.

Временной тип регуляции. У ДНК-содержащих вирусов существует три периода транскрипции: сверхранний, ранний и поздний. При сверхранней и ранней транскрипции считываются сверхранние и ранние гены, при поздней – поздние гены. Количество транскриптов поздних генов превышает количество ранних. Многие сверхранние мРНК являются генами NS белков-ферментов и регуляторов транскрипции и репликации. Поздние мРНК являются генами структурных белков. Фактором регуляции транскрипции у ядерных вирусов является транспорт мРНК в цитоплазму.

Каскадный тип регуляции транскрипции генов. Суть такой регуляции заключается в том, что продукты сверхранней транскрипции, например, α-белки, необходимы для транскрипции другой группы генов, кодирующих β-белки, которые, в свою очередь, включают транскрипцию следующей группы генов – γ-белков.

Полярный тип регуляции определяется порядком расположения генов в геноме. Количество синтезируемых молекул полипептида зависит от расстояния между геном и промотором. Вдоль генома (-)РНК вирусов существует как бы градиент эффективности транскрипции. Чаще транскрибируются гены 3'-региона, реже – гены 5'-конца.

Взаимное расположение и сила регуляторных сигналов. Считывание или несчитывание транскрибируемого участка матрицы зависит от свойств и расположения регуляторных сигналов – промоторов (обеспечивают начало транскрипции) и терминаторов (обеспечивают прекращение транскрипции). Основа регуляции – взаимное расположение регуляторных сигналов и их сила. Активность сигналов может меняться во времени.

Характер образования транскриптов и способ регуляции зависят от того, имеем ли мы дело с вирусами прокариот или эукариот. Напомним, что в клетках прокариот возможна множественная инициация трансляции на полицистронной матрице, тогда как в клетках эукариот на РНК реализуется только одна точка инициации трансляции и эта мРНК функционально моноцистронна. Ограничения, накладываемые клеткой хозяина, в первую очередь сказываются на механизмах транскрипции и

посттранскрипционного созревания мРНК. Приведем конкретные примеры способов регуляции транскрипции вирусных геномов в клетках прокариот и эукариот.

Самый простой способ регуляции транскрипции в клетках прокариот установлен у фагов 1M13 и fd, где разная степень экспрессии фаговых генов регулируется за счет расположения и силы промоторов. За счет наличия «сильных» промоторов активно транскрибируются гены, кодирующие основной структурный белок капсида и ДНК-связывающий белок. В то же время, геномная последовательность, кодирующая минорные вирусные белки, имеет промоторы, отнесенные к разряду «слабых».

Более сложная регуляция транскрипции генов наблюдается у фага λ, имеющего, как минимум, три типа регуляции транскрипции: 1) ретро-регуляция – осуществляется при участии нуклеотидных последовательностей, расположенных за транскрибируемым геном. Этот участок комплементарен предшествующему участку гена и в образовавшемся транскрипте возникает внутримолекулярная двухнитевая структура, которая впоследствии разрушается РНКазой III; 2) аутогенная регуляция – регуляция активности гена при помощи продукта этого же гена; 3) индукция профага – наблюдается в результате инактивации репрессора.

Для бактериофагов показана реализация временного типа регуляции транскрипции, что связано с существованием ранних, средних и поздних генов и соответствующих им промоторов. Так, у фага Т4 структура ранних промоторов близка к таковой промоторов клетки хозяина и именно они сразу узнаются клеточной РНК-полимеразой. Последующая активация средних генов связана с фагоспецифическим белком – продуктом трансляции раннего гена. Система регуляции транскрипции генов фага Т4 включает еще один уникальный механизм – ковалентную и нековалентную модификацию РНК-полимеразы, способствующую узнаванию ею поздних промоторов. Модифицированная РНК-полимераза перестает узнавать промоторы ранних генов.

Еще один способ временной регуляции наблюдается у фага Т7. Суть этого способа заключается в том, что одним из продуктов ранних генов, транскрибированных клеточной РНК-полимеразой, является фаговая РНК-полимераза, которая

узнает уже другой набор промоторов и транскрибирует поздние гены.

Регуляция транскрипции вирусных геномов в эукариотических клетках осуществляется с помощью более сложных механизмов. Кроме промоторов и терминаторов транскрипционная система дополняется новыми регуляторными элементами – энхансерами (усилители), а также и разнообразными способами процессинга первичных транскриптов. В данном разделе мы не станем останавливаться на конкретных способах регуляции транскрипции генов вирусов эукариот, которые, в общих чертах, сходны с перечисленными выше.

Как дополнение, рассмотрим процессинг первичных транскриптов на примере ядерного вируса эукариот – аденовируса. Процессинг – это посттранскрипционные изменения первичных транскриптов или созревание мРНК, включающее кэпирование 5'-конца, полиаденилирование 3'-конца и сплайсинг. У аденовируса лишь кэпирование идет эффективно на разных стадиях репродукции и происходит до завершения синтеза транскрипта. Большой вклад в регуляцию экспрессии аденовирусного генома вносит альтернативное полиаденилирование. Особенно наглядно это видно при образовании поздних мРНК. В первичном транскрипте поздней области генов есть 5 участков, несущих сигнал полиаденилирования (гексануклеотид AAUAAA). Полиаденилирование может произойти в любом участке и из первичного транскрипта может образоваться только одна из 5-ти возможных классов мРНК. От выбора того или иного участка полиаденилирования зависит относительная концентрация той или иной мРНК. Подавляющее большинство кэпированных и полиаденилированных транскриптов аденовирусного генома подвергается альтернативному сплайсингу – удалению различных участков первичного транскрипта, что осуществляется при помощи клеточных механизмов. Наличие альтернативного сплайсинга и альтернативного полиаденилирования при процессинге первичных транскриптов вирусов эукариот определяется моноцистронностью эукариотических мРНК.

3.7.3 Трансляция

Трансляция – синтез белка на матрице РНК. Вирусы не имеют своих белок-синтезирующих систем и используют трансляционный аппарат клетки-хозяина, подчиняясь ограничениям, накладываемым этим хозяином. Так, в клетках эукариот белоксинтезирующий аппарат не приспособлен для инициации трансляции на внутренних участках мРНК. В связи с этим вирусы вынуждены преодолевать ограничения, накладываемые клеткой-хозяином, что в разных вирусных системах решается по-разному. Рассмотрим все эти процессы подробнее.

Общие принципы трансляции мРНК вирусов. Молекулярные механизмы синтеза вирусных белков принципиально не отличаются от синтеза белков клетки хозяина и включают четыре стадии: инициацию, элонгацию, терминацию синтеза и посттрансляционную модификацию белков.

Первые стадии определяются особенностями белоксинтезирующих систем клеток эукариот, где, как правило, функционирует только один инициирующий кодон. Для того чтобы образовать несколько функционально-активных белков, вирусы эукариот вынуждены преодолевать ограничения, накладываемые клеткой хозяина. Это может происходить за счет сегментации генома или образования субгеномных мРНК. Основная стратегия, которую реализуют вирусы эукариот с (+)РНК геномом – это синтез полипротеина, из которого путем ограниченного протеолиза образуются зрелые белки.

Нарезание полипротеинов-предшественников обеспечивают как вирусные, так и клеточные протеазы.

В зависимости от строения активного центра протеазы разделены на 4 класса – сериновые, цистеиновые, аспарагиновые и цинксодержащие. Протеолиз полипротеина у тогавирусов и флавивирусов обеспечивают вирусоспецифические сериновые протеазы, у пикорнавирусов – цистеиновая, у ретровирусов – вирусная аспарагиновая и клеточная сериновая протеиназы. Протеолиз может протекать в ходе трансляции, то есть до завершения синтеза полипротеина (флавивирусы), или после завершения трансляции. Так, у пикорнавирусов протеолиз идет по каскадному ме-

ханизму: сначала образуются крупные фрагменты полипептидной цепи, а затем они нарезаются на более мелкие полипептиды.

Синтезированные вирусные белки подвергаются различным посттрансляционным модификациям:

1 Гликозилирование – является процессом созревания вирусных поверхностных гликопротеинов и осуществляется клеточными гликозилазами на мембранах ЭПР и аппарата Гольджи. Как правило, белки гликозилируются олигосахаридами маннозного типа, но в ряде случае процесс может идти дальше, и эти углеводные цепи замещаются на другие.

2 Ацилирование NH2-конца полипептидных цепей. Широко распространено у вирусов растений. У вирусов человека и животных 1-2 остатка жирных кислот (как правило, это миристиновая кислота) присутствуют в составе белка G вируса везикулярного стоматита, гемагглютинина вируса гриппа (HA), VP2 ротавируса и в белках некоторых других вирусов.

3 Фосфорилирование – осуществляется ферментом протеинкиназой, который может быть вирусоспецифическим или клеточным. Протеинкиназа обнаружена в составе вирионов целого ряда вирусов – вируса оспы, вируса везикулярного стоматита, герпеса, ретровирусов и др. Протеинкиназы вирусного происхождения осуществляют как самофосфорилирование, так и фосфорилирование клеточных белков, что является важным фактором в регуляции экспрессии клеточных и вирусных генов.

4 Протеолитическая модификация – нарезание вирусных полипротеинов и фрагментация поверхностных белков слияния, приводящая к их активации.

Трансляция эукариотических мРНК и сайты вирусной регуляции. Для понимания стратегий трансляции вирусных мРНК (в-мРНК) необходимо вспомнить основные этапы трансляции эукариотических мРНК (э-мРНК), точки ее регуляции и пути передачи сигналов, т.к. разрушение хозяйских сигнальных путей регуляции трансляции может вносить вклад в вирусный патогенез и прогрессию болезни.

Трансляция мРНК в клетках эукариот является сложным мульти-шаговым и мультибелковым процессом. Как очень сложный комплекс биохимических реакций,

он подчинен строгой регуляции и чрезвычайно чувствителен к внутриклеточной и внеклеточной окружающей среде. В общих чертах, трансляция э-мРНК может изменяться в зависимости от концентрации энергетических субстратов, в ответ на митогенное возбуждение и регуляцию клеточного цикла, стресс, и вирусную инфекцию.

Вирусное трансляционное программирование. Специализированный природный аппарат синтеза белка высоко сохранен у прокариот и эукариот и охватывает более чем 30 различных генных продуктов, что требует большого размера генома. Таким образом, имеющая место трансляционная зависимость вирусов исключает необходимость кодирования компонентов для автономного вирусного белкового синтеза.

Вирусы эукариот развили эффективные средства эксплуатации их врожденной трансляционной зависимости через механизмы трансляционного программирования. Это процесс, в котором вирусы перестраивают трансляционный аппарат хозяина для обеспечения синтеза вирусных белков и управлять экспрессией продуктов собственных генов. Последнее особенно важно для РНК-содержащих вирусов, которые имеют ограниченный транскрипционный контроль и в основном полагаются на стратегии регуляции трансляции, которые и модулируют выражение вирусных генов.

Трансляционное программирование включает: 1) использование регуляции выше открытой рамки считывания (uORFs); 2) чтение перекрывающихся рамок считывания; 3) трансляцию мультицистронных мРНК; 4) контроль терминации трансляции. Это позволяет вирусам сохранять минимальный размер генома, делая его эффективным в кодирующей способности. Вообще, механизмы трансляционного программирования заложены непосредственно в структуре мРНК вирусов. Структурные элементы в пределах вирусных мРНК, которые затрагивают ее трансляционную эффективность или осуществляют трансляционный контроль, включают: длину и структурную сложность 5’- и 3’- нетранслируемых регионов (НТР), позицию и контекст инициирующего кодона AUG, стабильность и доступность m7G-кэпа и кэп-связывающего комплекса и положение uORF(s) предшествующего гена. Кроме этого, активные элементы нуклеотидной последовательности, которые связывают

регуляторные факторы, могут передавать дополнительный уровень трансляционного управления на в-мРНК, облегчая трансляционную селективность. Вирусное трансляционное программирование воздействует на все уровни процесса трансляции, включая инициацию, элонгацию, терминацию и трансляционный контроль сигнальных путей хозяина.

Инициация трансляции**.** Основной контроль трансляции мРНК в эукариотических клетках происходит в процессе инициирования. Инициирование трансляции является процессом, в котором мРНК собирается в макромолекулярный комплекс с компонентами, требуемыми для синтеза белка, включая эукариотические факторы инициации (eIF) и факторы элонгации (EF). Инициация начинается с закрепления инициатора метионил-тРНК (Met-tRNAi) с 40S субъединицей рибосомы через формирование тройного комплекса eIF2-GTP-Met-tRNAi. В этом случае IF2 вероятнее всего связывается непосредственно с А-участком рибосомы и облегчает закрепление Met-tRNAi с Р-участком рибосомы. IF2 не является регуляторным белком и поэтому не может вносить вклад в регуляцию трансляции мРНК. Напротив, формирование EIF2-зависимого тройного комплекса и его объединение с Met-tRNAi и 40S субъединицей рибосомы может лимитировать скорость инициации, если альфа субъединица eIF2 (eIF2a) фосфорилируется специфическим белком киназой. Таким образом, фосфорилирование eIF2a представляет главную точку контроля над процессом инициации трансляции, так как изменяет эффективность и темп трансляции мРНК. EIF2 направляет тройной комплекс к 40S субъединице рибосомы, чтобы сформировать 43S комплекс прединициирования, который включает еще один фктор – eIF3. eIF3 облегчает закрепление 43S комплекса прединициирования на мРНК через кэп-связывающий комплекс eIF4F, который независимо собирается вокруг m7G-кэп структуры мРНК.

Сборка eIF4F комплекса на мРНК зависит от eIF4E копонента этого комплекса, который узнает и непосредственно связывает m7G-кэп. Сродство eIF4E к m7G-кэпу является второй главной контрольной точкой в процессе инициации трансляции, которое изменяется через фосфорилирование eIF4E. Кроме этого, кэп-связывающая активность eIF4E может быть блокирована через формирование ком-

плекса eIF4E-eIF4E-связывающий белок (4E-BP), которое приводит к запрещению кэп-зависимой трансляции.

Формирование eIF4E/4E-BP комплекса регулируется через фосфорилирование 4E-BP и отрицательно воздействует на контроль роста клетки через изменение эффективности и селективности трансляции мРНК. Эти критические для кэп-зависимой инициации трансляции точки используются вирусами, которые входят в наиболее изученное семейство пикорнавирусов, включающее вирусы полиомиелита, вирусы энцефаломиокардита, вирус гепатита А и др. Эти вирусы инициируют трансляцию через кэп-независимый механизм, который основан на внутреннем сайте связывания рибосомы (IRES) и опосредован расщеплением 220-kDa кэп-связывающего белка EIF4 и дефосфорилированием 4E-BPs и u1080 формированием неактивного eIF4E/4E-BP комплекса (рисунок 16). Трансляция, опосредованная IRES, требует специфической последовательности в пределах вирусной РНК, которая взаимодействует с факторами хозяина. Таким образом, глобальный процесс IRES–опосредованной трансляции по существу устраняет соревнование с кэп-зависимыми факторами трансляции мРНК клеток, создавая преимущества для трансляции вирусных мРНК.

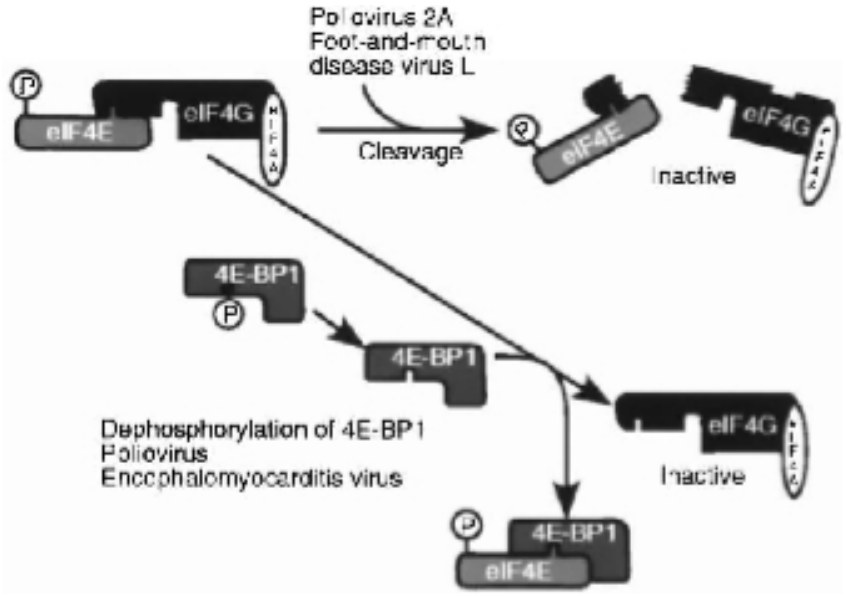


Рисунок 16 – Ингибирование инициации кэп-зависимой трансляции мРНК клетки-хозяина пикорнавирусами

Рибосомное сканирование и выбор сайта AUG. После ассоциации с мРНК, 43S прединициирующий комплекс начинает сканирование мРНК от 5’-конца или, в случае кеп-независимой трансляции, входного сайта рибосомы, и продолжает сканирование до Met-tRNAi и взаимодействия с инициирующим кодоном AUG. Рибосомное сканирование не всегда совместимо с мРНК, которые обладают длинным и/или структурированным 5’-НТР.

Вирусы обладают механизмами, которые позволяют прединициирующему комплексу эффективно избегать большей части 5’-НТР и начинать сканирование в пределах области инициирующего кодона AUG вирусной мРНК. Первая ассоциация Met-tRNAi с инициирующим кодоном AUG приводит к гидролизу GTP в тройном комплексе, связанные факторы инициирования освобождаются и 60S субъединица рибосомы присоединяется к прединициирующему комплексу. В результате 80S инициирующий комплекс опосредует стадию элонгации трансляции. В этой модели, инициация начинается с 5’-проксимального AUG кодона. Однако выбор кодона AUG для инициации трансляции зависит частично от его контекста, где каноническая accAUGg последовательность проявляет самую высокую активность к инициированию. Отступление от этой последовательности связано с так называемым негерметичным сканированием, в котором прединициирующий комплекс редко признает неканонический или слабый AUG и сканирует мимо, чтобы начать трансляцию с кодона, более соответствующего каноническому инициирующему AUG.

Негерметичное сканирование при инициации трансляции популярно среди вирусов, а у ретровирусов оно может обеспечивать определенные стехиометрические взаимоотношения продуктов трансляции.

Удлинение. В течение стадии элонгации трансляции мРНК связана со многими 80S рибосомами, или полисомами, поскольку аминокислотные остатки последовательно присоединяются к COOH-концу растущей цепи пептидов. Во многих вирусных системах жизненный цикл разграничен на ранние и поздние события, которые могут различаться дифференцированным привлечением вирусных мРНК в полисомные комплексы в определенное время после инфекции. Например, у вируса простого герпеса (HSV-1) это часто совпадает с синтезом факторов латентности и

детерминант вирулентности. Процесс трансляции на стадии элонгации подчинен вирусной регуляции. Механизмы контроля элонгации включают, например, рибосомальный сдвиг рамки считывания и направленную вирусом модификацию EF-1. Первый механизм распространен у ретровирусов и связан с наличием дополнительных ORFs в пределах вирусной мРНК.

Терминация. Процесс завершения трансляции происходит в тот момент, когда 80S рибосома сталкивается в рамке считывания с терминирующим кодоном в пределах последовательности мРНК. Терминирующий кодон является фактором, который запускает процесс гидролиза связи пептидной цепи и тРНК, освобождает синтезированный полипептид от 80S рибосомы и разобщает субъединицы рибосомы. Как только завершение синтеза произошло, 40S субъединица может продолжить сканировать мРНК.

При считывании мультицистронной последовательности завершение трансляции может сопровождаться переинициированием трансляции ниже расположенного гена. Завершение трансляции переинициированием распространено среди вирусов и используется ими, чтобы управлять синтезом определенного генного продукта. После открытия полиаденилирования э-мРНК стало ясно, что поли-А трек играет важную роль в трансляции мРНК в клетках эукариот. Современные исследования показали, что определенную роль в стимулирующей функции поли-А трека на процесс трансляции играет поли-А-связывающий белок (PABP). В клетках животных PABP взаимодействует с элементами кэп-связывающего комплекса, включая в его состав 5’- конец мРНК и создавая, таким образом, трансляционный комплекс в форме «закрытой петли» (рисунок 17).

мРНК связующий EIF4F инициирующий комплекс взаимодействует с 3’- концом мРНК через PABP. Поли-А последовательность в пределах 3’-НТР прямым образом связывает PABP с мРНК. PABP добивается взаимодействия с кэп-связывающим комплексом непосредственно через eIF4G (4G) или косвенно через взаимодействие eIF4G, eIF4A (4A) и Paip-1. Сборка комплекса замкнутой системы может стабилизировать взаимодействие 40S субъединицы рибосомы с мРНК.

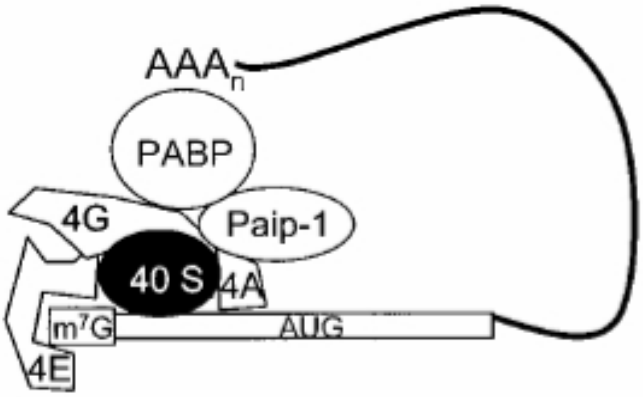


Рисунок 17 – Модель трансляционного комплекса в замкнутой системе с мРНК

PABP формирует закрытую петлю путем связывания eIF4G и белка Paip-1. Paip-1 взаимодействует с компонентами кэп-связывающего комплекса мРНК, включая eIF4G и eIF4A-хеликазу. Изучение инициации трансляции в дрожжах и растениях показали, что взаимодействие между PABP и eIF4G стимулирует трансляцию мРНК. Сближение концов мРНК, обеспеченное закрытым трансляционным комплексом, вносит вклад в стабильность мРНК и 5’-кэп-комплекса и обеспечивает эффективную сборку полирибосом. Таким образом, полный эффект закрытой петли заключается в увеличении эффективности трансляции. Вирусы используют закрытый трансляционный комплекс как средство переключения трансляционного аппарата клетки на трансляцию вирусных мРНК путем разрушения или модификации PABP.

4 Репродукция вирусов

Процесс репродукции вирусов может быть условно разделен на две фазы. Первая фаза охватывает события, которые ведут к адсорбции и проникновению вируса в клетку, освобождению его внутреннего компонента и модификации его таким образом, что он способен вызвать инфекцию. Соответственно, первая фаза включает в себя три стадии:

1) адсорбция вируса на клетках;

2) проникновение в клетки;

3) раздевание вируса в клетке.

Эти стадии направлены на то, чтобы вирус был доставлен в соответствующие клеточные структуры, и его внутренний компонент был освобожден от защитных оболочек. Как только эта цель достигнута, начинается вторая фаза репродукции, в течение которой происходит экспрессия вирусного генома. Эта фаза включает в себя стадии:

1) транскрипции,

2) трансляции информационных РНК,

3) репликации генома,

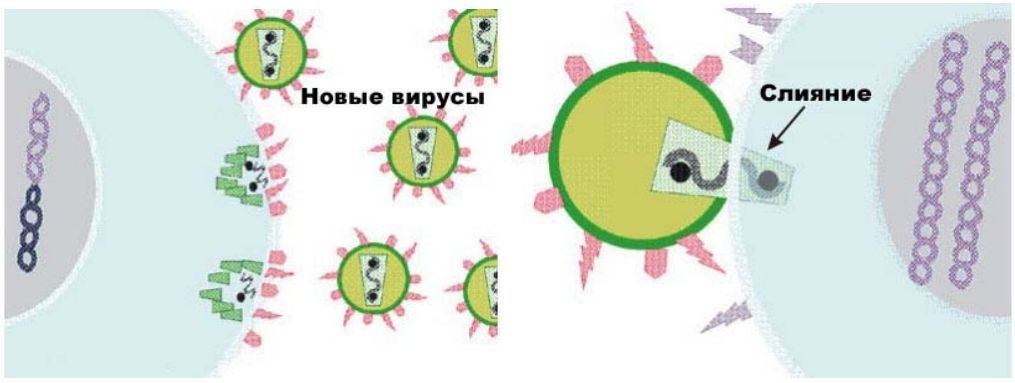
4) сборки вирусных компонентов. Заключительной стадией репродукции является выход вируса из клетки.

4.1 Адсорбция

Взаимодействие вируса с клеткой начинается с процесса адсорбции, т.е. прикрепления вирусных частиц к клеточной поверхности. Процесс адсорбции возможен при наличии соответствующих рецепторов на поверхности клетки и «узнающих» их субстанций на поверхности вируса. Самые начальные процессы адсорбции имеют неспецифический характер, и в основе их может лежать электростатическое взаимодействие положительно и отрицательно заряженных группировок на поверхности вируса и клетки. Однако узнавание клеточных рецепторов вирусными белками, ведущее к прикреплению вирусной частицы к клетке, является высоко специфическим процессом. Белки на поверхности вируса, узнающие специфические группировки на плазматической мембране клетки и обусловливающие прикрепление к ним вирусной частицы, называются прикрепительными белками (рисунок 18).

Вирусы используют рецепторы, предназначенные для прохождения в клетку необходимых для ее жизнедеятельности веществ: питательных веществ, гормонов, факторов роста и т.д. Рецепторы могут иметь разную химическую природу и пред-

ставлять собой белки, углеводный компонент белков и липидов, липиды. Рецепторами для вирусов гриппа и парамиксовирусов является сиаловая кислота в составе гликопротеидов и гликолипидов (ганглиозидов), для рабдовирусов и реовирусов – также углеводный компонент в составе белков и липидов, для пикорна- и аденовирусов – белки, для некоторых вирусов – липиды. Специфические рецепторы играют роль не только в прикреплении вирусной частицы к клеточной поверхности. Они определяют дальнейшую судьбу вирусной частицы, ее внутриклеточный транспорт и доставку в определенные участки цитоплазмы и ядра, где вирус способен инициировать инфекционный процесс. Вирус может прикрепиться и к неспецифическим рецепторам и даже проникнуть в клетку, однако только прикрепление к специфическому рецептору приведет к возникновению инфекции.



а **б**

а – узнавание клеточных рецепторов вирусными белками, ведущее к прикреплению вирусной частицы к клетке; б – прикрепление вируса к клетке.

Рисунок 18 – Адсорбция вируса на клетке

Прикрепление вирусной частицы к клеточной поверхности вначале происходят путем образования единичной связи вирусной частицы с рецептором. Однако такое прикрепление непрочно, и вирусная частица может легко оторваться от клеточной поверхности (обратимая адсорбция). Для того чтобы наступила необратимая адсорбция, должны появиться множественные связи между вирусной частицей и многими молекулами рецепторов, т.е. должно произойти стабильное мультивалентное прикрепление. Количество молекул клеточных рецепторов в участках адсорб-

ции может доходить до 3000. Стабильное связывание вирусной частицы с клеточной поверхностью в результате мультивалентного прикрепления происходит благодаря возможности свободного перемещения молекул рецепторов в липидном бислое плазматической мембраны, которое определяется подвижностью, «текучестью» белково-липидного слоя. Увеличение текучести липидов является одним из наиболее ранних событий при взаимодействии вируса с клеткой, следствием которого является формирование рецепторных полей в месте контакта вируса с клеточной поверхностью и стабильное прикрепление вирусной частицы к возникшим группировкам – необратимая адсорбция.

Количество специфических рецепторов на поверхности клетки колеблется между 10^4 и 10^5 на одну клетку. Рецепторы ряда вирусов могут быть представлены лишь в ограниченном наборе клеток-хозяев, и этим может определяться чувствительность организма к данному вирусу. Например, пикорнавирусы адсорбируются только на клетках приматов. Рецепторы для других вирусов, напротив, широко представлены на поверхности клеток различных видов, как, например, рецепторы для ортомиксовирусов и парамиксовирусов, представляющие собой сиалилсодержащие соединения. Поэтому эти вирусы имеют относительно широкий диапазон клеток, на которых может происходить адсорбция вирусных частиц. Рецепторами для ряда тогавирусов обладают клетки исключительно широкого круга хозяев: эти вирусы могут адсорбироваться к инфицировать клетки, как позвоночных, так и беспозвоночных.

Наличие специфических рецепторов на поверхности клетки в ряде случаев обусловливает феномен зависимого от хозяина ограничения, т.е. способность вируса заражать лишь определенные виды животных. В целом ограничения при взаимодействии рецепторных систем вируса и клетки биологически оправданы и целесообразны, хотя в ряде случаев они являются «перестраховкой». Так, многие линии клеток, устойчивых к вирусам полиомиелита и Коксаки, можно заразить депротеинизированными препаратами РНК, выделенными из этих вирусов. Такое заражение клеток идет в обход естественных входных путей инфекции через взаимодействие с клеточными рецепторами. Известна потенциальная способность вирусов животных ре-

плицироваться в протопластах дрожжей, грибов и бактерий, а бактериофагов – в клетках животных. Таким образом, вирусные ДНК и РНК обладают способностью заражать и более широкий круг хозяев, чем вирусы.

Вирусные прикрепительные белки. Прикрепительные белки могут находиться в составе уникальных органелл, таких как структуры отростка, у Т-бактериофагов или фибры у аденовирусов, которые хорошо видны в электронном микроскопе; могут формировать морфологически менее выраженные, но не менее уникальные аранжировки белковых субъединиц на поверхности вирусных мембран, как, например, шипы у оболочечных вирусов, «корону» у коронавирусов.

Просто организованные вирусы животных содержат прикрепительные белки в составе капсида. У сложно организованных вирусов эти белки входят в состав суперкапсида и представлены множественными молекулами. Например, у вируса леса Семлики (альфа-вирус) имеется 240 молекул гликопротеида в одном вирионе, у вируса гриппа – 300-450 гемагглютинирующих субъединиц, у реовируса – 24 молекулы белка, у аденовируса – 12 фибров.

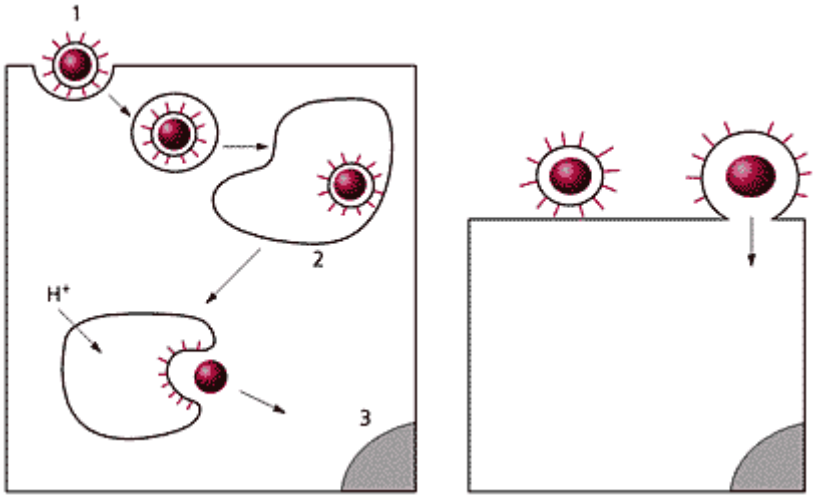
4.2 Проникновение вирусов в клетку

Исторически сложилось представление о двух альтернативных механизмах проникновения в клетку вирусов животных – путем виропексиса (эндоцитоза) и путем слияния вирусной и клеточной мембран (рисунок 19). Однако оба эти механизма не исключают, а дополняют друг друга.

Термин «виропексис», предложенный в 1948 г. Фазекасом де сан Гро, означает, что вирусная частица попадает в цитоплазму в результате инвагинации участка плазматической мембраны и образования вакуоли, которая содержит вирусную частицу.

Рецепторный эндоцитоз. Виропексис представляет собой частный случай рецепторного или адсорбционного эндоцитоза. Этот процесс является обычным механизмом, благодаря которому в клетку поступают питательные и регуляторные белки, гормоны, липопротеины и другие вещества из внеклеточной жидкости. Рецеп-

торный эндоцитоз происходит в специализированных участках плазматической мембраны, где имеются специальные ямки, покрытые со стороны цитоплазмы особым белком с большой молекулярной массой – клатрином. На дне ямки располагаются специфические рецепторы. Ямки обеспечивают быструю инвагинацию и образование покрытых клатрином внутриклеточных вакуолей. Полупериод проникновения вещества внутрь клетки по этому механизму не превышает 10 мин с момента адсорбции. Количество образующихся в одну минуту вакуолей достигает более 2000. Таким образом, рецепторный эндоцитоз представляет собой хорошо слаженный механизм, который обеспечивает быстрое проникновение в клетку чужеродных веществ.



а **б**

а – виропексис (эндоцитоза); б – слияние вирусной и клеточной мембран.

Рисунок 19 – Механизмы проникновения в клетку вирусов

Покрытые вакуоли сливаются с другими, более крупными цитоплазматическими вакуолями, образуя рецептосомы, содержащие рецепторы, но не содержащие клатрин, а те в свою очередь сливаются с лизосомами. Таким путем проникшие в клетку белки обычно транспортируются в лизосомы, где происходит их распад на аминокислоты; они могут и миновать лизосомы, и накапливаться в других участках клетки в недеградированной форме. Альтернативой рецепторного эндоцитоза является жидкостный эндоцитоз, когда инвагинация происходит не в специализированных участках мембраны.

Большинство оболочечных и безоболочечных вирусов животных проникает в клетку по механизму рецепторного эндоцитоза. Эндоцитоз обеспечивает внутриклеточный транспорт вирусной частицы в составе эндоцитарной вакуоли, поскольку вакуоль может двигаться в любом направлении и сливаться с клеточными мембранами (включая ядерную мембрану), освобождая вирусную частицу в соответствующих внутриклеточных участках. Таким путем, например, ядерные вирусы попадают в ядро, а реовирусы – в лизосомы. Однако проникшие в клетку вирусные частицы находятся в составе вакуоли и отделены от цитоплазмы ее стенками. Им предстоит пройти ряд этапов, прежде чем они смогут вызвать инфекционный процесс.

Слияние вирусной и клеточной мембран. Для того чтобы внутренний компонент вируса мог пройти через клеточную мембрану, вирус использует механизм слияния мембран. У оболочечных вирусов слияние обусловлено точечным взаимодействием вирусного белка слияния с липидами клеточной мембраны, в результате которого вирусная липопротеидная оболочка интегрирует с клеточной мембраной, а внутренний компонент вируса оказывается по другую ее сторону. У безоболочечных вирусов один из поверхностных белков также взаимодействует с липидами клеточных мембран, в результате чего внутренний компонент проходит через мембрану. Большинство вирусов животных выходит в цитозол из рецептосомы.

Если при эндоцитозе вирусная частица является пассивным пассажиром, то при слиянии она становится активным участником процесса. Белком слияния является один из ее поверхностных белков. К настоящему времени этот белок идентифицирован лишь у парамиксовирусов и ортомиксовирусов. У парамиксовирусов этот белок (F-белок) представляет собой один из двух гликопротеидов, находящихся на поверхности вирусной частицы.

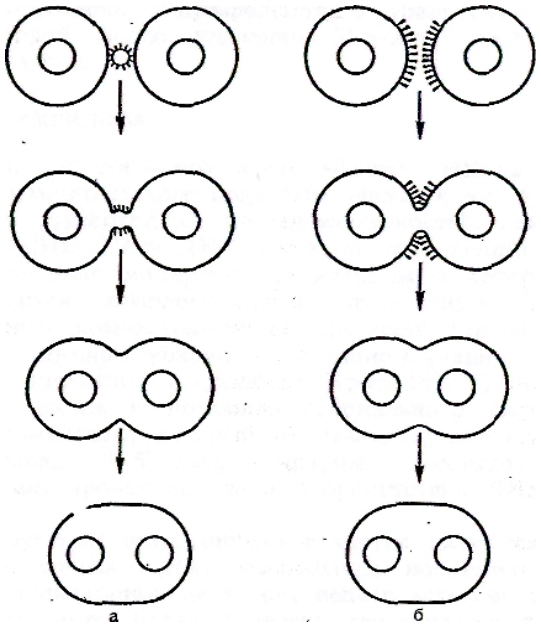
Функцию белка слияния у вируса гриппа выполняет малая гемагглютинирующая субъединица, HA2.

Парамиксовирусы вызывают слияние мембран при нейтральном pH, и внутренний компонент этих вирусов может проникать в клетку непосредственно через плазматическую мембрану. Однако большинство оболочечных и безоболочечных вирусов вызывают слияние мембран только при низком значении pH – от 5,0 до

5,75. Если к клеткам добавить слабые основания (хлорид аммония и др.), которые в эндоцитарных вакуолях повышают pH до 6,0, слияния мембран не происходит, вирусные частицы остаются в вакуолях, и инфекционный процесс не возникает. Строгая зависимость слияния мембран от значений pH обусловлена конформационными изменениями вирусных белков слияния.

В лизосоме постоянно имеется низкое значение pH (4,9). В эндоцитарной вакуоли (рецептосоме) закисление создается за счет АТФ-зависимого «протонового насоса» еще на клеточной поверхности при образовании покрытой вакуоли. Закисление эндоцитарной вакуоли имеет большое значение для проникающих в клетку физиологических лигандов, так как низкое значение pH способствует диссоциации лиганда от рецептора я рециркуляции рецепторов.

Тот же механизм, который лежит в основе слияния вирусных и клеточных мембран, обусловливает индуцированный вирусами гемолиз и слияние плазматических мембран, прилежащих друг к другу клеток с образованием многоядерных клеток, симпластов и синцитиев. Вирусы вызывают два типа слияния клеток: 1) «слияние снаружи» и 2) «слияние изнутри» (рисунок 20). «Слияние снаружи» происходит при высокой множественности инфекции и обнаруживается в течение первых часов после заражения.



а – слияние извне; б – слияние изнутри.

Рисунок 20 – Слияние клеточных мембран при заражении клеток вирусом

Этот тип слияния, описанный для парамиксовирусов, обусловлен белками заражающего вируса и не требует внутриклеточного синтеза вирусных компонентов. Напротив, «слияние изнутри» происходит при низкой множественности инфекции, обнаруживается на сравнительно поздних стадиях инфекционного процесса и обусловлено вновь синтезированными вирусными белками. «Слияние изнутри» описано для многих вирусов: вирусов герпеса, онковирусов, возбудителей медленных инфекций и др. Этот тип слияния вызывают те же вирусные гликопротеиды, которые обеспечивают проникновение вируса в клетку.

4.3 Раздевание

Проникшие в клетку вирусные частицы должны раздеться для того, чтобы вызвать инфекционный процесс. Смысл раздевания заключается в удалении вирусных защитных оболочек, которые препятствуют экспрессии вирусного генома. В результате раздевания освобождается внутренний компонент вируса, который способен вызвать инфекционный процесс. Раздевание сопровождается рядом характерных особенностей: в результате распада вирусной частицы исчезает инфекционная активность, в ряде случаев появляется чувствительность к нуклеазам, возникает устойчивость к нейтрализующему действию антител, теряется фоточувствительность при использовании ряда препаратов.

Конечными продуктами раздевания являются сердцевины, нуклеокапсиды или нуклеиновые кислоты. Для ряда вирусов было показано, что продуктом раздевания являются не голые нуклеиновые кислоты, а нуклеиновые кислоты, связанные с внутренним вирусным белком. Например, конечным продуктом раздевания пикорнавирусов является РНК, ковалентно связанная с белком VP_g, конечным продуктом раздевания аденовирусов, вируса полиомы и SV40 является ДНК, ковалентно связанная с одним из внутренних вирусных белков.

В ряде случаев способность вирусов вызвать инфекционный процесс определяется возможностью их раздевания в клетке данной системы. Тем самым эта стадия является одной из стадий, лимитирующих инфекцию.

Раздевание ряда вирусов происходит в специализированных участках внутри клетка (лизосомах, структурах аппарата Гольджи, околоядерном пространстве, ядерных порах на ядерной мембране). При слиянии вирусной и клеточной мембран проникновение в клетку сочетается с раздеванием.

Раздевание и внутриклеточный транспорт являются взаимосвязанными процессами: при нарушении правильного внутриклеточного транспорта к местам раздевания вирусная частица попадает в лизосому и разрушается лизосомальными ферментами.

Промежуточные формы при раздевании. Раздевание вирусной частицы осуществляется постепенно в результате серии последовательных реакций. Например, в процессе раздевания пикорнавирусы проходят ряд стадий с образованием промежуточных субвирусных частиц с размерами от 156 S до 12 S. Раздевание вирусов ECHO имеет следующие стадии: вирионы (156 S) $\rightarrow$ А-частицы (130 S) $\rightarrow$ РНП и пустые капсиды (80 S) $\rightarrow$ РНК с терминальным белком (12 S). Раздевание аденовирусов происходит в цитоплазме и ядерных порах и имеет по крайней мере 3 стадии:

1) образование субвирусных частиц с большей плотностью, чем вирионы;

2) образование сердцевин, в которых отсутствует 3 вирусных белка;

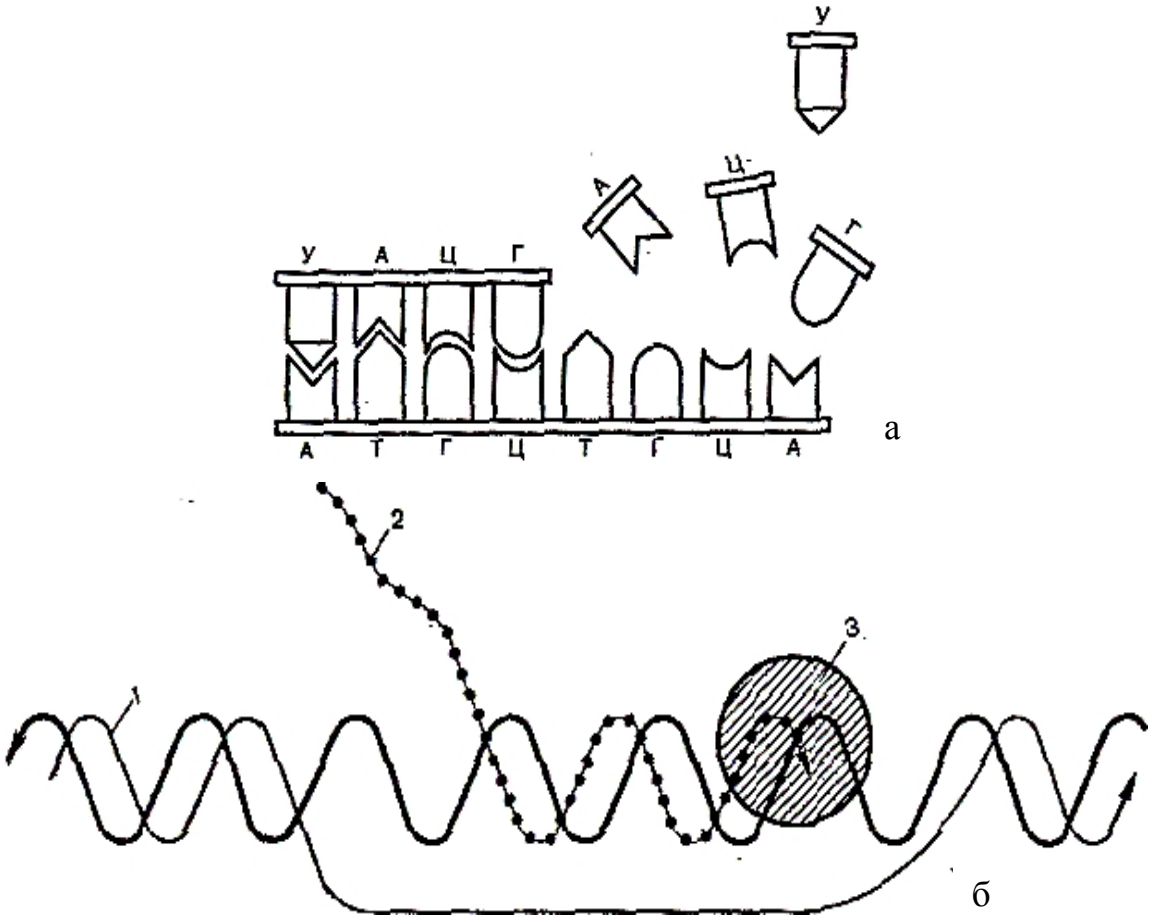
3) образование ДНК-белкового комплекса, в котором ДНК ковалентно соединена с терминальным белком.

Вирус полиомы в процессе раздевания теряет наружные белки и превращается в субвирусную частицу с коэффициентом седиментации 48 S. Затем частицы связываются с ядерными белками (пистонами) и формируется 190 S комплекс (с коэффициентом седиментации 190 S), способный вызвать инфекционный процесс. Вирус гриппа вначале теряет липопротеидную оболочку и превращается в субвирусную частицу, из которой после удаления М-белка освобождается нуклеокапсид.

4.4 Транскрипция

Транскрипция – это переписывание ДНК на РНК по законам генетического кода. Это означает, что РНК состоит из нуклеотидных последовательностей, ком-

плементарных ДНК. Нити ДНК в участке транскрипции разделяются и функционируют как матрицы, к которым присоединяются комплементарные нуклеотиды благодаря спариванию комплементарных оснований (аденин связывается с тимином, урацил – с аденином, гуанин – с цитозином и цитозин – с гуанином) (рисунок 21). Транскрипция осуществляется с помощью специального фермента – РНК-полимеразы, который связывает нуклеотиды путем образования 3'-5'-фосфодиэфирных мостиков. Такое, связывание происходит лишь в присутствии ДНК-матрицы.



а – спаривание комплементарных нуклеогидов при полимеризации; А, Ц, Г, Т, У – сокращенные обозначения аденнна, цитозина, гуанина, тимина, урзцила; б – схема транскрипции ДНК: 1 – ДНК; 2 – растушая нить РНК; 3 – ДНК-зависимая РНК-полимераза.

Рисунок 21 – Транскрипция ДНК и образование комплементарной РНК-цепочки

Продуктами транскрипции в клетке являются иРНК. Сама клеточная ДНК, являющаяся носителем генетической информации, не может непосредственно программировать синтез белка. Передачу генетической информации от ДНК к рибосомам осуществляет РНК-посредник.

Реализация генетической информации у вирусов. Стратегия вирусного генома в отношении синтеза иРНК у разных вирусов различна. У ДНК-содержащих вирусов иРНК синтезируется на матрице одной из нитей ДНК. Формула переноса генетической информации у них такая же, как и в клетке.

ДНК-содержащие вирусы, репродукция которых происходит в ядре, используют для транскрипции клеточную полимеразу. К этим вирусам относятся паповавирусы, аденовирусы, вирусы герпеса. ДНК-содержащие вирусы, репродукция которых происходит в цитоплазме, не могут использовать клеточный фермент, находящийся в ядре. Транскрипция их генома осуществляется вирусспецифическим ферментом – ДНК-полимеразой, которая проникает в клетку в составе вируса. К этим вирусам относятся вирусы оспы и иридовирусы.

РНК-содержащие вирусы, у которых хранителем генетической информации является не ДНК, а РНК, решают эту проблему особым образом. У РНК-содержащих «плюс-нитевых» вирусов, у которых функции иРНК выполняет сам геном, передача генетической информации осуществляется по наиболее простой формуле:

$$\text{РНК} \rightarrow \text{белок}.$$

К этой группе вирусов относятся пикорнавирусы, тогавирусы, коронавирусы. У них нет необходимости в акте транскрипции для синтеза вирусспецифических белков. Поэтому, транскрипцию, как самостоятельный процесс у этих вирусов, не выделяют. Иначе обстоит дело у вирусов, геном которых не может выполнять функцию иРНК. В клетке синтезируется комплементарная геному РНК, которая и является информационной. Передача генетической информации у этих вирусов осуществляется по формуле:

$$\text{РНК} \rightarrow \text{РНК} \rightarrow \text{белок}$$

У этих вирусов транскрипция выделена как самостоятельный процесс в ин-

фекционном цикле. К ним относятся две группы вирусов животных:

1) Вирусы, геном которых представлен однонитчатой РНК: ортомиксовирусы, парамиксовирусы, рабдовирусы, буньявирусы. Поскольку геномная РНК этих вирусов является «минус-нитью», указанную группу вирусов называют «минус-нитевыми» вирусами.

2) Вирусы, геном которых представлен двунитчатой РНК (диплорнавирусы). Среди вирусов животных к ним относятся реовирусы.

В клетке нет фермента, который может полимеризовать нуклеотиды на матрице РНК. Эту функцию выполняет вирусспецифический фермент – РНК-полимераза, или транскриптаза, которая находится в составе вирусов и вместе с ними проникает в клетку.

Среди РНК-содержащих вирусов животных есть семейство ретровирусов, которые имеют уникальный путь передачи генетической информация. РНК этих вирусов переписывается на ДНК, ДНК интегрирует с клеточным геномом и в его составе переписывается на РНК, которая обладает информационными функциями. Путь передачи генетической информации в этом случае осуществляется по более сложной формуле:

$$\text{РНК} \rightarrow \text{ДНК} \rightarrow \text{РНК} \rightarrow \text{белок}$$

В составе этих вирусов есть уникальный вирусспецифический фермент, который переписывает РНК на ДНК. Этот процесс называется обратной транскрипцией, а фермент – обратная транскриптаза, или ревертаза. Тот же фермент синтезирует нить ДНК на матрице ДНК. Двунитчатая ДНК после замыкания в кольцо интегрирует с клеточным геномом, и транскрипцию интегрированной ДНК в составе клеточных геномов осуществляет клеточная РНК-полимераза. Поскольку иРНК ретровирусов гомологична геномной РНК (а не комплементарна ей), ретровирусы являются «плюс-нитевыми» вирусами.

Ферменты, транскрибирующие вирусный геном. Транскрипция ряда ДНК-содержащих вирусов – паповавирусов, аденовирусов, вирусов герпеса, парвовирусов, гепаднавирусов осуществляется в ядре клетки, и в этом процессе широко используются механизмы клеточной транскрипции – ферменты транскрипции и даль-

нейшей модификации транскриптов. Транскрипция этих вирусов осуществляется клеточной РНК-полимеразой II – ферментом, который осуществляет транскрипцию клеточного генома. Однако особая группа транскриптов аденовируса синтезируется с помощью другого клеточного фермента – РНК-полимеразы III. У двух других семейств ДНК-содержащих вирусов животных – вирусов оспы и иридовирусов – транскрипция происходит в цитоплазме. Поскольку в цитоплазме нет клеточных полимераз, транскрипция этих вирусов нуждается в специальном вирусном ферменте – вирусной РНК-полимеразе. Этот фермент является структурным вирусным белком.

У РНК-содержащих вирусов транскрипция осуществляется вирус-специфическими транскриптазами, т.е. ферментами, закодированными в вирусном геноме. Вирусспецифические транскриптазы могут быть как структурными белками, входящими в состав вириона (эндогенная транскриптаза), так и неструктурными белками, которые синтезируются в зараженной клетке, но не включаются в вирион.

Транскрипция в зараженной клетке. Синтез комплементарных РНК на родительских матрицах с помощью родительской транскриптазы носит название первичной транскрипций в отличие от вторичной транскрипции, происходящей на более поздних стадиях инфекционного цикла на вновь синтезированных, дочерних матрицах, с помощью вновь синтезированной транскриптазы. Большая часть иРНК в зараженной клетке является продуктом вторичной транскрипции.

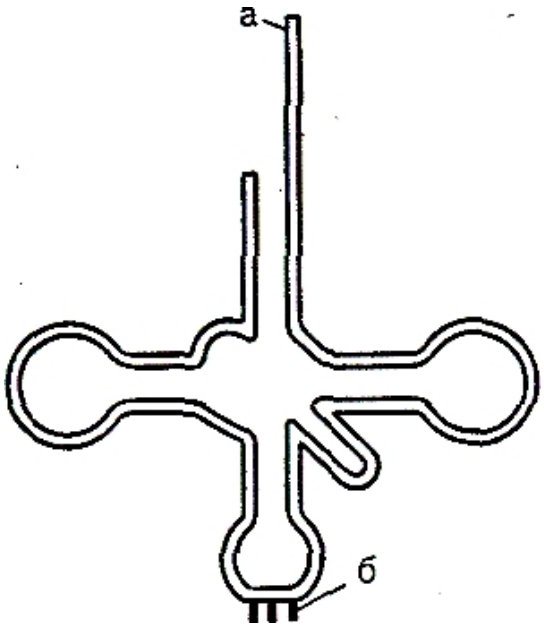
Транскриптивные комплексы. У сложно устроенных РНК-содержащих вирусов животных транскрипция происходит не на матрице голой РНК, а в составе вирусных нуклеокапсидов или сердцевин (транскриптивные комплексы). Связанные с геномом капсидные белки не только не препятствуют транскрипции, но и необходимы для нее, обеспечивая правильную конформацию тяжа РНК, защиту его от клеточных протеаз, связь отдельных фрагментов генома друг с другом, а также регуляцию транскрипции.

Вновь синтезированные иРНК выходят из транскриптивных комплексов и транспортируются к рибосомам.

4.5 Трансляция

Синтез белка в клетке происходит в результате трансляции иРНК. Трансляцией называется процесс перевода генетической информации, содержащейся в иРНК, на специфическую последовательность аминокислот. Иными словами, в процессе трансляции осуществляется перевод 4-буквенного языка азотистых оснований на 20-буквенный язык аминокислот.

Транспортные РНК. Свою аминокислоту тРНК узнают по конфигурации ее боковой цепи, а специфический фермент аминоацил-синтетаза катализирует ассоциацию тРНК с аминокислотой. В клетке существует большое количество разнообразных видов тРНК. Поскольку для каждой аминокислоты должна быть своя тРНК, количество видов тРНК должно быть не меньше 20, однако в клетке их значительно больше. Это связано с тем, что для каждой аминокислоты существует не один, а несколько видов тРНК. Молекула тРНК представляет собой однонитчатую РНК со сложной структурой в виде кленового листа (рисунок 22). Один ее конец связывается с аминокислотой (конец а), а противоположный – с нуклеотидами иРНК, которым они комплементарны (конец б).



а – участок связывания с аминокислотой; б – участок связывания с иРНК (автикодон).

Рисунок 22 – Строение транспортной РНК

Три нуклеотида на иРНК кодируют одну аминокислоту и называются «триплет» или «кодон», комплементарные кодону три нуклеотида на конце тРНК называются «антикодон».

Рибосомы. Синтез белка в клетке осуществляется на рибосоме. Рибосома состоит из двух субъединиц, большой и малой, малая субъединица, примерно, в два раза меньше большой. Обе субъединицы содержат по одной молекуле рибосомальной РНК и ряд белков. Рибосомальные РНК синтезируются в ядре на матрице ДНК с помощью РНК-полимеразы. В малой рибосомальной субъединице есть канал, в котором находится информационная РНК. В большой рибосомальной субъединице есть две полости, захватывающие также малую рибосомальную субъединицу. Одна из них содержит аминоацильный центр (А-центр), другая – пептидильный центр (П-центр).

Фазы трансляции. Процесс трансляции состоит из трех фаз:

1) инициации;

2) элонгации;

3) терминации.

Инициация трансляции. Это наиболее ответственный этап в процессе трансляции, основанный на узнавании рибосомой иРНК и связывании с ее особыми участками. Рибосома узнает иРНК благодаря «шапочке» на 5'-конце и скользит к 3'-концу, пока не достигнет инициаторного кодона, с которого начинается трансляция. В эукариотической клетке инициаторным кодоном является кодон АУГ или ГУГ, кодирующие метионин. С метионина начинается синтез всех полипептидных цепей.

Вначале с иРНК связывается малая рибосомальная субъединица. К комплексу иРНК с малой рибосомальной субъединицей присоединяются другие компоненты, необходимые для начала трансляции. Это несколько молекул, которые называются «инициаторные факторы».

Их, по крайней мере, три в прокариотической клетке и более девяти в эукариотической клетке. Инициаторные факторы определяют узнавание рибосомой специфических иРНК и, таким образом, являются определяющим фактором в дискриминации между различными иРНК, присутствующими в клетке, как правило, в из-

быточном количестве.

В результате формируется комплекс, необходимый для инициации трансляции, который называется инициаторным комплексом. В инициаторный комплекс входят:

1) иРНК;

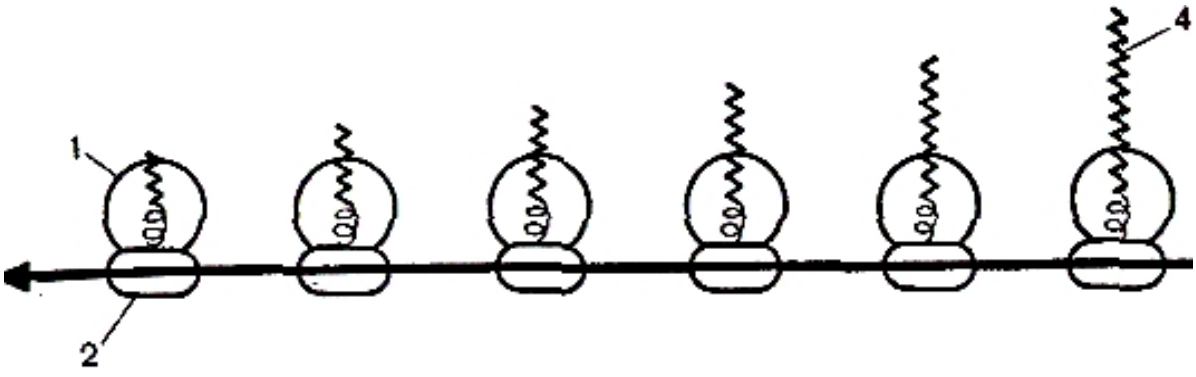
2) малая рибосомальная субъединица;

3) аминоацил-тРНК, несущая инициаторную аминокислоту;

4) инициаторные факторы;

5) несколько молекул ГТФ.

В рибосоме осуществляется слияние потока информации с потоком аминокислот. Аминоацил-тРНК входит в А-центр большой рибосомальной субъединицы, и ее антикодон взаимодействует с кодоном иРНК, находящейся в малой рибосомальной субъединице. При продвижении иРНК на один кодон тРНК перебрасывается в пептидильный центр, и ее аминокислота присоединяется к инициаторной аминокислоте с образованием первой пептидной связи. Свободная от аминокислоты тРНК выходит из рибосомы и может опять функционировать в транспорте специфических аминокислот. На ее место из А-центра в П-центр перебрасывается новая тРНК и образуется новая пептидная связь, в А-центре появляется вакантный кодон иРНК, к которому немедленно присоединяется соответствующая тРНК и происходит присоединение новых аминокислот к растущей полипептидной цепи (рисунок 23).



1 – большая рибосомальная субъединица; 2 – малая рибосомальная субъединица; 3 – иРНК; 4 – растущая полипептидная нить.

Рисунок 23 – Синтез белков на полисомах

Элонгация трансляции. Это процесс удлинения, наращивания полипептидной цепи, основанный на присоединении новых аминокислот с помощью пептидной связи. Происходит постоянное протягивание нити иРНК через рибосому и «декодирование» заложенной в ней генетической информации (рисунок 23). иРНК функционирует на нескольких рибосомах, каждая из которых синтезирует одну и ту же полипептидную нить, кодируемую данной иРНК. Группа рибосом, работающих на одной молекуле иРНК, называется полирибосомой, или полисомой. Размер полисом значительно варьирует в зависимости от длины молекулы иРНК, а также от расстояния между рибосомами. Так, полисомы, которые синтезируют гемоглобин, состоят из 4-6 рибосом, высокомолекулярные белки синтезируются на полирибосомах, содержащих 20 и более рибосом.

Терминация трансляции. Терминация трансляции происходит в тот момент, когда рибосома доходит до терминирующего кодона в составе иРНК. Трансляция прекращается, и полипептидная цепь освобождается из полирибосомы. После окончания трансляции полирибосомы распадаются на субъединицы, которые могут войти в состав новых полирибосом.

Свойства полирибосом. По топографии в клетке полирибосомы делят на две большие группы – свободные и связанные с мембранами эндоплазм этической сети, которые составляют соответственно 75 % и 25 %. Между двумя группами полирибосом нет принципиальных структурных и функциональных различий, они формируются из одного и того же пула субъединиц и в процессе трансляции могут обмениваться субъединицами. Мембраны, с которыми связаны полирибосомы, называются грубыми или шероховатыми мембранами в отличие от гладких мембран, не содержащих полирибосомы. Связь полирибосом с мембранами осуществляется с помощью сигнального пептида – специфической последовательности на амино конце синтезирующихся гликопротеидов. На связанных с мембранами полирибосомах синтезируются внутримембранные белки, которые сразу же после синтеза оказываются в составе мембран.

Трансляция в зараженных вирусом клетках. Стратегия вирусного генома, использующего клеточный аппарат трансляции, должна быть направлена на созда-

ние механизма для подавления трансляции собственных клеточных иРНК и для избирательной трансляции вирусных иРНК, которые всегда находятся в значительно меньшем количестве, чем клеточные матрицы. Этот механизм реализуется на уровне специфического узнавания малой рибосомальной субъединицей вирусных иРНК, т.е. на уровне формирования инициирующего комплекса. Поскольку многие вирусы не подавляют синтез клеточных иРНК, в зараженных клетках возникает парадоксальная ситуация: прекращается трансляция огромного фонда функционально активных клеточных иРНК, и на освободившихся рибосомах начинается трансляция одиночных молекул вирусных иРНК. Специфическое узнавание рибосомой вирусных иРНК осуществляется за счет вирусспецифических инициаторных факторов.

Два способа формирования вирусных белков. Поскольку геном вируса животных представлен молекулой, кодирующей более чем один белок, вирусы поставлены перед необходимостью синтеза либо длинной иРНК, кодирующей один гигантский полипептид-предшественник, который затем должен быть нарезан в специфических точках на функционально активные белки, либо коротких моноцистронных иРНК, каждая из которых кодирует один белок. Таким образом, существуют два способа формирования вирусных белков: 1) иРНК транслируется в гигантский полипептид-предшественник, который после синтеза последовательно нарезается на зрелые функционально активные белки; 2) иРНК транслируется с образованием зрелых белков, или белков, которые лишь незначительно модифицируются после синтеза.

Первый способ трансляции характерен для РНК-содержащих «плюс-нитевых» вирусов – пикорнавирусов и тогавирусов. Их иРНК транслируется в гигантскую полипептидную цепь, так называемый полипротеид, который сползает в виде непрерывной ленты с рибосомного «конвейера» и нарезается на индивидуальные белки нужного размера. Нарезание вирусных белков является многоступенчатым процессом, осуществляемым как вирусспецифическими, так и клеточными протеазами. В клетках, зараженных пикорнавирусами, на конце полипротеина-предшественника находится белок с протеазной активностью. Вирусная протеаза осуществляет нарезание предшественника на 3 фрагмента, один из которых является предшественни-

ком для структурных белков, второй – для неструктурных белков, функции третьего фрагмента неизвестны. В дальнейшем нарезании участвуют вирусоспецифические и клеточные протеазы.

Интересный вариант первого способа трансляции обнаруживается у альфавирусов (семейство тогавирусов). Геномная РНК с коэффициентом седиментации 42 S транслируется с образованием полипептида-предшественника для неструктурных белков. Однако доминирующей в зараженных клетках иРНК является РНК с коэффициентом седиментации 26 S, составляющая одну треть геномной РНК. Эта иРНК транслируется с образованием предшественника для структурных белков.

Второй способ формирования белков характерен для ДНК-содержащих вирусов и большинства РНК-содержащих вирусов. При этом способе синтезируются короткие моноцистронные иРНК в результате избирательной транскрипции одного участка генома (гена). Однако все вирусы широко используют механизм посттрансляционного нарезания белка.

Вирусспецифические полисомы. Поскольку длина вирусных и РНК варьирует в широких пределах, размер вирусспецифических полисом также широко варьирует: от 3-4 до нескольких десятков рибосом на одной нити иРНК. При инфекциях, вызванных пикорнавирусами, формируются крупные полисомы, представляющие собой агрегаты, состоящие из 20-60 рибосом. При инфекциях, вызванных другими вирусами животных, использующими второй способ трансляции, формируются полисомы небольшого размера. Между размерами иРНК и величиной полисом существует определенная корреляция, однако в ряде случаев полисомы имеют больший или меньший размер по сравнению с ожидаемым. Эта особенность вирусных полисом объясняется необычным пространственным расположением рибосом на вирусных матрицах, связанных с меньшей плотностью упаковки рибосом на молекуле иРНК.

Вирусспецифические полисомы могут быть как свободными, так и связанными с мембранами. В зараженных вирусом полиомиелита клетках полипротеид синтезируется на связанных с мембранами полисомах; при инфекциях, вызванных сложно устроенными вирусами, формируются как свободные, так и связанные с

мембранами полисомы, которые вовлечены в синтез разных классов вирусных полипептидов. Внутренние белки обычно синтезируются на свободных полисомах, гликопротеиды всегда синтезируются на полисомах, связанных с мембранами.

Модификация вирусных белков. В эукариотической клетке многие белки, в том числе вирусные, подвергаются посттрансляционным модификациям, и зрелые функционально активные белки часто не идентичны их вновь синтезированным предшественникам. Широко распространены такие посттрансляционные ковалентные модификации, как гликозилирование, ацилирование, метилирование, сульфирование (образование дисульфидных связей), протеолитическое нарезание и, наконец, фосфорилирование. В результате вместо 20 генетически закодированных аминокислот из различных клеток разных органов эукариотов выделено около 140 дериватов аминокислот.

Среди широкого спектра модифицированных реакций лишь небольшое количество процессов является обратимыми:

1) фосфорилирование-дефосфорилирование;

2) ацилирование-деацилирование;

3) метилирование-деметилирование;

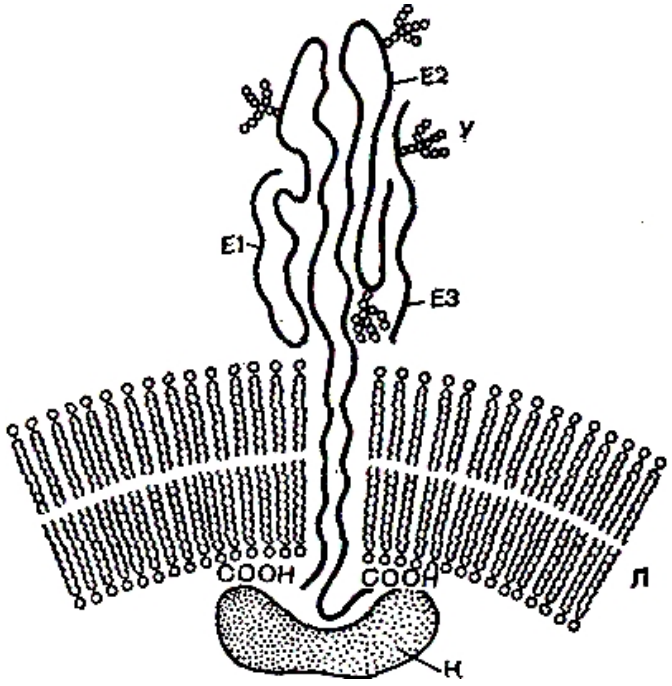
4) образование дисульфидных связей.

Среди подобных обратимых модификаций белков следует искать процессы, обусловливающие механизм регуляции активности белков в эукариотической клетке.

Гликозилирование. В составе сложно устроенных РНК- и ДНК-содержащих вирусов имеются белки, содержащие ковалентно присоединенные боковые цепочки углеводов – гликопротеиды. Гликопротеиды расположены в составе вирусных оболочек и находятся на поверхности вирусных частиц. Своей гидрофобной частью они погружены в двойной слой липидов, а некоторые гликопротеиды проникают через него и взаимодействуют с внутренним компонентом вируса (рисунок 24). Гидрофильная часть молекулы обращена наружу.

Синтез и внутриклеточный транспорт гликопротеидов характеризуется рядом особенностей, присущих клеточным внутримембранным белкам. Их синтез осуще-

ствляется на полисомах, ассоциированных с мембранами, и белки сразу же после синтеза попадают в шероховатые мембраны, откуда транспортируются в мембраны эндоплазматической сети и в комплекс Гольджи, где происходит модификация и комплектование углеводной цепочки, а затем – в плазматическую мембрану в ряде случаев путем слияния с ней везикул комплекса Гольджи. Такой целенаправленный транспорт осуществляется благодаря имеющейся на аминоконце белка специфической последовательности от 20 до 30 аминокислот (сигнальному пептиду). Сигнальный пептид отрезается от белковой молекулы после того, как гликопротеид достигает плазматической мембраны.



El, E2, E3 – молекулы вирусных гликопротеидов; К – капсидный белок; У – углеводные цепочки; Л – липидный бислой.

Рисунок 24 – Строение липопротеидной оболочки вируса Синдбяс

Гликозилирование полипептидов является сложным многоступенчатым процессом, первые этапы которого начинаются уже в процессе синтеза полипептидов, и первый сахар присоединяется к полипептидной цепи, еще не сошедшей с рибосомы. Последующие этапы гликозилирования происходят путем последовательного присоединения сахаров в виде блоков к углеводной цепочке в процессе транспорта полипептида к плазматической мембране. Окончательное формирование углеводной

цепочки может завершаться на плазматической мембране перед сборкой вирусной частицы. Процесс гликозилирования не влияет на транспорт полипептида к плазматической мембране, но имеет существенное значение для экспрессии биологической активности белка. При подавлении гликозилирования соответствующими ингибиторами (аналоги Сахаров типа 2-дезоксиглюкозы, антибиотик туникамицин) нарушается синтез полипептидов, блокируется сборка вирионов миксовирусов, рабдовирусов, альфавирусов или образуются неинфекционные вирионы герпеса и онковирусов.

Сульфирование. Некоторые белки сложно устроенных РНК- и ДНК-содержащих вирусов сульфируются после трансляции. Чаще всего сульфированию подвергаются гликопротеиды, при этом сульфатная группа связывается с сахарным компонентом гликопротеида.

Ацилировалие. Ряд гликопротеидов сложно устроенных РНК-содержащих вирусов (НА2 вируса гриппа, белок G вируса везикулярного стоматита, белок HN вируса ньюкаслской болезни и др.) содержат ковалентно связанные 1-2 молекулы жирных кислот.

Нарезание. Многие вирусные белки и в первую очередь гликопротеиды приобретают функциональную активность лишь после того, как произойдет их нарезание в специфических точках протеолитическими ферментами. Нарезание происходит либо с образованием двух функциональных белковых субъединиц (например, большая и малая субъединицы гемагглютинина вируса гриппа, два гликопротеида, E_2 и E_3, вируса леса Семлики) либо с образованием одного функционально активного белка и неактивного фрагмента, например, белки F и HN парамиксовирусов. Нарезание обычно осуществляется клеточными ферментами. У многих сложно устроенных вирусов животных, имеющих гликопротеид, нарезание необходимо для формирования активных прикрепительных белков и белков слияния и, следовательно, для приобретения вирусом способности инфицировать клетку. Лишь после нарезания этих белков вирусная частица приобретает инфекционную активность. Таким образом, можно говорить о протеолитической активации ряда вирусов, осуществляемой с помощью клеточных ферментов.

Фосфорилирование. Фосфорпротеиды содержатся практически в составе всех вирусов животных, РНК- и ДНК-содержащих, просто и сложно устроенных. В составе большинства вирусов обнаружены протеинкиназы, однако фосфорилирование может осуществляться как вирусными, так и клеточными ферментами. Обычно фосфорилируются белки, связанные с вирусным геномом и осуществляющие регулирующую роль в его экспрессии. Одним из примеров является фосфорирование белка онкогенных вирусов, обусловливающего клеточную трансформацию. Этот белок является продуктом гена Src и одновременно протеинкиназой и фосфопротеидом, т.е. способен к самофосфорилированию.

С процессом фосфорилирования связан механизм антивирусного действия интерферона. В зараженных вирусом клетках интерферон индуцирует синтез протеинкиназы, которая фосфорилирует субъединицу инициирующего фактора трансляции ЭИФ-2, в результате чего блокируется трансляция вирусных информационных РНК. Фосфорилирование белков играет регулирующую роль в транскрипции и трансляции вирусных иРНК, специфическом узнавании вирусных иРНК рибосомой, белок-нуклеиновом и белок-белковом узнавании на стадии сборки вирусных частиц.

4.6 Репликация

Репликацией называется синтез молекул нуклеиновой кислоты, гомологичных геному. В клетке происходит репликация ДНК, в результате которой образуются дочерние двунитчатые ДНК. Репликация происходит на расплетенных участках ДНК и идет одновременно на обеих нитях от 5'-конца к З'-концу. Поскольку две нити ДНК имеют противоположную полярность 5'-*-3' и $3' \rightarrow 5'$, а участок репликации («вилка») движется в одном направлении, одна цепь строится в обратном направлении отдельными фрагментами, которые называются фрагментами Оказаки (по имени ученого, впервые предложившего такую модель). После синтеза фрагменты Оказаки «сшиваются» лигазой в единую нить.

Репликация ДНК осуществляется ДНК-полимеразами. Для начала репликации необходим предварительный синтез короткого участка РНК на матрице ДНК, кото-

рый называется затравкой. С затравки начинается синтез нити ДНК, после чего РНК быстро удаляется с растущего участка.

Репликация вирусных ДНК. Репликация генома ДНК-содержащих вирусов в основном катализируется клеточными фрагментами и механизм ее сходен с механизмом репликации клеточной ДНК.

Каждая вновь синтезированная молекула ДНК состоит из одной родительской и одной вновь синтезированной нити. Такой механизм репликации называется полуконсервативным,

У вирусов, содержащих кольцевые двунитчатые ДНК (паповавирусы), разрезается одна из нитей ДНК, что ведет к раскручиванию и снятию супервитков на определенном участке молекулы (рисунок 25).

При репликации однонитчатых ДНК (семейство парвовирусов) происходит образование двух нитчатых форм, которые представляют собой промежуточные репликативные формы.

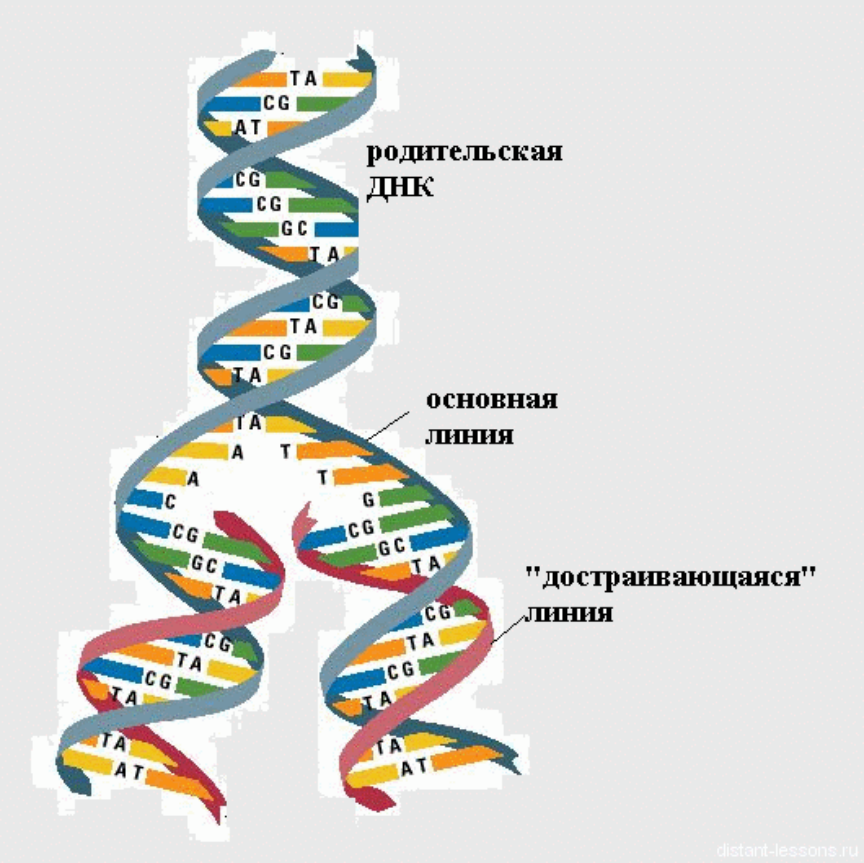


Рисунок 25 – Репликация ДНК (схема)

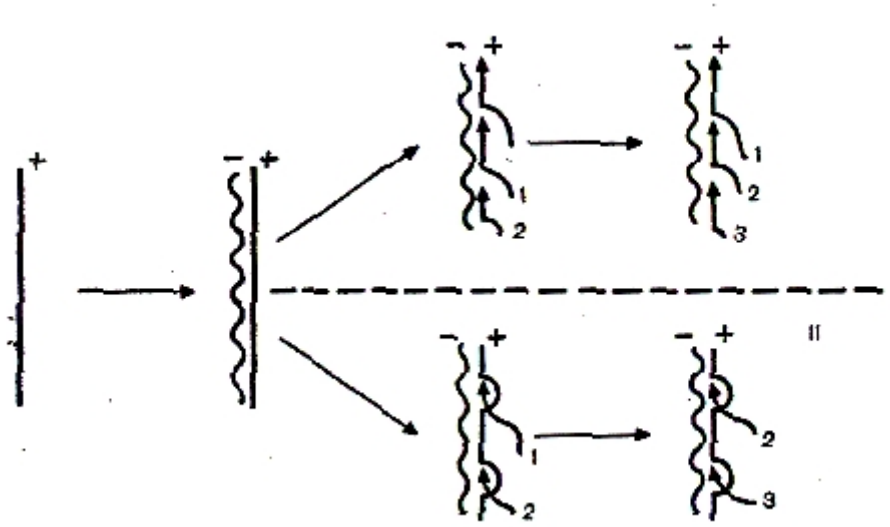
Репликация вирусных РНК. В клетке нет ферментов, способных осуществить репликацию РНК. Поэтому ферменты, участвующие в репликации, всегда вирусспецифическую репликацию осуществляет тот же фермент, что и транскрипцию; репликаза является либо модифицированной транскриптазой, либо при репликации соответствующим образом модифицируется матрица.

Репликация однонитчатых РНК осуществляется в два этапа: вначале синтезируются комплементарные геному нити, которые в свою очередь становятся матрицами для синтеза копий генома. У «минус-нитевых» вирусов первый этап репликации – образование комплементарных нитей сходен с процессом транскрипции. Однако между ними есть существенное отличие, если при транскрипции считываются определенные участки генома, то при репликации считывается весь геном. Например, иРНК парамиксовирусов и рабдовирусов являются короткими молекулами, комплементарными разным участкам генома, а иРНК вируса гриппа на 20-30 нуклеотидов короче каждого фрагмента генома. В то же время матрицы для репликации являются полной комплементарной последовательностью генома и называются антигеномом. В зараженных клетках существует механизм переключения транскрипции на репликацию. У «минус-нитевых» вирусов этот механизм обусловлен маскировкой точек терминации транскрипции на матрице генома, в результате чего происходит сквозное считывание генома. Точки терминации маскируются одним из вирусных белков.

При репликации растущая «плюс-нить» вытесняет ранее синтезированную «плюс-нить» либо двуспиральная матрица консервируется (рисунок 26). Более распространен первый механизм репликации.

Репликативные комплексы. Поскольку образующиеся нити ДНК и РНК некоторое время остаются связанными с матрицей, в зараженной клетке формируются репликативные комплексы, в которых осуществляется весь процесс репликации (а в ряде случаев также и транскрипции) генома. Репликативный комплекс содержит геном, репликазу и связанные с матрицей вновь синтезированные цепи нуклеиновых кислот. Вновь синтезированные геномные молекулы немедленно ассоциируются с вирусными белками, поэтому в репликативных комплексах обнаруживаются анти-

гены. В процессе репликации возникает частично двунитчатая структура с однонитчатыми «хвостами», так называемый репликативный предшественник (РП).



I – вытеснение ранее синтезированной нити растущей «плюс-нитью»; II – консервирование двухспиральной матрицы; 1, 2, 3 – вновь синтезированные нити РНК.

Рисунок 26 – Два способа репликации «плюс-нитевой» РНК (схема)

Репликативные комплексы ассоциированы с клеточными структурами либо с предсуществующими, либо вирусиндуцируемыми. Например, репликативные комплексы пикорнавирусов ассоциированы с мембранами эндо-плазматической сети, вирусов оспы – с цитоплазматическим матриксом, репликативные комплексы аденовирусов и вирусов герпеса в ядрах находятся в ассоциации со вновь сформированными волокнистыми структурами и связаны с ядерными мембранами. В зараженных клетках может происходить усиленная пролиферация клеточных структур, с которыми связаны репликативные комплексы, или их формирование из предшествующего материала. Например, в клетках, зараженных пикорнавирусами, происходит пролиферация гладких мембран. В клетках, зараженных реовирусами, наблюдается скопление микротрубочек; в клетках, зараженных вирусами оспы, происходит формирование цитоплазматического матрикса.

В репликативных комплексах одновременно с синтезом геномных молекул осуществляется транскрипция и происходит сборка нуклеокапсидов и сердцевин, а при некоторых инфекциях – и вирусных частиц. О сложной структуре репликатив-

ных комплексов говорит, например, такой состав репликативного комплекса аденовирусов: реплицирующиеся ДНК, однонитчатые ДНК, однонитчатые РНК, ферменты репликации и транскрипции, структурные и неструктурные вирусные белки и ряд клеточных белков.

Регуляция репликации. Вновь образованная молекула геномной РНК может быть использована различным образом. Она может ассоциироваться с капсидными белками и войти в состав вириона, служить матрицей для синтеза новых геномных молекул, либо – для образования иРНК, наконец, у «плюс-нитевых» вирусов она может выполнять функции нРНК и связываться с рибосомами. В клетке существуют механизмы, регулирующие использование геномных молекул. Регуляция идет по принципу саморегуляции и реализуется путем взаимодействия вирусных РНК и белков благодаря возможности белокнуклеинового и белок-белкового узнавания. Например, роль терминального белка пикорнавирусов заключается в запрещении трансляции иРНК и отборе молекул для формирования вирионов. Белок, связывающийся с 5'-концом геномной РНК, в свою очередь узнается капсидными белками и служит сигналом для сборки вирусной частицы с участием данной молекулы РНК. По тому же принципу отбираются геномные молекулы РНК у «минус-нитевых» вирусов к 3'-концу геномных РНК присоединяется молекула капсидного вирусного белка к которой подстраиваются другие белковые субъединицы в результате белок-белкового узнавания, и такая молекула РНК войдет в состав вириона или послужит матрицей для репликации. Для переключения ее на транскрипцию должен возникнуть запрет белокнуклеинового взаимодействия. В репликации ДНК аденовирусов участвует молекула белка, которая связывается с концом вирусной ДНК и необходима для начала репликации. Таким образом, для начала репликации необходим синтез вирусных белков: в присутствии ингибиторов белкового синтеза отсутствует переключение транскрипции на репликацию.

4.7 Сборка вирусных частиц

Синтез компонентов вирусных частиц в клетке разобщен и может протекать в разных структурах ядра и цитоплазмы. Вирусы, репликация которых проходит в ядрах, условно называют ядерными. В основном это ДНК-содержащие вирусы: аденовирусы, паповавирусы, парвовирусы, вирусы герпеса. Вирусы, реплицирующиеся в цитоплазме, называют цитоплазматическими. К ним относятся из ДНК-содержащих вирус оспы и большинство РНК-содержащих вирусов, за исключением ортомиксовирусов и ретровирусов. Однако это разделение весьма относительно, потому что в репродукции тех и других вирусов есть стадии, протекающие соответственно в цитоплазме и ядре.

Внутри ядра и цитоплазмы синтез вирусспецифических молекул также может быть разобщен. Так, например, синтез одних белков осуществляется на свободных полисомах, а других – на полисомах, связанных с мембранами. Вирусные нуклеиновые кислоты синтезируются в ассоциации с клеточными структурами вдали от полисом, которые синтезируют вирусные белки. При таком дисьюнктивном способе репродукции образование вирусной частицы возможно лишь в том случае, если вирусные нуклеиновые кислоты и белки обладают способностью при достаточной концентрации узнавать друг друга в многообразии клеточных белков и нуклеиновых кислот и самопроизвольно соединяться друг с другом, т.е. способны к самосборке.

В основе самосборки лежит специфическое белокнуклеиновое и белок-белковое узнавание, которое может происходить в результате гидрофобных, солевых и водородных связей, а также стерического соответствия. Белокнуклеиновое узнавание ограничено небольшим участком молекулы нуклеиновой кислоты и определяется уникальными последовательностями нуклеотидов в не кодирующей части вирусного генома. С этого узнавания участка генома вирусными капсидными белками начинается процесс сборки вирусной частицы. Присоединение остальных белковых молекул осуществляется за счет специфических белок-белковых взаимодействий или неспецифических белокнуклеиновых взаимодействий (рисунок 27).

В связи с разнообразием структуры вирусов животных разнообразны и спосо-

бы формирования вирионов, однако можно сформулировать следующие общие принципы сборки.

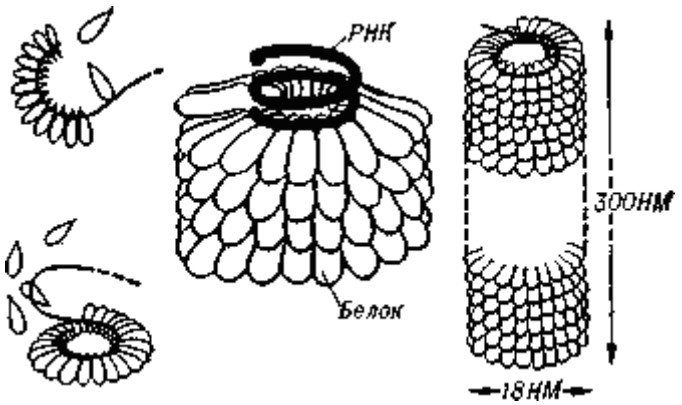


Рисунок 27 – Структура и самосборка частицы вируса табачной мозаики из белковых субъединиц и молекул РНК (Биологический энциклопедический словарь / гл. ред. М. С. Гиляров; редкол.: А. А. Бабаев [и др.]. – 2-е изд., исправл. – М.: Сов. Энциклопедия, 1986)

1 У просто устроенных вирусов формируются провирионы, которые затем в результате модификаций белков превращаются в вирионы. У сложно устроенных вирусов сборка осуществляется многоступенчато. Сначала формируются нуклеокапсиды или сердцевины, с которыми взаимодействуют белки наружных оболочек.

2 Сборка сложно устроенных вирусов (за исключением сборки вирусов оспы и реовирусов) осуществляется на клеточных мембранах. Сборка ядерных вирусов происходит с участием ядерных мембран, сборка цитоплазматических вирусов – с участием мембран эндоплазматической сети или плазматической мембраны, куда независимо друг от друга прибывают все компоненты вирусной частицы.

3 У ряда сложно устроенных вирусов существуют специальные гидрофобные белки, выполняющие функции посредников между сформированными нуклеокапсидами и вирусными оболочками. Такими белками являются матриксные белки у ряда «минус-нитевых» вирусов (ортомиксовирусов, парамиксовирусов, рабдовирусов).

4 Сборка нуклеокапсидов, сердцевин, провирионов и вирионов происходит не во внутриклеточной жидкости, а в специальных структурах, предсуществующих в клетке или индуцированных вирусом («фабриках»).

5 Сложно устроенные вирусы для построения своих частиц используют ряд элементов клетки-хозяина, например липиды, некоторые ферменты, у ДНК-геномного SV40 – гистоны, у оболочечных РНК-геномных вирусов – актин, а в составе ареновирусов обнаружены даже рибосомы. Клеточные молекулы несут определенные функции в вирусной частице, однако включение их в вирион может явиться и следствием случайной контаминации, как, например, включение ряда ферментов клеточных оболочек или клеточных нуклеиновых кислот.

Сборка РНК-содержащих вирусов. Сборка просто устроенных РНК-содержащих вирусов заключается в ассоциации вирусного генома с вирусными капсидными белками с образованием нуклеокапсида.

У сложно устроенных РНК-содержащих вирусов процессы сборки нуклеокапсидов, сердцевин и зрелых вирионов обычно разобщены. Нуклеокапсиды мигрируют к месту сборки вирусных частиц – плазматической мембране (или мембранам эндоплазматической сети) и упорядочение выстраиваются под участками мембран, с наружной стороны которых уже встроены вирусные суперкапсидные белки. Сборка заключается в том, что участки, содержащие гликопротеиды с примыкающими к ним нуклеокапсидами, постепенно выпячиваются через модифицированную клеточную мембрану. В результате выпячивания образуется «почка», содержащая нуклеокапсид и оболочку с суперкапсидными белками. «Почка» отделяется от клеточной мембраны с образованием свободной вирусной частицы. Такой способ формирования вирусных частиц называется почкованием. Почкование может происходить – через плазматическую мембрану клетки в наружную среду, как у ортомиксовирусов, парамиксовирусов, рабдовирусов и альфа-вирусов, либо через мембраны эндоплазматической сети в вакуоли, как у аренавирусов и буньявирусов, В основе выпячивания почки через мембрану лежат обычные клеточные процессы, направленные на отторжение непригодного для клетки материала в обновление мембран. Участок будущей почки содержит фиксированный нуклеокапсид, ассоциированный с суперкапсидными белками, но движение мембранных липидов продолжается в силу их текучести, липиды обволакивают будущую почку и вместе с ними из «почки» вытесняются клеточные мембранные белки. В результате этого движения происходит

выбухание «почки» над клеточной мембраной. Механизм образования «почки» объясняет, почему в составе почкующихся вирусов не содержится клеточных мембранных белков.

Все вирусные компоненты – нуклеокапсиды и суперкапсидные белки прибывают к месту сборки независимо друг от друга. Первыми к месту сборки прибывают суперкапсидные белки. Обычно этими белками являются гликопротеиды, которые синтезируются в полисомах, связанных с мембранами, и через шероховатые, а затем гладкие мембраны в результате слияния с ними везикул комплекса Гольджи транспортируются на наружную поверхность плазматических мембран или остаются в составе везикул.

Включение гликопротеидов в определенные зоны клеточных мембран приводит к модификациям мембран. Нуклеокапсид узнает эти участки и подходит к ним с внутренней стороны липидного бислоя. Узнавание осуществляется с помощью одного из двух механизмов: 1) нуклеокапсид взаимодействует с участком гликопротеида, пронизывающим клеточную мембрану и вышедшим на ее внутреннюю поверхность. Такой механизм имеет место у альфа-вирусов; гидрофобный фрагмент гликопротеида Е1 проникает через липидный слой на его внутреннюю поверхность, и с этим фрагментом связываются нуклеокапсиды, которые позже войдут в состав «почки»; 2) в сборку вовлекается еще один вирусный белок, являющийся медиатором сборки, который называется мембранным, или матриксным белком. М-белок синтезируется на свободных полисомах, но сразу после синтеза встраивается в клеточные мембраны с внутренней цитоплазматической стороны липидного бислоя. Этот белок в высокой степени гидрофобен и поэтому способен к белок-белковым и белоклипидным взаимодействиям.

Включение М-белка в клеточные мембраны является сигналом для сборки вирусной частицы: вслед за включением немедленно следует связывание нуклеокапсидов с мембранами и почкование вирусной частицы. Тем самым М-белок обладает функцией лимитирующего сборку фактора.

Сборка ДНК-содержащих вирусов, В сборке ДНК-содержащих вирусов есть некоторые отличия от сборки РНК-содержащих вирусов. Как и у РНК-содержащих

вирусов, сборка ДНК-содержащих вирусов является многоступенчатым процессом с образованием промежуточных форм, отличающихся от зрелых вирионов по составу полипептидов. Первый этап сборки заключается в ассоциации ДНК с внутренними белками и формировании сердцевин или нуклеокапсидов. При этом ДНК соединяется с предварительно сформированными «пустыми» капсидами.

В результате связывания ДНК с капсидами появляется новый класс промежуточных форм, которые называются неполными формами. Помимо неполных форм с разным содержанием ДНК, существует другая промежуточная форма в морфогенезе – незрелые вирионы, отличающиеся от зрелых тем, что содержат не нарезанные предшественники полипептидов. Таким образом, морфогенез вирусов тесно связан с модификацией (процессингом) белков.

Сборка ядерных вирусов начинается в ядре, обычно – с ассоциации с ядерной мембраной. Формирующиеся в ядре промежуточные формы вируса герпеса почкуются в перинуклеарное пространство через внутреннюю ядерную мембрану, и вирус приобретает таким путем оболочку, которая является дериватом ядерной мембраны. Дальнейшая достройка и созревание вирионов происходит в мембранах эндоплазматической сети и в аппарате Гольджи, откуда вирус в составе цитоплазматических везикул транспортируется на клеточную поверхность.

У не почкующихся липидсодержащих вирусов – вирусов оспы сборка вирионов происходит в уже описанных цитоплазматических вирусных «фабриках». Липидная оболочка вирусов в «фабриках» формируется из клеточных липидов путем автономной самосборки, поэтому липидный состав оболочек значительно отличается от состава липидов в клеточных мембранах.

4.8 Выход вирусных частиц из клетки

Существуют два способа выхода вирусного потомства из клетки: 1) путем «взрыва»; 2) путем почкования.

Выход из клетки путем взрыва связан с деструкцией клетки, нарушением ее целостности, в результате чего находящиеся внутри клетки зрелые вирусные части-

цы оказываются в окружающей среде. Такой способ выхода из клетки присущ вирусам, не содержащим липопротеидной оболочки (пикорна-, рео-, парво-, папова-, аденовирусы). Однако некоторые из этих вирусов могут транспортироваться на клеточную поверхность до гибели клетки.

Выход из клеток путем почкования присущ вирусам, содержащим липопротеидную мембрану, которая является дериватом клеточных мембран. При этом способе клетка может длительное время сохранять жизнеспособность и продуцировать вирусное потомство, пока не произойдет полное истощение ее ресурсов.

5 Основные процессы, контролирующие наследственность и изменчивость вирусов

Вирусам, как и всем живым организмам, свойственны наследственность и изменчивость. Так же как и у прочих форм жизни нуклеиновые кислоты вирусов подвержены мутациям.

Модификации. Модификациями называются не наследуемые (фенотипические) изменения у вирусов, обусловленные клеткой-хозяином. Эти изменения лежат в основе адаптации вируса к новому хозяину и преодоления зависимого от хозяина ограничения. Модификации нуклеиновых кислот вирусов осуществляют клеточные ферменты, ответственные за ограничение (рестрикцию) репродукции вируса.

Мутации. В основе изменчивости вирусов лежат мутации, т.е. изменения состава и последовательностей нуклеотидов вирусного генома. Мутации происходят у всех вирусов, независимо от того, является ли их генетическим аппаратом ДНК или РНК. В результате мутаций отдельные вирионы могут приобретать новые свойства. Дальнейшая судьба таких вирусов зависит от естественного отбора, сохраняющего популяцию, наиболее приспособленную к условиям существования.

Мутации могут иметь разные последствия. В одних случаях они ведут к изменению фенотипических проявлений в нормальных условиях. Например, увеличивается или уменьшается размер бляшек под агаровым покрытием; увеличивается или

ослабляется нейровирулентность для определенного вида животных; вирус становится более чувствительным к действию химиотерапевтического агента и т.п.

В других случаях мутация является летальной, так как вследствие ее нарушается синтез или функция жизненно важного вирусспецифического белка, например вирусной полимеразы.

В некоторых случаях мутации являются условно летальными, так как вирусспецифический белок сохраняет свои функции в определенных, оптимальных для него, условиях и теряет эту способность в неразрешающих (непермиссивных) условиях. Типичным примером таких мутаций являются температурно-чувствительные (temperature sensitive) – ts-мутации, при которых вирус теряет способность размножения при повышенных температурах (от 39 °С до 42 °С), сохраняя эту способность при обычных температурах выращивания (от 36°С до 37 °С).

По своему механизму мутации могут быть тоже разными. В одних случаях происходит деления, т.е. выпадение одного или нескольких нуклеотидов, в других случаях происходит встраивание одного или нескольких нуклеотидов, а в некоторых случаях – замена одного нуклеотида другим.

Мутации могут быть прямыми и обратными. Прямые мутации меняют фенотип, а обратные мутации – реверсии – его восстанавливают. Возможны истинные реверсии, когда обратная мутация происходит в месте первичного повреждения, и псевдореверсии, если мутация происходит в другом участке дефектного гена (интрагенная супрессия) или в другом гене (экстрагенная супрессия). Реверсия не является редким событием, так как ревертанты обычно более приспособлены к данной клеточной системе. Поэтому при получении мутантов с заданными свойствами, на пример вакцинных штаммов, приходится считаться с возможной их реверсией к дикому типу.

Мутации носят случайный характер и объясняются статистическими законами.

В качестве физических мутагенов наиболее часто применяется ультрафиолетовое облучение, так как его энергия сопоставима с энергией химических связей.

Реже применяются более жесткие виды облучения – рентгеновское и γ-облучение, а также обработка вирусных суспензий нейтронами, протонами, электронами и ядрами гелия, так как они вызывают сильные разрушения вирусных геномов и их инактивацию.

В качестве химических мутагенов применяют аналоги оснований (бромурацил, бромдезоксиуридин, 2-аминопурин, нитрозогуанидин и пр.), алкилирующие и флуоресцирующие соединения (профлавин), интеркалирующие агенты (актиномицин, этидий бромид), азотистую кислоту, гидроксиламин и многие другие.

5.1 Генетические и негенетические взаимодействия между вирусами

Как в естественных, так и в экспериментальных условиях одна клетка может быть заражена не одним, а несколькими вирусами. В процессе такой смешанной инфекции могут иметь место различные формы взаимодействия как между вирусными геномами, так и между продуктами генов. При взаимодействии геномов могут наблюдаться такие формы генетических взаимодействий, как множественная реактивация, рекомбинация, пересортировка генов, кросс-реактивация, гетерозиготкость. При взаимодействии на уровне продуктов генов могут иметь место негенетические взаимодействия: комплементация, интерференция, фенотипическое смешивание и др.

Множественная реактивация. Вирусная инфекция может возникнуть при заражении клетки несколькими вирионами с поврежденными геномами вследствие того, что функцию поврежденного гена может выполнять вирус, у которого этот ген не поврежден. Этот феномен был вначале обнаружен на бактериофагах и получил название множественной реактивации. В основе множественной реактивации лежит кооперативный процесс, при котором вирионы с поражением разных генов дополняют друг друга путем генетической рекомбинации, в результате чего репродуцируется исходный неповрежденный вирус.

Эффективность множественности реактивации зависит от многих причин: степени повреждения генома вирионов, числа проникших в клетку вирионов, кон-

центраций их в определенных участках клетки, аутоинтерференции поврежденных вирионов. Для множественной реактивации важное значение имеет расстояние между вирионами с поврежденными геномами внутри клетки. Обработка вирионов двухвалентными ионами металлов, ведущая к их агрегации, усиливает множественную реактивацию.

Рекомбинация. Генетической рекомбинацией называют обмен генетическим материалом, происходящий между родительскими вирусами. Возможен обмен полными генами (межгенная рекомбинация), так и участками одного и того же гена (внутригенная рекомбинация). Образующийся вирус-рекомбинант обладает свойствами, унаследованными от разных родителей.

Обычно рекомбинируемые штаммы обладают характерными признаками, которые обозначаются как маркеры. Например, были получены рекомбинанты между вирусами полиомиелита, обладающие повышенной устойчивостью и повышенной чувствительностью к гуанидину, разной ней-ровирулентностью, разной устойчивостью к повышенной температуре, разной чувствительностью к ингибиторам сывороток лошадей и коров и т.п. Для получения рекомбинантов используют штаммы, содержащие два или большее число маркеров.

Тест рекомбинации применяют для генетических исследований вирусов. С его помощью возможно построение генетических карт вирусов, в которых определяется, в каких участках генома произошли мутации, а также в условных единицах измеряется расстояние между разными мутациями.

Пересортировка генов. Вариантом рекомбинации является феномен, получивший название пересортировки генов. Она наблюдается при генетических взаимодействиях между вирусами, имеющими сегментированный геном. Образующиеся при этом гибридные формы вирусов называют реассортантами. Реассортанты вирусов гриппа получают при совместном культивировании вирусов с разными генами гемагглютинина и нейраминидазы. В этом случае из общего потомства путем нейтрализации соответствующих антигенов можно выделить интересующие исследователя варианты.

Существуют определенные группировки (констелляции или созвездия) генов,

которые в данной системе клеток более стойки и делают вирус более жизнеспособным.

Сходные процессы пересортировки генов имеют место у вирусов гриппа типов А, В и С и у других вирусов с фрагментарным геном – у буньявирусов, аренавирусов (однонитчатые РНК) и реовйрусов (ротавирусов) (двунит-чатая РНК), Однако эти процессы не столь интенсивны и доступны изучению, как у вирусов гриппа.

Перекрестная реактивация. Перекрестная реактивация, кросс-реактивация или реактивация при скрещивании, происходит в том случае, когда у одного из штаммов вируса часть генома повреждена, а другой геном интактен. При смешанной инфекции двумя такими вирусами возможна рекомбинация неповрежденных участков генома инактивированного вируса с геномом интактного вируса, и в результате этого процесса появляются штаммы вируса со свойствами обоих родителей. Описываемый феномен также обозначается как «спасение маркера», поскольку реактивируется (рекомбинирует) лишь часть генома инактивированного вируса, несущая какой-нибудь признак (маркер).

Гетерозиготность. При совместном культивировании двух штаммов вируса может происходить формирование вирионов, содержащих в своем составе два разных генома или по крайней мере один полный геном и часть второго генома. Это явление названо гетерозиготностью.

Комплементация. Комплементация (дополнение) является таким видом негенетического взаимодействия при смешанной инфекции двумя вирусами, которое стимулирует репродукцию обоих партнеров или одного из них, но не изменяет генотипы вирусов. Принцип комплементации заключается в том, что вирус снабжает партнера недостающими компонентами, обычно белками, структурными или неструктурными.

Комплементация может быть односторонней и двусторонней. Двусторонняя комплементация заключается в репродукции обоих партнеров, каждый из которых не способен к самостоятельной репродукции. При односторонней комплементации один из партнеров обеспечивает другого необходимыми для его репродукции продуктами. Вирус, стимулирующий репродукцию другого вируса, называется «вирус-

помощник», а вирус, репродуцирующийся только в присутствии помощника, называется «вирус-сателлит».

Комплементация широко распространена среди вирусов и встречается как между родственными, так и неродственными вирусами. Феномен тесно связан с проблемой дефектности вирусов.

Поскольку в вирусной популяции помимо стандартных обычно присутствуют дефектные неинфекционные вирусные особи, в частности дефектные частицы, утратившие часть генетического материала, комплементация имеет место в инфекционном цикле многих вирусов и заключается в том, что члены популяции снабжают друг друга продуктами генов, которые дефектны у партнеров (негенетическая реактивация). Отличие комплементации от генетической рекомбинации заключается в отсутствии обмена генетическим материалом.

Комплементация встречается и у неродственных вирусов, принадлежащих к разным семействам. Одним из семейств, вирусы которого наиболее часто участвуют в комплементации, является семейство аденовирусов. В одних системах аденовирусы могут действовать как дефектные вирусы, в других – как помощники. Например, в культуре клеток почек макак резусов аденовирусы могут репродуцироваться только в присутствии SV40, который является в данном случае вирусом-помощником. В других системах сами аденовирусы действуют как вирусы-помощники, а вирусом-сателлитом является аденоассоциированный вирус, относящийся к семейству парвовирусов. Репродукция этого вируса полностью зависит от комплементирующего действия аденовирусов. Вирус гепатита В является помощником для дельта-агента, который покрывается его наружным белком – HBs-антигеном. Сочетание обоих вирусов обнаружено при наиболее тяжелых формах гепатита.

Возможна не только межцистронная, но и внутрицистронная комплементация в том случае, когда один ген кодирует несколько белков.

Фенотипическое смешивание. При совместном культивировании двух вирусов может наблюдаться феномен фенотипического смешивания, когда геном одного вируса бывает заключен в капсид, состоящий частично или полностью из белков другого вируса.

Фенотипическое смешивание наблюдается при смешанной инфекции многими вирусами, причем эти вирусы могут быть как близкими друг другу (например, вирусы гриппа А и В или разные серологические подтипы вируса гриппа А), так и весьма далекими (онковирусы и рабдовирусы).

6 Классификация и патогенез вирусных инфекций

Под инфекцией понимают комплекс процессов, происходящих при взаимодействии инфекционного агента с организмом хозяина. Однако в связи с тем, что вирусы являются внутриклеточными паразитами, а точнее, генетическими паразитами, в основе их взаимодействия с организмом всегда лежит инфекционный процесс на уровне клетки, который реализуется путем взаимодействия вирусного и клеточного геномов. Поэтому возможно классифицировать инфекции как на клеточном уровне, так и на уровне организма.

6.1 Кассификация вирусных инфекций на клеточном уровне

Автономные и интеграционные инфекции. Если вирусный геном реплицируется независимо от клеточного генома, такая инфекция называется автономной. Понятие автономии относительно, оно ограничивается лишь отсутствием физической связи между вирусным и клеточным геномами, хотя взаимодействие их постоянно происходит в течение инфекции. Автономная форма вирусной инфекции характерна для большинства вирусов животных.

Если вирусный геном включается в состав клеточного генома, или, как принято называть этот процесс, интегрирует с клеточным геномом и реплицируется вместе с ним, такая инфекция называется интеграционной. Интеграционная инфекция возникает в результате физического объединения генома вируса и клетки. При этой форме инфекции вирусный геном реплицируется и функционирует как составная часть клеточного генома. Интегрировать могут как полный геном, так и часть генома. При гепатите В возможна интеграция полного генома, при аденовирусных и

герпесвирусных инфекциях обычно интегрирует часть генома, при инфекции онковирусами может интегрировать как полный геном, так и часть его. Вирусные последовательности в составе клеточного генома называются провирусом, или провирусной ДНК.

При интеграционных инфекциях нет ни сборки вирусной частицы, ни выхода вируса из клетки. Клетка может сохранить нормальные функции и при ее делении вирусные последовательности могут переходить в геном дочерних клеток. Такая ситуация наблюдается в случае инфекции, вызванной онкогенными вирусами. Интеграция может привести к неопластической трансформация клетки. Трансформированная клетка приобретает способность к неограниченному делению в результате нарушения регуляторных механизмов, контролирующих деление. Интеграционный тип инфекции возможен для нескольких семейств ДНК-содержащих вирусов: аденовирусов, паповавирусов, вирусов герпеса, а также для вируса гепатита В и обязателен для одного семейства РНК-содержащих вирусов – ретровирусов. В соответствии с данными В. М. Жданова, интеграционная форма инфекции может возникнуть при заражении и другими РНК-содержащими вирусами, такими, как вирус клещевого энцефалита (семейство тогавирусов), вирусы кори и SV5 (семейство парамиксовирусов) и др. Обязательным условием в этом случае является присутствие в клетках фермента – обратной транскриптазы, необходимого для процесса интеграции. Возникающая интеграционная инфекция может явиться причиной ряда хронических и аутоиммунных заболеваний.

Механизм интеграции вирусного генома с клеточным геномом. Из многих моделей, объясняющих процесс интеграции, наиболее признанной является модель Кемпбелла. В соответствии с этой моделью для интеграции с клеточным геномом необходима кольцевая форма двунитчатой вирусной ДНК. Эта молекула ДНК прикрепляется к клеточной ДНК, в месте прикрепления обе молекулы разрезаются и образовавшиеся концы сшиваются таким образом, что вирусная ДНК становится частью клеточного генома. Существенную роль в интеграции играют длинные концевые повторы двунитчатой ДНК, которые определяют специфичность интеграции в результате узнавания ими определенных участков клеточного генома. ДНК папова-

вирусов является циркулярной и двунитчатой и полностью отвечает требованиям модели Кемпбелла.

Продуктивная и абортивная инфекции. Инфекция может быть продуктивной и абортивной. Продуктивная инфекция завершается образованием инфекционного потомства. Абортивной называется инфекция, которая незавершается образованием инфекционных вирусных частиц, или они образуются в гораздо меньшем количестве, чем при продуктивной инфекции. Абортивная инфекция может возникнуть при следующих трех обстоятельствах:

1) заражение чувствительных клеток дефектным вирусом;

2) заражение чувствительных клеток в неразрешающих условиях;

3) заражение нечувствительных клеток стандартным вирусом.

Заражение чувствительных клеток дефектным вирусом. Дефектным называется такой вирус, который не способен проявить все генетические функции, необходимые для образования инфекционного потомства.

Существуют дефектные вирусы и дефектные вирусные частицы. Дефектными называются такие вирусы, которые репродуцируются лишь в присутствии вируса-помощника, например аденоассоциированный вирус (семейство парвовирусов), дающий потомство только в присутствии аденовируса-помощника. Дефектные вирусные частицы накапливаются в популяции многих вирусов, особенно при пассировании их с высокой множественностью инфекции. Дефектные частицы интерферируют при репродукции вируса с инфекционными вирусными частицами и потому называются дефектными интерферирующими частицами (ДИ-частицами). Этот тип вирусных частиц наиболее хорошо изучен на модели вирусов везикулярного стоматита и гриппа. Получение дефектных частиц вируса гриппа при заражении куриных эмбрионов с высокой множественностью инфекции получило название феномена фон Магнуса по имени исследователя, впервые его описавшего. Дефектные вирусные частицы вызывают абортивную инфекцию в связи с тем, что они лишены части генетического материала. Например, дефектные частицы вируса гриппа содержат неполные последовательности Р-генов, кодирующих три высокомолекулярных вирусных белка.

Заражение чувствительных клеток в неразрешающих условиях. Абортивная инфекция может возникать при изменении условий, в которых происходит инфекционный процесс. Эти условия возникают в организме и могут моделироваться в эксперименте; в организме – повышение температуры, изменение pH в очаге воспаления и концентрации ионов, наличие антиме-таболитов, ингибиторов и т.д.; в эксперименте – изменение температуры инкубации, состава питательной среды, внесение антиметаболитов и ингибиторов и т.д. В результате клетка либо погибнет без продукции инфекционного вируса, либо инфекция прерывается на определенном этапе. При устранении неразрешающих условий абортивная инфекция превращается в продуктивную. Смена абортивной инфекции на продуктивную может осуществиться и с помощью вируса-помощника.

Заражение нечувствительных клеток стандартным вирусом приводит к наиболее распространенной форме абортивной инфекции.

Непермиссивность клетки к определенному вирусному агенту может проявиться на любом этапе инфекции. Чувствительность клетки к ряду вирусов определяется наличием на клеточной поверхности специфических рецепторов, обусловливающих адсорбцию и проникновение вируса в клетку. Такой генетически обусловленный механизм клеточной резистентности наиболее четко установлен для пикорнавирусов, а также онковирусов птиц. Для большинства вирусов можно подобрать две клеточные системы, в одной из которых будет развиваться продуктивная, а в другой – абортивная инфекция. Механизм генетически обусловленной резистентности клеток к вирусам широко варьирует, но в основе его лежит либо отсутствие клеточных факторов, необходимых для репродукции вируса, либо наличие факторов, нарушающих процесс репродукции.

У сложно устроенных вирусов клеточная непермиссивность часто проявляется на стадии сборки вирусных частиц; нарушение сборки в некоторых непермиссивных системах для вирусов гриппа и парамиксовирусов обусловлено уменьшением количества молекул матриксного белка вируса.

Острая и хроническая инфекция. Как продуктивная, так и абортивная инфекция может протекать в виде острой или хронической инфекции.

Острой называется такая форма инфекции, при которой после образования вирусного потомства клетка либо погибает, либо выздоравливает и не содержит вирусных компонентов.

Хроническая инфекция – это такая форма инфекции, при которой клетка продолжает продуцировать вирусные частицы или вирусные компоненты в течение длительного времени и передает эту способность дочерним клеткам.

Чаще хроническую форму приобретает абортивная инфекция, так как вирусный генетический материал обычно не входит в состав вирусного потомства, а накапливается в клетках и передается в дочерние клетки. Одним из факторов, вызывающих хроническую инфекцию, являются ДИ-частицы. Такие частицы, попадая в клетки вместе с инфекционными вирусными частицами, конкурируют с ними за факторы репродукции и препятствуют образованию инфекционного потомства. В результате гибель клеток предотвращается. При появлении в системе новых чувствительных клеток в них вновь возникает продуктивная инфекция с образованием ДИ-частиц, и такой цикл инфекции возобновляется снова и снова.

Цитолитическая н нецитолитическая инфекции. Острая инфекция на клеточном уровне может быть цитолитической и нецитолитической в зависимости от судьбы зараженной клетки. Инфекция, завершающаяся гибелью (лизисом) клетки называется цитолитической. Инфекция, которая непосредственно не приводит к лизису клетки, и клетка еще может функционировать в течение некоторого периода времени, продуцируя вирусные частицы, называется нецитолитической.

Смешанная инфекция. В естественных условиях распространен феномен смешанной инфекции, при котором клетка заражается двумя или несколькими разными вирусами. Два и больше инфекционных процесса, происходящих одновременно в одной клетке, могут оказывать различное влияние друг на друга. Возможны несколько вариантов взаимодействия вирусов в процессе смешанной инфекции.

1 Один из вирусов подавляет репродукцию второго вируса, или подавляется репродукция обоих вирусов. Этот феномен называется интерференцией вирусов.

2 Вирус усиливает репродукцию второго вируса в результате комплементации или экзальтации. Комплементация может происходить между двумя родственными

или неродственными вирусами, например, между аденовирусом и аденоассоциированным вирусом человека или SV40, при этом вирус-помощник предоставляет другому вирусу неструктурный белок. Экзальтация может быть связана с подавлением процесса образования интерферона первым вирусом.

3 Оба вируса не оказывают существенного влияния на процесс репродукции каждого из них, однако может происходить нарушение морфогенеза обоих вирусов.

Смешанная инфекция широко используется вирусологами для изучения генетических функций вирусов и дефектности геномов.

6.2 Цитопатология зараженной вирусом клетки

Патологические изменения зараженных вирусами клеток обусловлены специфическими и не специфически ми процессами. К неспецифическим процессам относятся процессы, обусловленные изменением проницаемости плазматической мембраны, маргинация хроматина, хромосомные аберрации, пикноз ядер, вакуолизация цитоплазмы. Последнее свойство может приобретать настолько своеобразный и выраженный характер, что превращается в специфический признак некоторых вирусных инфекций. Так, один из вирусов, вызывающий такой процесс, SV40 – получил название «вакуолизирующий вирус». Специфическими изменениями являются, например, вирусные включения, образование симпластов. Специфические и неспецифические процессы могут привести к деструкции клетки.

Цитопатический эффект и его причины. Деструкцию клетки, возникающую при цитолитической инфекции, называют цитопатическим эффектом, а вирус, вызывающий этот эффект, называют цитопатогенным. Большинство вирусов животных являются цитопатогенными, и это свойство лежит в основе патогенеза ряда вирусных инфекций. Цитопатический эффект широко используется в лабораторной диагностике вирусных инфекций для индикации вируса в культуре клеток и выявления антител в сыворотках переболевших.

Цитопатический эффект является следствием нескольких причин:

1) нарушение нормальной жизнедеятельности клетки в результате механиче-

ского повреждающего действия вирусных компонентов на клеточные структуры;

2) повреждение лизосом, в результате чего освобождаются высокоактивные лизосомальные ферменты, вызывающие аутолиз клетки;

3) интенсивное истощение белковых и энергетических ресурсов клетки за счет переключения клеточных ферментов и белок-синтезирующего аппарата на синтез вирусспецифических макромолекул;

4) специфическое повреждающее действие вирусов на клеточные молекулы.

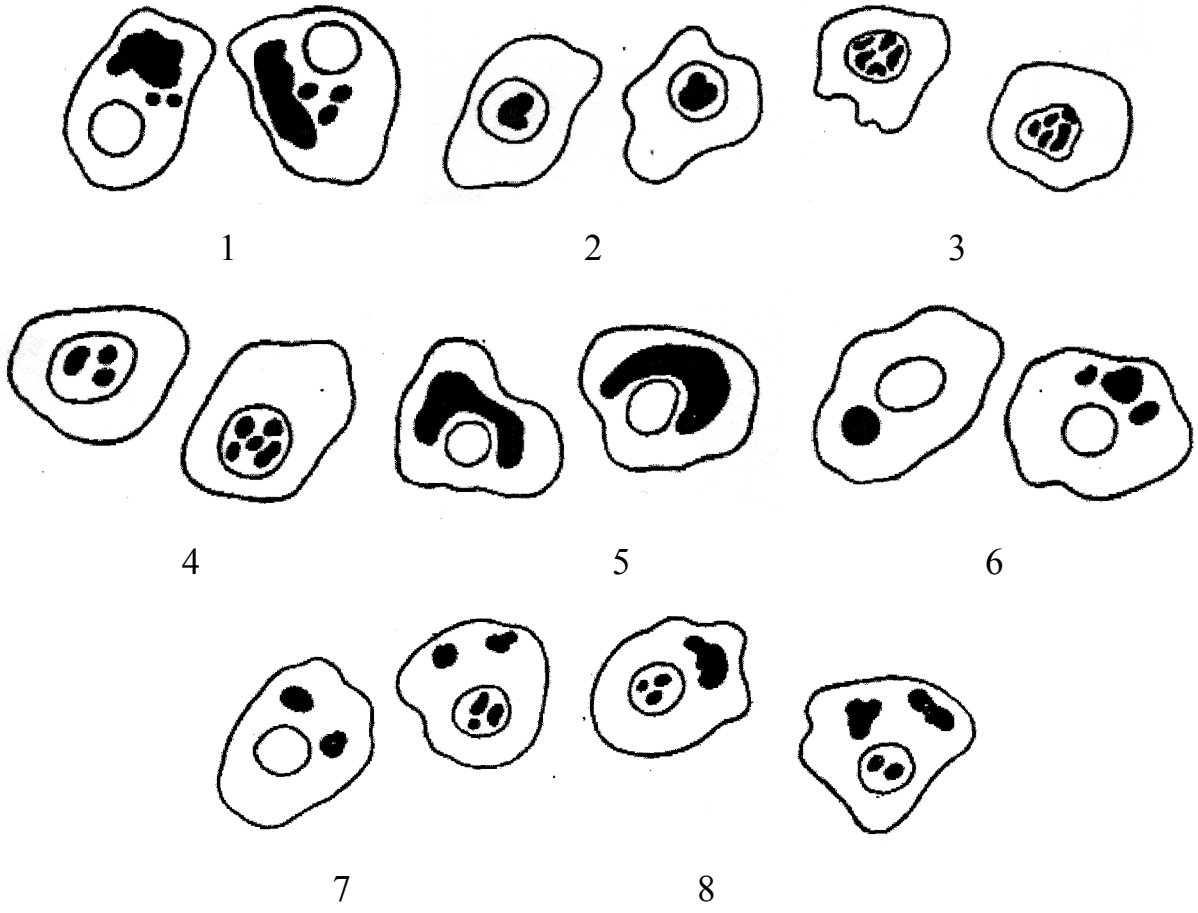
Эти причины повреждения клетки различным образом проявляются и сочетаются при разных вирусных инфекциях.

Среди РНК-содержащих цитопатогенных вирусов пикорнавирусы оказывают наиболее быстрое и глубокое действие на синтез клеточных белков. Причиной выключения белкового синтеза является блокирование узнавания рибосомой «шапочки» клеточных иРНК. Поскольку РНК вируса полиомиелита транслируется по механизму, независимому от «шапочки», происходит селективное подавление трансляции клеточных иРНК.

Вирусные включения. Вирусные включения, выявляющиеся при окрашивании зараженных клеток, являются специфическими морфологическими признаками вирусной инфекции, часто имеющими диагностическое значение. Внутриклеточные вирусные включения были обнаружены гистологами еще в прошлом столетии. Д.И. Ивановский обнаружил в клетках растения, зараженного вирусом табачной мозаики, кристаллоподобное включение, которое впоследствии получило название «кристаллы Ивановского». Позже было доказано, что «кристаллы Ивановского» представляют собой скопление вирусов табачной мозаики.

Вирусные включения выявляются в ядре или цитоплазме зараженной клетки. В зависимости от прокрашивания разными красителями включения бывают барофильными и ацидофильными (эозинофильными). Включения при разных вирусных инфекциях различаются по величине, форме, численности. Они могут быть одиночными и множественными, крупными и мелкими, округлыми или неправильной формы (рисунок 28). Характерные ядерные включения формируются в клетках, зараженных вирусами герпеса, полиомы, аденовирусами, флавивирусами, вирусом ящу-

ра. Характерные цитоплазматические включения формируются в клетках, зараженных вирусами оспы, гриппа, бешенства.



1 — клетки, зараженные вирусом оспы; 2 — клетке, зараженные вирусом герпеса (тельца Каудри); 3 — клетки зараженные аденовирусом; 4 — клетки, зараженные паповавирусом SV40; 5 — клетки, зараженное реовирусом; 6 — клетки, зараженные вирусом бешенства (тельца Негри); 7 — клетки, зараженные вирусом гриппа; 8 — клетки, зараженные вирусом кори; цитоплазматические и внутриядерные включения обозначены черном цветом.

Рисунок 28 – Типы вирусных включений (схема)

Природа включений разнообразна. Большей частью включения представляют собой «вирусные фабрики», т.е. очаги, в которых идет транскрипция и репликация вирусных геномов и сборка вирусных частиц. В клетках, зараженных реовирусом, образуются причудливые серповидные околоядерные включения; при электронно-микроскопическом исследовании они оказались ввязанными с нитями митотическо-

го веретена, в ассоциации с которыми идет репродукция этого вируса. Включения могут представлять собой скопление вирусных частиц, как, например, внутриядерные включения в клетках, зараженных аденовирусами и вирусом полиомы, либо скопление молекул вирусных белков, например ядерные и цитоплазматические включения в клетках, зараженных вирусом гриппа, представляющие собой скопление молекул неструктурного вирусного белка. Некоторые включений содержат только клеточный материал, например, ядерные ацидофильные включения в клетках, зараженных вирусами герпеса на поздней стадии инфекции.

Симпласты. Некоторые вирусы вызывают характерный цитопатический эффект, проявляющийся в слиянии клеток и образовании многоядерных клеток, называемых симпластами или синтицием. Образование симпластов обусловлено действием на клеточные мембраны прилежащих друг к другу клеток вирусных белков слияния и определяется тем же механизмом, который обеспечивает слияние вирусной и клеточной мембраны и проникновение вирусов в клетку. Слияние может происходить как за счет белков родительского вируса при заражении клеток большими концентрациями вируса (слияние снаружи), так и за счет внутриклеточного накопления вновь синтезированных вирусных белков слияния (слияние изнутри). Образование симпластов вызывают многие вирусы: парамиксовирусы, некоторые ретровирусы, вирусы герпеса. В определенных условиях (при низких значениях pH) слияние вызывают вирусы гриппа, буньявирусы и др.

Особенности вирусной инфекции в клеточной популяции. Основной особенностью вирусной инфекции в клеточной популяции является гетерогенность системы в связи с гетерогенностью вирусных частиц и клеток, входящих в состав популяции. В любом вирусном препарате наряду с инфекционными вирионами находятся ДИ-частицы. Клетки в каждой клеточной популяции широко варьируют по чувствительности к вирусу, и инфекция может протекать не так, как на клеточном уровне. Например, при первом заражении вирусом, вызывающим в клетках продуктивную инфекцию, чувствительные клетки популяции могут погибнуть, и в популяции за счет некоторого количества нечувствительных клеток может установиться хроническая инфекция.

6.3 Классификация вирусных инфекций на уровне организма

В основу классификации положены четыре фактора:

1) генерализация вируса;

2) продолжительность инфекции;

3) проявление клинических симптомов;

4) выделение вируса в окружающую среду.

Основанная на этих признаках классификация инфекций, как и любая другая, в известной мере условна, поскольку одна форма может перейти в другую, например, очаговая инфекция – в генерализованную, острая инфекция – в хроническую, латентная – в хроническую и т.д.

Очаговая и генерализованная инфекции. Вирусные инфекция можно разделить на две большие группы:

1) очаговые, когда действие вируса проявляется у входных ворот инфекции в связи с его локальной репродукцией;

2) генерализованные, при которых после ограниченного периода репродукции вируса в первичных очагах происходит генерализация инфекции, и вирус достигает чувствительных тканей, формируя вторичные очаги инфекции.

Очаговые инфекции имеют более короткий инкубационный период, чем генерализованные, защитными факторами организма при этих инфекциях являются скорее секреторные антитела класса IgA, чем антитела гуморальные, а эффективными вакцинами – те, которые стимулируют образование секреторных антител. При генерализованных инфекциях большее значение в защите организма имеют гуморальные антитела. Примером очаговых инфекций являются респираторные и кишечные вирусные инфекции, примером генерализованных – оспа, корь, полиомиелит. Сравнительная характеристика очаговых и генерализованных инфекций представлена в таблице 3. Примером генерализованной инфекции является корь, а очаговой – заболевания, вызываемые респираторно-синцитиальным вирусом, и другие острые респираторные вирусные инфекции.

Острая и персистентная инфекции. Острая инфекция длится относительно

непродолжительный период времени и протекает с выделением вирусов в окружающую среду. Окончание инфекции сопровождается элиминацией вирусов благодаря иммунным механизмам. Инфекция может протекать как в клинической, так и в инаппарантной форме. Острая инфекция может завершиться выздоровлением или гибелью организма. Она соответствует продуктивной инфекции на уровне клетки. При продолжительном взаимодействии вируса с организмом возникает персистентная форма инфекции (от лат. persistentia – упорство, постоянство).

Таблица 3 – Сравнительная характеристика очаговых и генерализованных вирусных инфекций

Свойства инфекции	Очаговые инфекции	Генерализованные инфекции
Место патологического процесса	Входные ворота	Системы тканей и органов
Инкубационный период	Относительно короткий	Относительно длинный
Наличие вирусемии	Редко	Обычно
Продолжителыюстъ иммунитета	Кратковременный или неизученный	Обычно длительный
Иммунные механизмы	Секреторные антитела (IgA), локальный клеточный иммунитет	Гуморальные антитела (lgG, IgM), системный клеточный иммунитет

Один и тот же вирус может вызвать как острую, так и персистентную инфекцию в зависимости от состояния организма и в первую очередь его иммунной системы. Например, вирус кори может вызвать как острую инфекцию, так и медленную (длительно текущую) – подострый склерозирующий панэнцефалит. Вирусы герпеса, гепатита В и аденовирусы могут вызвать острую и персистентную инфекции и т.д.

Персистентные инфекции могут быть латентными, хроническими или медленными в зависимости от выделения вируса в среду и проявления симптомов заболевания.

Латентная инфекция – это скрытая инфекция, не сопровождающаяся выделением вирусов в окружающую среду. При латентных инфекциях вирус не всегда удается обнаружить либо в связи с его дефектным состоянием, либо в связи с персистенцией субвирусных компонентов, либо в связи с интеграцией клеточным гено-

мом. При воздействии ряда активирующих инфекцию факторов может произойти активация вируса, и латентная инфекция может перейти в острую или хроническую. Латентные инфекции могут вызывать аденовирусы, вирусы герпеса, онкогенные вирусы, вирус СПИД и др.

Хронической инфекцией называется длительно текущий патологический процесс, характеризующийся периодами ремиссий, перемежающимися с периодами обострения, когда вирус выделяется в окружающую среду. Примерами хронической инфекции являются герпетическая, аденовирусная инфекции, хроническая форма вирусных гепатитов и т. д.

Медленные инфекции – это своеобразное взаимодействие определенных вирусов с организмом, характеризующееся длительным инкубационным периодом, тянущимся многие месяцы и даже годы, и последующим медленным, но неуклонным развитием симптомов заболевания, ведущим к тяжелому нарушению функций органов и летальному исходу.

К медленным инфекциям относятся медленно прогрессирующие заболевания, в частности, заболевания ЦНС со спонгиоформными энцефалопатиями у человека – куру, болезнь Крейтцфельдта – Якоба (пресенильная деменция), а у животных – трансмиссивная энцефалопатия норок и скрепи у овец. К медленным инфекциям относят также подострый склерозирующий панэнцефалит, который вызывается вирусом кори, рассеянный склероз, амиотрофическнй боковой склероз и некоторые другие заболевания человека и животных.

При некоторых медленных инфекциях существенную роль играют генетические механизмы (скрепи, куру, амиотрофический боковой склероз), при других – иммунопатологические механизмы (подострый склерозирующий панэнцефалит, алеутская болезнь норок, лимфоцитарный хориоменингит).

Персистентные инфекции являются серьезной проблемой современной вирусологии и медицины. Большинство вирусов человека и животных способны персистировать в организме и вызывать латентные и хронические инфекций, и удельный вес персистентных инфекций намного превышает таковой острых инфекций. При персистентных инфекциях постоянно или периодически происходят выделение ви-

русов в окружающую среду, и персистентные инфекции являются основным фактором «проэпидемичивания» населения. Персистенция вирусов обусловливает их сохранение как биологического вида является причиной изменчивости свойств вирусов и их эволюции.

Большую роль персистенция вирусов играет в перинатальной патологии. Вертикальная передача персистирующего вируса от инфицированной матери плоду и активная репродукция вируса в его тканях особенно опасны в первые месяцы беременности, так как приводят к аномалиям развития плода или его гибели. К числу таких вирусов относятся вирусы краснухи, простого герпеса, ветряной оспы, цитомегалии, Коксаки В и ряд других.

Борьба с персистентными инфекциями затруднена из-за отсутствия адекватных подходов к их лечению и профилактике.

6.4 Патогенез вирусных инфекций

Под патогенезом следует понимать совокупность процессов, вызывающих заболевание и определяющих его развитие и исход. Патогенез вирусного заболевания определяется следующими факторами:

1) тропизмом вируса;

2) скоростью репродукции вируса и количеством инфекционных частиц в потомстве;

3) реакцией клетки на инфекцию;

4) реакцией организма на вызванные инфекцией изменения клеток и тканей.

Тропизм вируса к определенным клеткам и органам характерен для большинства вирусных инфекций. В зависимости от поражения тех или иных органов и тканей различают нейроинфекции, инфекции дыхательных путей, кишечные и др.

В основе тропизма вирусов лежит чувствительность к вирусу определенных клеток, а, следовательно, тканей и органов. Это свойство вирусов заражать лишь определенные клетки называется зависимым от хозяина ограничением. Патогенность вируса является генетическим признаком, обусловленным соотношением (констел-

ляцией) вирусных генов. Фенотипическим проявлением патогенности является вирулентность. Этот признак значительно варьирует в разных системах. Вирулентность не идентична зависимому от хозяина ограничению, однако при некоторых инфекциях причины, обусловливающие вирулентность вируса, могут определить и возникновение инфекции. Например, вирулентность вируса гриппа в разных клеточных системах обусловлена степенью нарезания гемагглютинина-предшественника на две субъединицы – большую и малую, которое осуществляют клеточные протеазы. Нарезание зависит как от величины, структуры и конформации участка белка, так и от наличия и концентрации специфических клеточных протеаз. При отсутствии нарезания инфекция не возникает, а разная степень его определит вирулентность вируса в данной клеточной системе.

Вирулентность вируса определяется многими факторами организма: конституция, возраст, питание, наличие стресса, естественный и приобретенный иммунитет, интерферон могут определить течение инфекции и ее исход.

Понятие «токсичность» при вирусных инфекциях лишено смысла, так как ни эндотоксинов, ни экзотоксинов применительно к вирусам не существует.

6.4.1 Пути проникновения вируса в организм

Вирус проникает в организм разными путями, которые определяются локализацией чувствительных клеток в организме и механизмом передачи вирусов от одного хозяина к другому.

Одни вирусы используют строго определенный путь проникновения в организм, Например, ортомиксовирусы, ряд парамиксовирусов, коронавирусов, аденовирусов, риновирусы способны репродуцироваться только в клетках слизистых оболочек дыхательных путей человека и животных, и, следовательно, единственным путем проникновения в организм является воздушно-капельный. Другие вирусы способны к репродукции в разных клеточных системах. Например, вирусы герпеса и оспы способны вызвать заболевание при внутри кожном, внутривенном, интраназальном, внутримозговом введении.

В естественных условиях возможны следующие пути проникновения вируса в организм.

Воздушно-капельный. Вирус проникает в дыхательные пути в составе капель, попавших в воздух из дыхательных путей больного. Чем меньше капли, тем легче и глубже они туда проникают. Вирусные частицы могут попадать также с частицами пыли. Крупные частицы пыли оседают на слизистой оболочке носа, а мелкие (не более 2 мкм) могут проникнуть глубоко в дыхательные пути и достичь альвеол.

Воздушно-капельным путем в организм попадают две группы вирусов:

1) респираторные вирусы, которые репродуцируются в эпителии слизистых оболочек дыхательных путей, вызывают местную (реже генерализованную) инфекцию и затем выводятся из организма;

2) вирусы, для которых дыхательные пути являются только входными воротами инфекции. Не вызывая местных поражений ткани, эти вирусы обусловливают генерализованную инфекцию, часто со вторичным поражением дыхательных путей. К таким вирусам относятся вирусы натуральной и ветряной оспы, кори, свинки.

Пищевой. Этим путем в пищеварительный тракт попадают энтеровирусы, реовирусы, многие альфа-вирусы, аденовирусы, некоторые парвовирусы и др.

Трансмиссивный. Вирус проникает в организм при укусе кровососущего насекомого (возбудители трансмиссивных инфекций – арбовирусы и некоторые вирусы семейства рабдовирусов).

Через кожу. Некоторые вирусы проникают в организм через поврежденную или даже неповрежденную кожу, например, вирусы бешенства (ири укусе животных), коровьей оспы, папилломы.

Половой. Таким путем в организм проникают вирусы герпеса, бородавок человека (семейство паповавирусов).

Парентеральный. Этим путем в организм попадает вирус гепатита В. Заражение вирусом может произойти при всякого рода парентеральных манипуляциях – хирургических вмешательствах, переливании крови, стоматологических операциях, при маникюре и педикюре и т.д.

Вертикальный. Этот путь передачи встречается, в частности, при интеграци-

онных инфекциях, когда в дочерние клетки попадает клеточный геном с интегрированными последовательностями вирусного генома, и при инфекциях с внутриутробным заражением плода, что характерно для вируса краснухи при заболевании женщин, особенно в первые 3 мес. беременности. Поражения плода могут вызывать вирусы цитомегалии, простого герпеса, Коксаки и др.

6.4.2 Распространение вирусов в организме

Лимфатическая система. Лимфатические сосуды являются одним из основных путей, по которым вирус распространяется от места первоначальной локализации (кожа, слизистая оболочка дыхательных путей и пищеварительный аппарат). Примером распространения вирусов по лимфатической системе является поражение лимфатических узлов после подкожной противооспенной вакцинации. Инфицированные лимфатические узлы могут быть вторичным очагом инфекции.

Кровеносная система. Гематогенный путь является основным путем распространения вируса в организме, и вирусемия является обычным симптомом при большинстве вирусных инфекций. В кровь вирусы могут поступать из лимфатической системы, переноситься с помощью лейкоцитов, проникать в кровеносные капилляры из первично инфицированных тканей. Вирусемия поддерживается путем постоянного поступления вирусов в кровь или же при нарушении механизмов элиминации вирусов из крови. Длительность нахождения вируса в токе крови может определяться размером вирусной частицы: более крупные вирусные частицы быстрее устраняются из тока крови, чем мелкие, поэтому вирусемия обычно имеет место при энтеровирусных инфекциях. Однако даже такие относительно мелкие вирусы, как тогавирусы менее чем за один час на 90 % выводятся из крови. Поэтому ряд вирусов использует специальные механизмы для длительной вирусемии. Некоторые вирусы (например, вирусы оспы) обладают способностью репродуцироваться в клетках сосудистого эндотелия, откуда непосредственно попадают в кровь; многие вирусы фагоцитируются макрофагами, которые разносят их по организму и защищают от иммунных факторов. Доставка вируса макрофагами в лимфоузлы может

лишь благоприятствовать инфекции, если вирус размножается в клетках лимфоцитов, поступая оттуда в кровь. Помимо макрофагов, вирус может связываться с другими клетками крови. Так, вирусы гриппа адсорбируются на эритроцитах, вирусы кори, паротита, герпеса, полиомиелита, клещевого энцефалита и др. адсорбируются на лейкоцитах, а некоторые вирусы способны репродуцироваться в лейкоцитах.

Нервные стволы. Нейрогенный путь распространения вирусов вдоль периферических нервов присущ вирусам бешенства, простого герпеса, полиомиелита. Вирус бешенства распространяется от входных ворот инфекции – места укуса – по нервам центростремительно к ЦНС, а оттуда – в слюнные железы, из которых вирус выделяется в слюну. Распространение вирусов герпеса в организме при опоясывающем герпесе происходит не только гематогенным, но и нейрогенным путем, при этом вирус может персистировать в дорсальных ганглиях и при определенных условиях может активироваться и распространяться по чувствительному нерву в обратном направлении. Рецепторы для вирусов герпеса обнаружены в синапсах нервных клеток. Вирус может распространяться по аксонам центробежно и центростремительно со скоростью от 200 до 400 мм в сутки.

Скорость распространения вирусов в организме и достижения чувствительных тканей определяет длительность инкубационного периода. Короткий инкубационный период имеют очаговые инфекции (грипп и другие респираторные инфекции, вирусные гастроэнтериты и др.), длительный – инфекции, возбудители которых попадают в чувствительные ткани после генерализации процесса (вирусные гепатиты).

6.5 Группы вирусов, вызывающих массовые инфекции

Вирусы, вызывающие респираторные инфекции. Виновниками острых респираторных заболеваний, помимо вирусов гриппа типов А, В и С, являются более 200 вирусов (включая их разные серотипы) и более 50 различных микроорганизмов – стафилококки, стрептококки, микоплазмы, хламидии и др. Заболевания дыхательных путей, так называемые острые респираторные заболевания (ОРЗ), вызывают парагриппозные, респираторно-синци-тиальные вирусы (семейство парамиксовиру-

сов), риновирусы, вирусы Коксаки и ECHO (семейство пикорнавирусов), коронавирусы, аденовирусы. Наибольший удельный вес среди этих вирусов занимают риновирусы, которые не вызывают никаких других заболеваний, и коронавирусы; наиболее тяжелые заболевания с вовлечением нижних дыхательных путей вызывают респираторно-синцитиальный вирус и вирус парагриппа типа 3.

Вирусы, вызывающие гастроэнтериты. Большинство вирусов не вызывают первичной инфекции желудочно-кишечного тракта, поскольку они гибнут при контакте с кислой средой желудка и желчью двенадцатиперстной кишки. Однако есть вирусы, которые не разрушаются при этих условиях и вызывают первичные поражения слизистой оболочки пищеварительного тракта.

К вирусам, вызывающим гастроэнтериты у человека, относятся ротавирусы (семейство реовирусов), вирус Норфолка, кишечные аденовирусы, калицивирусы, астровирусы, коронавирусы и неидентифицированные мелкие сферические вирусные частицы.

Энтеровирусы, включая вирусы полиомиелита, Коксаки и ECHO, обычно не являются возбудителями гастроэнтеритов. После первоначальной репродукции в пищеварительном тракте они вызывают генерализованную инфекцию с поражением ЦНС.

Острые вирусные гастроэнтериты являются широко распространенной инфекцией, которая встречается как в эпидемической, так и эндемической форме. Эти инфекции поражают разные возрастные группы и занимают второе место по частоте заболеваемости после респираторных вирусных инфекции. Болезнь имеет острое начало и сопровождается поносом, тошнотой, рвотой, падением температуры, болями в желудке, головной болью, недомоганием, мналгией.

Основной трудностью в изучении этих вирусов является отсутствие адекватных методов их накопления и пассирования в лабораторных условиях. Для культивирования ротавируса человека требуются специальные условия, хотя ротавирусы животных сравнительно легко культивируются в культурах клеток. Вирус Норфолка, калицивирусы, астровирусы, коронавирусы, серотипы 40 и 41 аденовирусов не культивируются в обычных условиях. Даже кишечные аденовирусы отличаются от-

сутствием способности репродуцироваться в обычных культурах клеток.

Вирусы, вызывающие гепатиты. Первичное поражение печени вызывают следующие вирусы: вирус гепатита А, относящийся к семейству пикорнавирусов (энтеровирус типа 72), вирус гепатита В, относящийся к семейству гепаднавирусов, и сборная группа неклассифицированных вирусов, вызывающих гепатиты ни А ни В. По клиническому течению заболевания, вызванные разными вирусами, не всегда легко отличить друг от друга.

7 Противовирусный иммунитет

Иммунная система представляет совокупность лимфоидных органов и тканей, основной функцией которой является распознавание и элиминация чужеродных веществ, Преимущественно белковой природы (т.е. веществ, синтез которых не кодирует ДНК хозяина), и обеспечение гомеостаза организма.

Антигены. Основной мишенью действия иммунной системы являются антигены, подавляющее большинство которых имеет белковую природу.

Определенная конфигурация аминокислот на поверхности антигена, обладающая иммуногенными свойствами, называется эпитоп, а участки перекрывающихся эпитопов образуют антигенные детерминанты. Антигенные детерминанты располагаются в области молекулы с доступной для антител поверхностью. Антигенные детерминанты могут быть и скрытыми, выходя на поверхность при изменении конформации или частичном расщеплении макромолекулы.

Антитела. Ответной реакцией иммунной системы на введение антигенов является появление антител – специфических иммуноглобулинов (Ig). Существует пять классов иммуноглобулинов, которые обозначаются символами IgM, IgG, IgA, IgD и IgE. Особое внимание привлечено к иммуноглобулину IgG, так как его молекулы составляют большинство всех сывороточных иммуноглобулинов и в значительной степени определяют уровень гуморального иммунитета. Молекулы IgG имеют коэффициент седиментации 7S и построены из идентичных двух тяжелых (H,

haevy) и идентичных двух легких (L, light) цепей, соединенных дисульфидными связями. У тяжелых и легких цепей имеются постоянная и вариабельная области. В вариабельной области имеются аминокислотные последовательности, способные к специфическому связыванию с разными антигенами. Постоянная область цепей имеет одни и те же аминокислотные последовательности во всех антителах данной подгруппы и в связывании с антигеном не участвует. Антигенсвязывающий центр находится во фрагменте Fab. На другом конце молекулы находится фрагмент Fc, который не связывает антиген, но в нем локализованы центры связывания комплемента, фиксации на клеточных мембранах и ряд других функций. В электронном микроскопе молекулы иммуноглобулинов выглядят в виде структуры V-образной формы, оба конца которой составлены из вариабельных участков пар тяжелых и легких цепей. Антитела являются двухвалентными, так как оба конца их могут взаимодействовать с двумя антигенными детерминантами. Антитела класса IgM имеют коэффициент седиментации 19 S и являются пентамерами, под влиянием восстанавливающих веществ диссоциируют на пять субъединиц, каждая из которых состоит из двух легких и двух тяжелых цепей с коэффициентом седиментации 7 S, связанных между собой дисульфидными связями. Молекула IgA является димером, состоящим из двух мономеров. Функцию связывания димеров осуществляет J-цепь. Иммуноглобулины IgD и IgE являются минорными сывороточными компонентами, т.е. находятся в сыворотке в наименьших концентрациях. При соединении антигена с антителом происходит взаимодействие между поверхностью антигенной детерминанты и активным центром иммуноглобулина, находящимся в вариабельной его части, таким путем, что комплементарные друг другу поверхности соединяются физико-химическими связями.

При введении в организм человека или животных антигенов выработка антител развивается в определенном порядке. При первичном введении антигена вначале появляются антитела класса IgM (3-6-й день), затем класса IgG (5–14-й день) и, наконец, класса IgA (15–21-й день). При повторном введении антигена антитела IgM-класса образуются в малом количестве и быстро образуются антитела классов IgG и IgA. Иммуноглобулины класса IgM являются антителами первичного ответа, имму-

ноглобулины класса IgG – основные антитела со строго выраженной специфичностью, в то время как иммуноглобулины класса IgA играют роль в формировании местного иммунитета слизистых оболочек (секреторные иммуноглобулины). Иммуноглобулины класса IgE фиксируются на клетках и имеют большое значение в развитии аллергических реакций (гиперчувствительности). Иммуноглобулины IgD обусловливают развитие аутоиммунных процессов и, возможно, препятствуют возникновению толерантности.

Т- и В-лимфоциты. В иммунной системе существуют две независимые, но функционирующие совместно клеточные популяции: Т-лимфоциты (тимусзависимые) и В-лимфоциты (не зависимые от тимуса). В-лимфоциты обеспечивают выработку антител и ответственны, таким образом, за большинство явлений гуморального иммунитета. Клеточный иммунитет обеспечивают Т-лимфоциты, одновременно осуществляющие функцию регуляции как В-, так и Т-системы. Эта функция Т-лимфоцитов опосредуется существованием ряда морфологических и функциональных субпопуляций, основными из которых являются Т-помощники (хелперы), Т-супрессоры, Т-киллеры и Т-индукторы. Отдельную ветвь представляют макрофаги. Иммуногенез обеспечивают восемь типов клеток – четыре типа Т-лимфоцитов, три типа В-лимфоцитов и макрофаги. Среди лимфоцитов периферической крови человека от 55 % до 60 % составляют Т-лимфоциты и от 25 % до 30 % – В-лимфоциты; от 10 % до 20 % лимфоцитов (нулевые клетки), по-видимому, являются предшественниками Т- или В-лимфоцитов.

Антителогенез. Предшественники В-клеток в костном мозге превращаются в В-лимфоциты, которые поступают в периферические лимфоидные органы и являются предшественниками трех типов плазматических клеток, продуцирующих антитела классов IgM, IgG и IgA. Подача Т-лимфоцитом включающего сигнала контролируется генами иммунного ответа. Молекула антигена распознается также и Т-сулрессорами, ограничивающими пролиферацию В-клеток на различных стадиях иммунного процесса. Т-супрессоры являются также клетками, обеспечивающими «запрет» на образование аутоантител к собственным антигенам организма, т.е. иммунологическую толерантность. Огромное разнообразие антител обеспечивается

существованием в организме млекопитающих не менее 1 млн. лимфоидных клеток, способных дать пролиферацию независимому иммунокомпетентному клону, и обусловлено комбинацией вариабельных фрагментов легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов.

Моноклональные антитела. Моноклональные антитела получают путем гибридизации лимфоцитов селезенки мышей, иммунизированных определенным антигеном, с клетками злокачественной опухоли иммунной системы мышей – миеломы. Этот метод, предложенный в 1975 г. Милстейном и соавт, основан на способности таких гибридных клеток (гибридомы) к быстрому размножению с образованием клона специфичесих антител. Гибридные клетки можно поддерживать в перевиваемой культуре, а клонируя отдельные гибридные клетки, можно получить клоны, продуцирующие большое количество идентичных антител к одной антигенной детерминанте. Размноженный в культуре клон вводят мышам интра-яеритонеально и затем пассируют развившиеся опухоли. Асцитическая жидкость таких опухолей содержит моноклональные антитела в высоких титрах. Моноклональные антитела позволяют изучать отдельные детерминанты, а применение нескольких клонов позволяет дать исчерпывающую характеристику изучаемой группе вирусов.

Иммуногенез Т-лимфоцитов. Исходным событием иммуногенеза Т-лимфоцитов также является взаимодействие антигена с макрофагом. Антиген взаимодействует со структурами главного антигена гисто совместимости (HLA) макрофага и в таком виде распознается Т-лимфоцитами; В-лимфоцит также распознает антиген и получает дополнительный сигнал включения от стимулированного Т-лимфоцита. Взаимная активация лимфоцитов происходит благодаря специфическим к неспецифическим гуморальным факторам – лимфокинам и интерлейкинам. В результате происходит пролиферация и дифференцировка Т-клеток с образованием клонов эффекторных Т-лимфоцитов, которые распознают измененную клетку и уничтожают ее. Таким образом, основой иммунного процесса служит кооперативное функционирование клеточной «троицы»: Т- и В-лимфоцитов и макрофага.

Иммунологическая память. Иммунологической памятью называют способность организма давать ускоренные иммунологические реакции на повторное вве-

дение антигена. Иммунологическая память в ряде случаев сохраняется многие годы и свойственна как гуморальному, так и клеточному иммунитету. Клетками памяти является часть дочерних В- и Т-лимфоцитов, стимулированных данным антигеном, однако более длительную иммунологическую память имеют Т-лимфоциты.

Факторы неспецифической резистентности. Помимо иммунной системы, в организме существуют факторы неспецифической резистентности. К ним относятся кожные и слизистые покровы, являющиеся механическим препятствием для проникновения возбудителей инфекционных болезней и антигенов; лизоцимы, выделяемые слизистыми оболочками и циркулирующие в крови; пропердиновая система; мукопротеины клеток слизистых оболочек. К факторам неспецифической резистентности относится также система комплемента, состоящая из 12 белков нормальной сыворотки, которая непосредственно взаимодействует с иммунной системой.

7.1 Формирование противовирусного иммунитета

Развитие вирусной инфекции начинается с проникновения вируса в организм и заражения им клеток. Приникают вирусы в клетку после взаимодействия со специфическими рецепторами на их поверхности. На сегодня известно, что вирус Эпштайн-Барра связывается с С2-рецептором комплемента, вирус бешенства – с ацетилхолиновыми рецепторами нейронов, вирус иммунодефицита человека – с CD4-молекулой, экспрессируемой на Т-клетках. Вирус, проникнув в клетку, использует ее ресурсы для собственной репликации. Вне клеток вирусы не размножаются.

В борьбе с вирусной инфекцией организм использует неспецифические факторы защиты и иммунные механизмы (рисунок 29).

Среди факторов неспецифической защиты основная роль принадлежит

1) интерферону, который способен блокировать репродукцию вирусов в клетке; 2) вируцидной функции НК-клеток и активированным макрофагам. Иногда макрофаги становятся средой для размножения вирусов и способствуют их распространению по организму.

Интерфероны – это группа белков сыворотки крови, обладающих антивирус-

ной активностью. Существуют 3 типа интерферонов: альфа-интерфероны, продуцируемые лейкоцитами крови, представлены 25 подтипами; бета-интерфероны, продуцируемые фибробластами, представлены 2 подтипами; гамма-интерферон, продуцируемый главным образом Т-лимфоцитами. Заметная активация продукции интерферонов происходит при вирусной инфекции. Выработанные на одну вирусную инфекцию, интерфероны способны подавлять развитие любой другой вирусной инфекции.

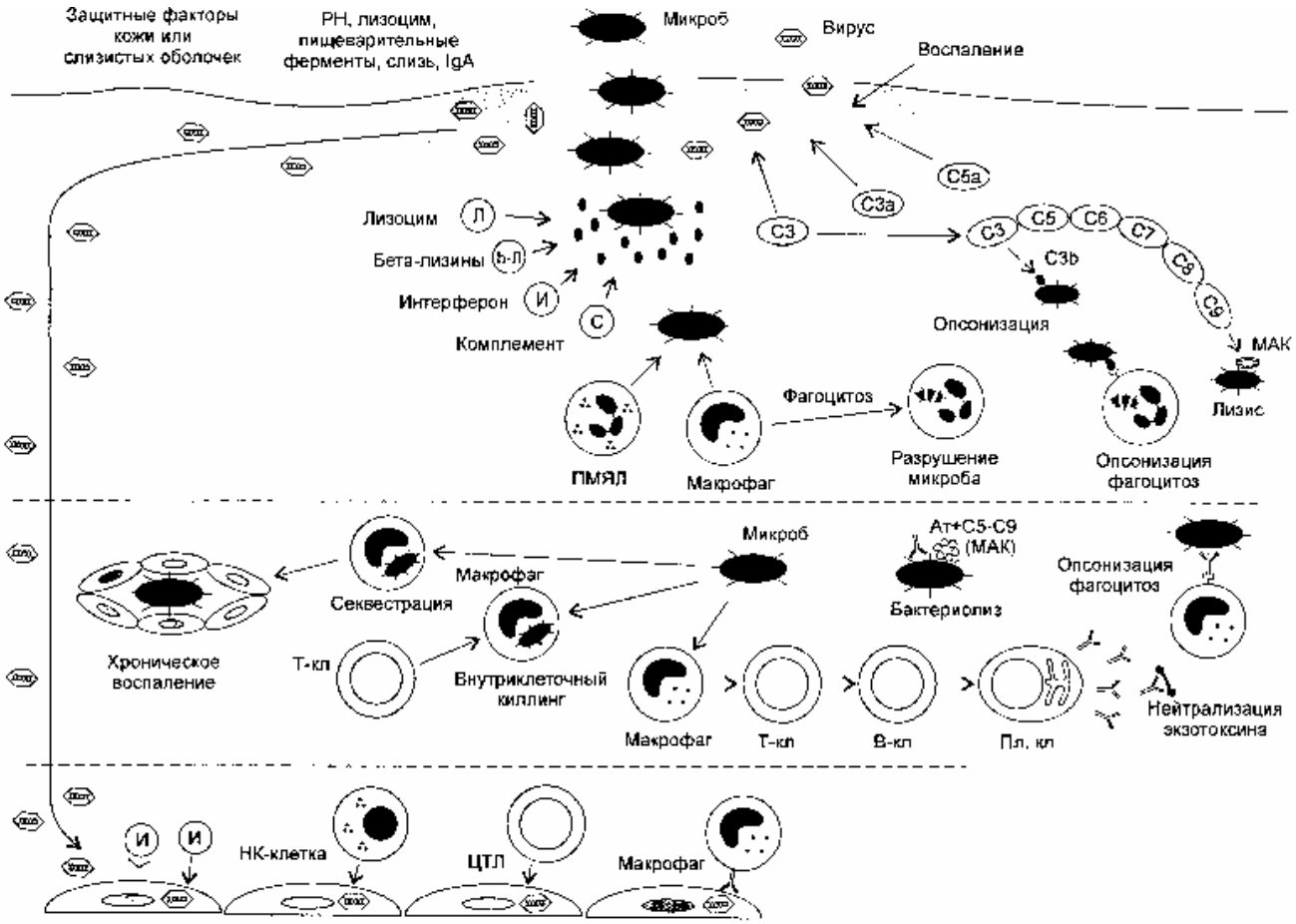


Рисунок 29 – Схема механизмов иммунных и неспецифических факторов защиты

ИНФ-α/β, связываясь с соответствующими рецепторами на инфицированных клетках (экспрессия этих молекул усиливается под влиянием инфекции), вызывает в них активацию синтеза 2’-5’-олигоаденилатсинтетазы (2’-5’(А) синтетаза), которая,

в свою очередь, переводит эндогенную рибонуклеазу (РНК-азу) из неактивной в активную форму, а последняя, в силу своей биологической активности при воздействии на вирусную (м)РНК вызывает ее деградацию.

Параллельно с этим процессом происходит активирование РНК-зависимой протеинкиназы, которая подавляет в инфицированных клетках белковый синтез. Таким образом, оба пути блокируют в клетках вирусную репликацию. Кроме того, интерфероны альфа и бета, воздействуя на НК-клетки, повышают их литическую активность в отношении вирус-инфицированных клеток.

Это свидетельствует о том, что одним из подходов к усилению противовирусного иммунитета являются средства и препараты, способные усиливать выработку эндогенного интерферона, а также препараты интерферонов, которые способны играть заместительную роль, выступать в качестве активаторов выработки интерферонов, а также активировать киллерную активность НК-клеток.

Специфическая защита от вирусной инфекции осуществляется механизмами как гуморального, так и клеточного иммунитета. Антительная защита организма является существенной только при тех вирусных инфекциях, которые распространяются гематогенно или имеют длительный инкубационный период. Этот тип защитных реакций наблюдается при инфекциях, вызванных энтеровирусами (полиомиелита, Коксаки, ECHO и др.) и риновирусами. Также следует помнить, что антитела способны выступать в качестве основного препятствия распространения вируса по организму в острый период заболевания и при реинфекции. Защитные механизмы гуморального иммунитета суммированы в таблице 4.

Таблица 4 – Гуморальные механизмы противовирусного иммунитета

Антитела	Эффекты
1. Секреторный IgA	Блокирование связывания вируса с клеткой хозяина (предохраняют от инфицирования и реинфекции)
2. IgA, IgM, IgG	Блокирование проникновения вируса внутрь клетки-хозяина
3. IgM	Агглютинация вирусных частиц
4. IgM, IgG	Усиление фагоцитоза вирусных частиц (опсонизация вирусных частиц). Активация комплемента и лизис вирусных частиц

Как следует из таблицы, антитела способны:

1) блокировать прикрепление вируса к клетке (в случае, если они направлены к эпитопам рецепторов вирусов);

2) блокировать проникновение вируса внутрь клетки (в случае, если антитела взаимодействуют с эпитопами вируса, обеспечивающими слияние вирусной оболочки с плазматической мембраной клетки-хозяина);

3) агглютинировать вирусные частицы;

4) выступать в качестве опсонинов, способствуя фагоцитозу вирусных частиц;

5) активировать систему комплемента, компоненты которой способны выступать в качестве опсонинов, а также лизировать вирусные частицы в результате атаки МАК.

Следует помнить, что антитела не способны влиять на развитие и размножение вирусов внутри клетки. Антитела малоэффективны в защите организма от хронических и медленных инфекций. Это указывает на то, что стимуляция антителообразования при большинстве вирусных инфекций является неоправданной и не приводит к существенному повышению противовирусного иммунитета. В известной мере эта процедура оправдана только для предупреждения реинфекции.

Основной формой защиты организма от вирусных инфекций является клеточный иммунитет. Из клинических наблюдений известно, что больные с дефектами гуморального иммунитета хорошо переносят вирусные инфекции, а лица, имеющие дефекты в Т-звене иммунитета, страдают вирусными заболеваниями, которые и являются клиническим проявлением этой формы иммунодефицита.

Основными эффекторами клеточного противовирусного иммунитета являются Т-цитотоксические лимфоциты ($CD8^+$-клетки). Кроме этих клеток, в клеточной защите организма принимают участие НК-клетки и макрофаги. Динамика выработки антивирусных защитных факторов приведена на При большинстве вирусных инфекций специфические Т-киллеры появляются через 3-4 дня после инфицирования, а пик их количества наблюдается к 7-10 дню. Это связано с тем, что процесс трансформации наивных Т-киллеров в эффекторные Т-киллеры сопряжен со сложными метаболическими и структурно-функциональными преобразованиями, которые со-

провождаются пролиферацией и дифференцировкой клеток.

Установлено, что трансформация наивных Т-киллеров в эффекторные Т-киллеры происходит под влиянием 2 активационных сигналов. Одного – антигенного, который наивная Т-клетка киллер получает от взаимодействия с инфицированной клеткой, и второго – в виде ИЛ-2, который она получает от Т-клетки хелпера (Тн1, $CD4^+$). Под влиянием ИЛ-2 (который является ростовым и дифференцирующим фактором для наивных Т-цитотоксических клеток) происходит количественный рост клоноспецифических Т-клеток и трансформация их в эффекторные Т-киллеры. В отсутствие ИЛ-2 не происходит формирование Т-киллеров. Это хорошо продемонстрировано на примере конгенных линий мышей, дефектных по гену, кодирующему ИЛ-2, а также мышей, дефектных по гену, кодирующему рецептор к этому интерлейкину.

Источником ИЛ-2 могут быть как активированные антигеном Т-хелперы (Тн1-клетки, $CD4^+$), так и сами активированные АГ Т-цитотоксические клетки. В последнем случае образование Т-киллеров будет происходить под контролем аутокринного механизма регуляции иммунных реакций.

Сформированные в результате отмеченных преобразований эффекторные Т-киллеры способны как лизировать в прямой цитотоксической реакции вирус-инфицированные клетки, так и вызывать при этом деградацию вирусной ДНК, таким образом, предотвращая распространение вируса по организму и инфицирование других клеток.

В месте взаимодействия Т-киллера с клеткой-мишенью Т-лимфоциты посредством механизма экзоцитоза продуцируют два рода веществ: перфорины и фрагментины (грензимы). Перфорины на поверхности клетки-мишени, полимеризуясь, формируют трансмембранные поры диаметром 5-20 нм, через которые в клетку устремляется вода, в результате чего клетка гипергидратируется и гибнет. Через образовавшиеся поры в клетку-мишень также поступают фрагментины (протеиназы, грензимы), которые вызывают фрагментацию ДНК-клетки и деградацию вирусной ДНК. Разрушение клеточной ДНК является вторым механизмом гибели инфицированных клеток. Гибель клеток-мишеней также может быть вызвана через индукцию в них

апоптоза. Этот процесс индуцируется в результате взаимодействия лиганд Fas (ФНОβ-мембранного) лимфоцита с Fas-рецепторами клетки-мишени. Fas-лиганды на лимфоцитах всегда экспрессируются под влиянием вирусной инфекции. В большинстве случаев клетки-мишени подвергаются действию комбинации этих механизмов.

Таким же механизмом НК-клетки лизируют клетки-мишени. Литическая активность НК-клеток существенно повышается, как было отмечено выше, под влиянием ИНФα и ИНФβ , а также ИЛ-12, синтезируемого активированными макрофагами. Повышенная продукция этого интерлейкина наблюдается на самых ранних стадиях инфекционного процесса.

Важную роль в подавлении вирусной инфекции играют Т-хелперы (Тн1, $CD4^+$-клетки). Первое – Т-хелперы участвуют в формировании клонов Т-киллеров. Второе – активированные Т-хелперы продуцируют такие цитокины, как ИЛ-2, ИНФ-гамма, ФНОα. ИНФ-гамма, воздействуя на интактные клетки, индуцирует устойчивость их к вирусному заражению, а также повышает вируцидную активность макрофагов. Вместе ИНФ-гамма и ИЛ-2 существенно повышают цитолитическую активность НК-клеток. Следует заметить, что с помощью Т-лимфоцитов (специфических Т-цитотоксических клеток) может быть перенесен противовирусный иммунитет. Это может использоваться в адоптивной иммунотерапии.

Учитывая закономерности развития клеточного иммунитета и формирования эффекторных Т-киллеров и механизма активирования НК-клеток, можно констатировать, что стимуляция клеточного иммунитета и противовирусной защиты организма может быть достигнута путем индукции эндогенного ИЛ-2, либо введения препаратов, содержащих ИЛ-2. В настоящее время для повышения активности цитолитических клеток применяют комплекс препаратов, содержащих ИЛ-2 и ИНФ-гамма

Развитие вирусной инфекции всегда сопряжено с борьбой микроорганизма с макроорганизмом, с подавлением его защитных механизмов. Многие вирусы способны ингибировать как неспецифические, так и специфические факторы защиты организма. Известно, что вирус гепатита С обладает механизмами, блокирующими

действие РНК-зависимой протеинкиназы, что позволяет ему избегать действия ИНФα/β.

Другой механизм защиты использует вирус простого герпеса (ВПГ). Он ингибирует презентацию собственных антигенов на инфицированных клетках. ВПГ-1 и – 2 на ранних стадиях репликации вирионов синтезирует белок ICP-47, который способен подавлять молекулы-транспортеры ТАР, важные для процессинга антигена. Подавление ТАР блокирует соединение вирусного пептида (АГ) с молекулами ГКГ I класса, что нарушает презентацию вирусного антигена Т-цитотоксическим клеткам. В результате не происходит формирование эффективного клеточного иммунитета.

Аденовирусы в борьбе с защитными силами организма используют молекулярные механизмы подавления экспрессии молекул I класса ГКГ на поверхности инфицированных клеток, вирус кори – механизмы, подавляющие экспрессию молекул 2 класса ГКГ, цитомегаловирус – механизмы, подавляющие экспрессию 1 и 2 класса молекул ГКГ. В первом случае снижается качество презентации вирусных пептидов для ЦТЛ ($CD8^+$-клетки), во втором – для Т-хелперов (Тн1, $CD4^+$-клетки), что в общем затрудняет формирование полноценного иммунного ответа.

Ряд вирусов способны подавлять систему комплемента. Известно, что активированный комплемент способен вызывать как прямой лизис вирионов, так и выступать в качестве опсонинов, облегчая их фагоцитоз. Так, вирус коровьей оспы секретирует белки, которые, соединяясь с C4b (в силу тропности), ингибируют классический путь активации комплемента. Вирус простого герпеса содержит гликопротеин, который, соединяясь с C3b, ингибирует классический и альтернативный пути активации комплемента.

Многие вирусы избегают иммунной атаки в результате высокой антигенной изменчивости. Это свойство особо присуще вирусам гриппа, риновирусам, вирусу иммунодефицита человека.

Часть вирусов способна индуцировать генерализованную иммуносупрессию. Среди них вирусы эпидемического паротита, кори, Эпштейна-Барр, цитомегаловирус, вирус иммунодефицита человека. При этом нарушение иммунных реакций может быть следствием как инфицирования иммунокомпетентных клеток и подавле-

ния их функций, так и результатом нарушения механизмов аутокринной и паракринной регуляции. Первый механизм характерен для вируса иммунодефицита человека, второй – наблюдается при инфекции, вызванной вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ). Установлено, что ВЭБ продуцирует белок BCRF1, гомологичный ИЛ-10. BCRF1, как и ИЛ-10, подавляет продукцию Т-хелперами/Тн1-клетками ИЛ-2, ФНОα и ИНФ-гамма, которые, как отмечено выше, важны для формирования противовирусного иммунитета.

Вирусы способны уклоняться от иммунных механизмов путем встраивания своего генома в геном клетки-хозяина, без экспрессии на поверхности инфицированных клеток своих антигенов. Это делает вирус иммунологически невидимым и позволяет ему персистировать в организме. Вирусы гепатита В, герпес-вирусы могут находиться в латентном состоянии годы и только при определенных ситуациях активизироваться и вызывать соответствующую симптоматику.

7.2 Эпидемиология вирусных инфекций

В эпидемиологии вирусных инфекций господствует антропоцентрический принцип, и эпидемиология вирусных инфекций или, по крайней мере, большинства из них, не имеет существенных отличий от эпидемиологии бактериальных или протозойных инфекций.

В соответствии с ее положениями, эпидемический (эпизоотический) процесс представляет непрерывную цепь заражений (инфекционных процессов), сопровождающихся выходом возбудителя во внешнюю среду, В этой цепи следует различать источники инфекции, факторы передачи и заражаемые восприимчивые организмы.

Источниками инфекции может быть человек или животное. Соответственно все болезни, вызываемые возбудителями, способными паразитировать только в организме человека, называются «антропонозы». Если же человек заражается от животного, такие болезни обозначают как «зоонозы». Примерами антропонозов среди вирусных инфекций являются грипп, корь, оспа, герпес, полиомиелит. Примерами зоонозов являются клещевой энцефалит, лихорадка флеботомная (москитная лихо-

радка), лихорадка Ласса, лимфоцитарный хориоменингит, ящур.

К понятию источников инфекции примыкает, но не тождественно ему понятие резервуара инфекции, под которым подразумевают совокупность, видов, поддерживающих существование данного возбудителя. Для антропонозов резервуаром инфекции является человек, человеческое общество, иногда ограниченное определенным ареалом. Например, лихорадка денге распространена только в тропическом поясе. Для зоонозов под резервуаром инфекции понимают виды животных, среди которых циркулирует данный вирус, нередко включая кровососущих (клещей, насекомых), которые по отношению к человеку являются переносчиками.

Понятия «антропонозы» и «зоонозы» не всегда отражают действительные процессы в природе и обществе. Так, желтая лихорадка городская бесспорно является антропонозом, так как заболевание передается от человека к человеку через укусы комаров. Но первоисточником ее является желтая лихорадка лесная (лихорадка джунглей), природные очаги которой в Центральной Африке существуют независимо от людей и обеспечиваются циркуляцией вируса между обезьянами и комарами. Таким образом, это типичный зооноз. Вынос вируса желтой лихорадки лесной за пределы природных очагов и циркуляция его среди людей превращает болезнь в антропоноз.

Еще сложнее обстоит дело с гриппом. Эта глобальная инфекция является, бесспорно, антропонозом, так как человек заражается ею только от человека. Тем не менее, почти каждая крупная эпидемия гриппа сопровождается выбросом возбудителей в популяции домашних и диких животных (включая птиц), где эти вирусы могут сохраняться и циркулировать длительное время. Более того, имеются веские основания полагать, что в процессе пересортировки генов вирусов гриппа могут появляться штаммы, вызывающие эпидемии и пандемии, которые начинают Циркуляцию среди людей по типу чистого антропоноза.

Источники инфекции (речь идет преимущественно об антропонозах) подразделяют на больных, носителей в стадии выздоровления (реконвалесценты) и здоровых носителей. Большинство вирусных инфекций в этом отношении почти не отличаются от бактериальных.

Факторы передачи вирусных заболеваний те же, что и при других инфекционных болезнях: воздух, вода, пища, почва, предметы обихода, а также членистоногие – преимущественно кровососущие. Соответственно различают воздушно-капельный механизм передачи, фекально-оральный, через поврежденные наружные покровы и посредством укуса кровососущих членистоногих (трансмиссивный путь передачи). При вирусных инфекциях существует еще один механизм передачи вирусов – вертикальный, который осуществляется двумя способами: внутриутробное заражение плода и генетическая передача. Внутриутробное заражение плода может наблюдаться при заражении беременной женщины вирусами краснухи, цитомегалии и др. Циркулируя в крови, эти вирусы проникают через плацентарные барьеры и повреждают плод, вызывая развитие уродств. Генетическая передача характерна для онкогенных вирусов и обусловлена интеграцией их генома с геномом половых клеток.

Восприимчивые индивидуумы являются той почвой, на которой развивается эпидемический процесс. При инфекциях, передающихся воздушно-капельным путем, заболеваемость регулируется уровнем коллективного иммунитета, который формируется после очередной эпидемии. Примером является возникновение эпидемии кори в изолированных коллективах, все члены которого заболевают, за исключением лиц, перенесших корь при предыдущем заносе. При гриппе также заболеваемость регулируется уровнем коллективного иммунитета, однако в связи с изменчивостью протективных антигенов вируса гриппа сложившийся коллективный иммунитет не обеспечивает защиту от инфекций, поэтому эпидемии гриппа повторно поражают одни и те же контингенты.

Коллективный иммунитет регулирует заболеваемость и при ряде энтеровирусных инфекций, в частности при полиомиелите и гепатите А, а в эндемичных местностях – и при некоторых арбовирусных инфекциях. При указанных инфекциях целесообразна вакцинация, которая формирует необходимый коллективный иммунитет.

Среди вирусных болезней есть такие, восприимчивость к которым абсолютна и иммунитет после них сохраняется на многие годы или даже на всю жизнь (недавно ликвидированная оспа, корь, клещевой энцефалит). Существуют инфекции, воспри-

имчивость к которым невысока, однако развивается хорошо выраженный иммунитет (полиомиелит, гепатит А, многие энтеровирусные инфекции). Встречаются инфекции, вызывающие недостаточно прочный иммунитет, в результате чего возможны повторные заболевания (парамиксовирусные, риновирусные, аденовирусные инфекции), а также инфекции, при которых иммунитет мало эффективен вследствие изменчивости возбудителя (грипп), и, наконец, инфекции хронические, при которых иммунные реакции не являются эффективными (герпетические, цитомегаловирусные, аденовирусные инфекции). Поэтому при изучении эпидемиологии вирусных инфекций важно знать иммунологический статус в отношении изучаемой инфекции. Это помогает правильно планировать и проводить профилактические прививки, как это делалось при массовой ликвидации полиомиелита, снижении заболеваемости корью, глобальном искоренении оспы.

7.3 Иммунопрофилактика вирусных инфекций

Вирусные вакцины. Вакцинация имеет большое значение в профилактике вирусных инфекций. В результате вакцинации в организме вырабатывается иммунитет, обусловленный гуморальными и клеточными факторами, и организм становится невосприимчивым к инфекции. Эффективные вакцины созданы против многих вирусных инфекций. В результате вакцинации во всем мире ликвидирована оспа, побежден полиомиелит, ведется успешное наступление на корь, желтую лихорадку и другие инфекции.

В настоящее время известны следующие виды вирусных вакцин:

1) вакцины из живых аттенуированных вирусов;

2) корпускулярные (вирионные) убитые вакцины;

3) субъединичные вакцины;

4) генноинженерные вакцины;

5) синтетические вакцины.

Живые вакцины готовятся из аттенуированных вирусов, полученных разными приемами – отбором мелких колоний, ts-мутантов, адаптированных к холоду мутан-

тов и т. п. Вакцинные штаммы должны быть генетически стабильными и не давать реверсий к дикому типу.

Живые вакцины отличаются от убитых тем, что они имитируют образование естественного иммунитета, так как при введении в организм вакцинальные штаммы размножаются, вызывая развитие вакцинальной реакции, сходной с естественным процессом, но отличающейся отсутствием или слабой выраженностью патологических явлений. Поэтому живые вакцины вызывают развитие совершенного иммунитета, сопровождающегося выработкой как гуморальных (IgG), так и секреторных (IgA) антител и появлением стимулированных Т-эффекторов и клеток памяти. Однако живые вакцины имеют ряд недостатков.

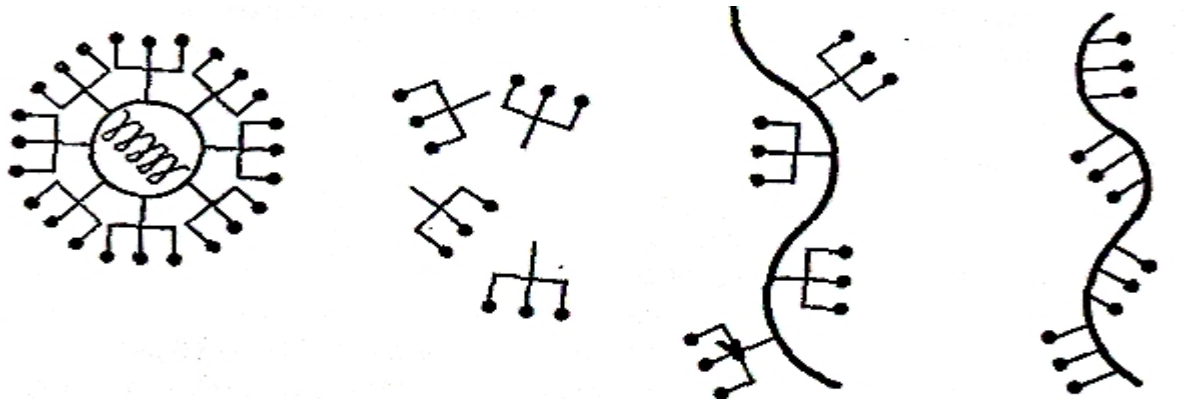
Естественной живой вакциной был вирус коровьей оспы, который Дженнер в 1796 г. привил ребенку. От англ. vacca – корова – получили свое название вакцины. Примером эффективности вакцинопрофилактики является выдающийся успех в борьбе с оспой, завершившейся ее ликвидацией во всем мире.

Корпускулярные убитые вакцины готовят из очищенного концентрированного вируса, инактивированного формальдегидом, аминометилольными соединениями (соединения формальдегида с аминокислотами) или ультрафиолетовым облучением (последний метод не всегда бывает надежным). Достоинством этих вакцин является точная дозировка антигена и, следовательно, более или менее стандартный иммунный ответ. Недостатком убитых вакцин является необходимость многократного, введения и инъекционный путь введения, в результате чего не происходит образования секреторных иммуноглобулинов класса А.

К инактивированным вакцинам относятся вакцины против бешенства, полученные из мозга лабораторных животных и в культуре клеток, против гепатита В, полученная из HBs-антигела и другие.

Субъединичные вакцины. В корпускулярных вакцинах, приготовляемых из сложно устроенных вирионов, лишь поверхностные протективные антигены, составляющие обычно около 10 % вирусных белков, вызывают развитие вирусспецифического иммунитета. Остальные белки и липиды лишь усиливают реактогенность и вызывают развитие аллергических реакций. Поэтому вполне закономерным явля-

ется получение субъединичных вакцин, содержащих протективные антигены. Как промежуточный этап применяются расщепленные (сплит) вакцины, для приготовления которых вирус обрабатывают эфиром или другими жирорастворителями, удаляя липиды. Такие вакцины менее реактогенны, нежели корпускулярные, однако в них сохранены балластные вирусные белки, не играющие роли в создании протектикного иммунитета (рисунок 30).



I II III IV

I – вирион; II – субъединичная вакцина без носителя; III – субъединичная вакцина с носителей; IV – субъединичная вакцина на антигенных детерминант, ассоциированных с носителем иммуностимулятором.

Рисунок 30 – Принцип конструирования субъединичных и синтетических вакцин

Субъединичные вакцины лишены этих недостатков. Они готовятся следующим образом. Очищенные препараты вируса разрушают детергентами – химическими веществами, растворяющими липиды, затем отделяют поверхностные протективные антигены от нуклеокапсидов либо путем центрифугирования, либо путем хроматографии на колонках. Очищенные препараты стерилизуют и концентрируют, удаляя детергент с помощью диализа. Полученные таким путем субъединичные вакцины обладают минимальной реактогенностью, однако иммуногенные свойства их обычно слабее, чем у корпускулярных вакцин. Субъединичные вакцины приготовлены из вирионов гриппа, на очереди – субьединичные вакцины против вирусов

герпеса, бешенства и других сложно устроенных вирусов.

Синтетические вакцины создают путем синтеза антигенных детерминант протективных вирусных белков. Однако чистый антиген, выделенный из состава вируса или искусственно созданный, не всегда обладает достаточной иммуногенностью, и иммунитет в ряде случаев не возникает. Антигены, вызывающие слабый иммунный ответ, должны быть конъюгированы с носителями и иммуностимуляторами, усиливающими иммунный ответ (рисунок 30).

Синтетические вакцины – представляются в виде чистых протективных антигенов, полученных путем клонирования синтезированных участков генов в клетках высших эукариотов.

Генноинженерные вакцины. Экспрессия генов инсулина, соматотропного гормона (гормона роста), интерферона человека в прокариотических системах показала широкие возможности генетической инженерии и поставила на очередь задачу получения вакцин против инфекционных болезней и, в первую очередь, против вирусных инфекций.

Однако экспрессия многих вирусных генов в прокариотических системах отсутствует или незначительна в силу того, что указанные вирусы в ходе эволюции приспособились к паразитированию в организме человека и высших животных и используют для репродукции биосинтетические системы клетки хозяев, имеющие существенные отличия от биосинтетических систем прокариотов. Лишь в тех случаях, когда белки (антигены) относительно просты, возможно использование прокариотических систем. Наряду с прокариотическими системами целесообразно использование простых эукариотических систем, какими являются дрожжи. Однако и дрожжевые клетки не могут обеспечить синтез полноценных антигенов ряда вирусов человека и животных и для экспрессии их генов необходимы клетки высших эукариотов, что значительно усложнит и удорожит производство. Вакцины против полиомиелита и гриппа вряд ли будут широко производиться на перевиваемых клетках обезьян и человека методами генной инженерии, так как проще и дешевле производить эти вакцины, заражая клетки вирусом. Для вируса гепатита А этот путь наиболее перспективен в связи с трудностью накопления его в лабораторных условиях.

Для вируса гепатита В генноинженерные вакцины также решают проблему контроля вакцины, требующего использования дорогостоящих пород обезьян. Получены рекомбинантные плазмиды, клонированные в кишечной палочке, однако стабильной экспрессии HBs-антигена в прокариотах подучить не удалось. Она достигнута в клетках низших эукариотов — дрожжах. Достоинством дрожжевой вакцины является ее относительно высокая иммуногенность, полная безвредность, отсутствие необходимости контроля на обезьянах, дешевизна. Экспрессия HBs-антигена осуществлена в культуре клеток млекопитающих (грызуны), и такая вакцина может конкурировать с дрожжевой.

Перспективным является также использование в качестве вектора геномов крупных ДНК-содержащих вирусов и, в первую очередь, вируса осповакцины.

Антиидиотипические антитела – это антитела к антителам против вирусных антигенов, которые по своей структуре сходны с антигенами и способны индуцировать гуморальный и клеточный иммунный ответ. Предполагается в будущем использование их в качестве эффективных и безвредных вакцин.

Указанные новые направления особенно перспективны для осуществления специфической профилактики инфекций, вызываемых вирусами, которые не культивируются в лабораторных условиях, имеют много серотипов или антигенно нестабильны и вызывают лишь кратковременный иммунитет.

8 Бактериофаги

Бактериофаги — вирусы, размножающиеся в бактериальных клетках. В современной классификации вирусы бактерий распределены на 13 семейств и один неклассифицированный род.

У бактериофагов обнаружены четыре вида геномов. Отсутствуют ретроидные вирусы и (-)РНК-геномные вирусы. Сегментированный РНК-геном содержат цистовирусы (Cystoviridae), (+)РНК-геном – левивирусы (Leviviridae). Основная масса бактериофагов – это ДНК-содержащие вирусы. Геномная ДНК бактериофагов может быть однонитевой и двухнитевой, линейной, кольцевой или суперскрученной.

Линейные молекулы ДНК могут иметь липкие концы, содержать прямые или инвертированные концевые повторы или геномные белки.

Отличительной особенностью ДНК целого ряда фагов является наличие метилированных оснований (5'-метилцитозина, или 5-МЦ; 6'- метиламинопурина, или 6-МАП), которые могут входить в состав ДНК в качестве минорных или мажорных оснований. Так, ДНК фагов fd и φX174 (колифаги) содержит 1-2 метилированных основания, а в ДНК фага XI2, лизирующего морскую бактерию *Xantomonas oryza*, вообще нет обычного цитозина, который полностью замещен 5-МЦ. Источником происхождения таких оснований является энзиматическое метилирование уже синтезированной цепи ДНК. Этот процесс осуществляют специфические метилазы, которые используют в качестве донора метильных групп S-аденозилметионин.

8.1 История бактериофагов

1896: Эрнест Ханкин сообщил, что воды рек Ганга и Джамна в Индии обладают значительной антибактериальной активностью, которая сохранялась после прохождения через фарфоровый фильтр с порами очень малого размера, но устранялась при кипячении. Наиболее подробно изучал он действие неизвестной субстанции на Vibrio cholerae и предположил, что она ответственна за предупреждение распространения эпидемий холеры, вызванных употреблением воды из этих рек. Однако, в последующем, он не объяснил этот феномен.

1898: Впервые перевиваемый лизис бактерий (сибиреязвенной палочки) наблюдал русский микробиолог Н.Ф. Гамалея.

1915: Английский учёный Ф. Туорт описал это же явление у гнойного стафилококка и открыл первый «вирус, пожирающий бактерии» , когда он наблюдал любопытное дегенеративное изменение – лизис в культурах стафилококков из лимфы теленка. С его именем связано название «феномен Туорта».

1917: Феликс д'Эрель делает аналогичное открытие, Именно Феликс д'Эрель канадский сотрудник Института Пастера в Париже, дал им название «бактериофаги» – используя суффикс «фаг» не в его прямом смысле «есть», а в смысле развития

за счет чего-то (д'Эрель, 1922), они стали главной частью работы всей его жизни.

8.2 Морфология бактериофагов

Применение современных электронных микроскопов, а также усовершенствование методов приготовления препаратов для электронной микроскопии позволили более детально изучить тонкую структуру фагов. Оказалось, что она весьма разнообразна и у многих фагов более сложна, чем структура вирусов растений и ряда вирусов человека и животных.

Разные фаги отличаются друг от друга не только по форме, величине и сложности своей организации, но и по химическому составу. Оказалось, что фаги, лизирующие микроорганизмы различных групп, могут быть вполне идентичными по своей морфологии. В то же время фаги, активные против одной и той же культуры, могут резко различаться по своей структуре. Так, например, среди фагов, способных лизировать разные штаммы кишечной палочки, выявлены все известные морфологические типы фагов.

Частицы (или вирионы) большинства известных фагов имеют форму сперматозоида. Они состоят из головки (или капсида) и отростка. Наряду с этим есть фаги, которые состоят из одной головки, без отростка, и фаги, имеющие форму палочки (палочковидные или нитевидные фаги).

По форме частиц фаги делятся на шесть основных морфологических типов (групп) (рисунок 31): палочковидные или нитевидные фаги; фаги, состоящие из одной головки, без отростка; фаги, состоящие из головки, на которой имеется несколько небольших выступов; фаги, состоящие из головки и весьма короткого отростка; фаги, имеющие головку и длинный отросток, чехол которого не может сокращаться; фаги, имеющие головку и длинный отросток, чехол которого может сокращаться.

Размеры фагов принято обозначать в милли-микрометрах (1 миллимикрометр – миллионная часть миллиметра) или в ангстремах (10 □ = 1 миллимикрометр).

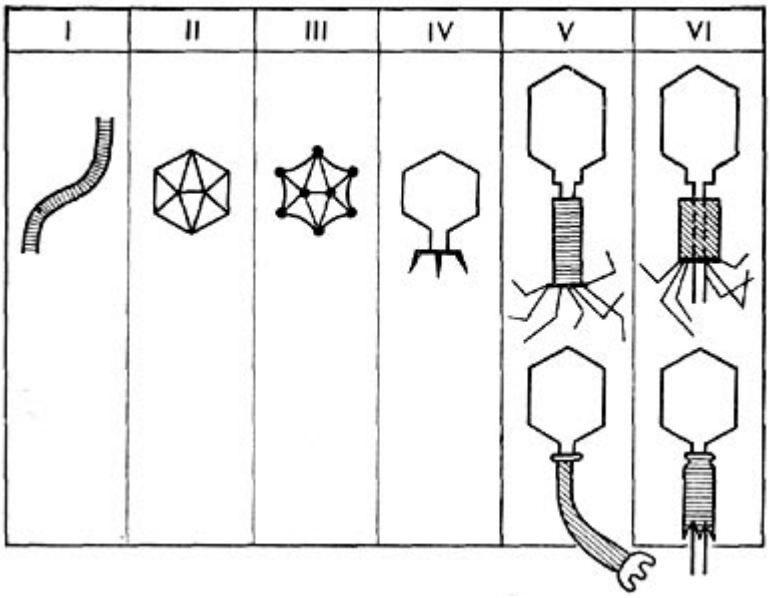


Рисунок 31 – Морфологические типы фагов

Фаги первого морфологического типа – палочковидные или нитевидные – выявлены у кишечной, синегнойной, чудесной палочек и других бактерий. Средние размеры их: длина – от 7000 до 8500 □, ширина – от 50 до 80 □ (рисунок 32). Эти фаги отличаются от всех остальных не только большой специфичностью, но и рядом других важных свойств.

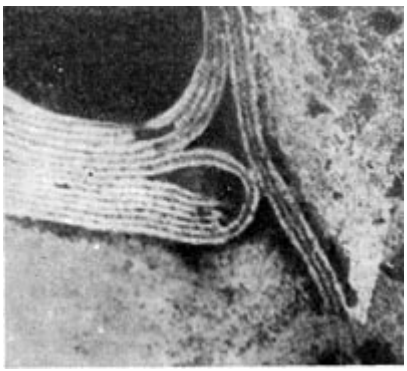


Рисунок 32 – Палочковидные, или нитевидные, фаги (увел. × 400 000)

Фаги второго морфологического типа. Частица их состоит из одной головки гексагональной (шестигранной) формы на плоскости (рисунок 33). Частицы очень мелкие, средний размер их от 230 – 300 □ в диаметре.

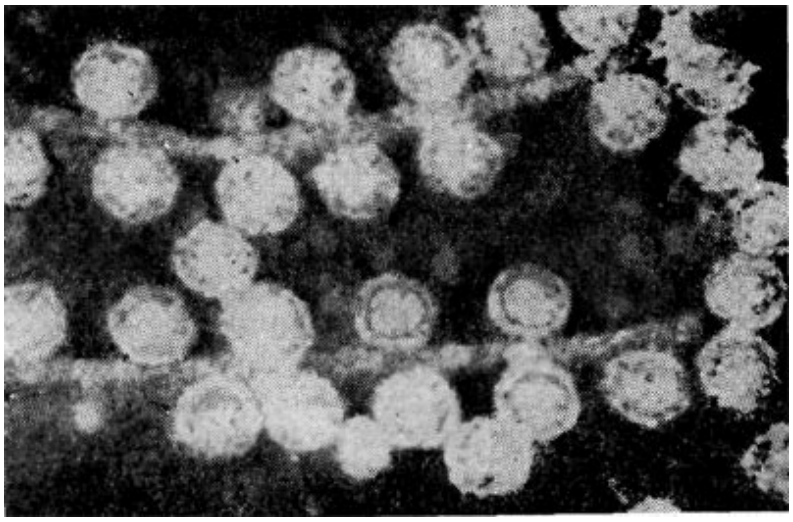


Рисунок 33 – Фаги 2 морфологического типа, частица состоит из одной головки (увел. × 600 000)

У фагов третьего морфологического типа форма и размеры головки такие же, как у фагов второго типа, но у их головок имеются обычно несколько очень коротких выступов (рисунок 34). Возможно, эти выступы являются аналогами отростков.

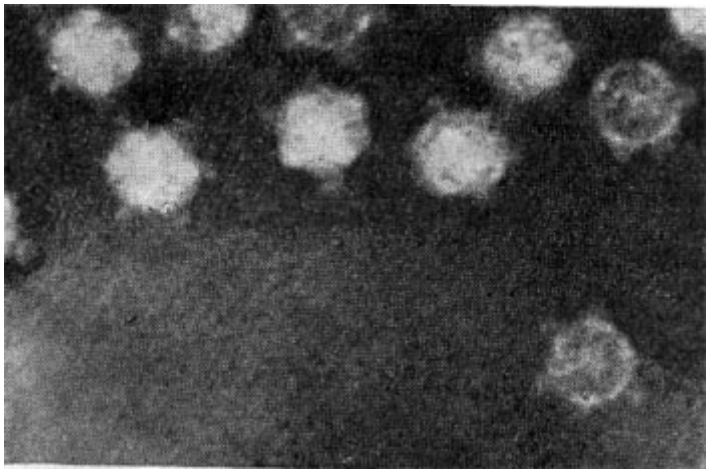


Рисунок 34 – Фаги третьего морфологического типа от головки отходят небольшие выступы (увел. × 500 000)

Фаги 2-го и 3-го морфологических типов отличаются постоянством формы и размеров, независимо от того, против каких микроорганизмов они активны. Эти фаги относятся к мелким формам.

Фаги 4-го морфологического типа. Частица состоит из головки, размеры которой варьирую от 400 до 640 в диаметре, и очень короткого отростка (рис. 35).

Длина и ширина отростка от 70 до 200 □.

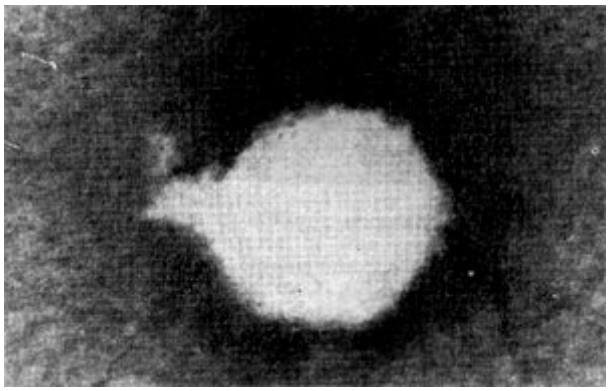


Рисунок 35 – Фаг 4 морфологического типа. Частица состоит из головки и короткого отростка (увел. × 500 000)

Фаги пятого морфологического типа наиболее широко распространены. Головка у частиц гексагональной, формы различных размеров – от 500 до 4250 □ в диаметре. Размеры отростка: длина – от 1700 до 5000 □, ширина – от 70 до 120 □ (рисунок 36). Чехол отростка не способен сокращаться.

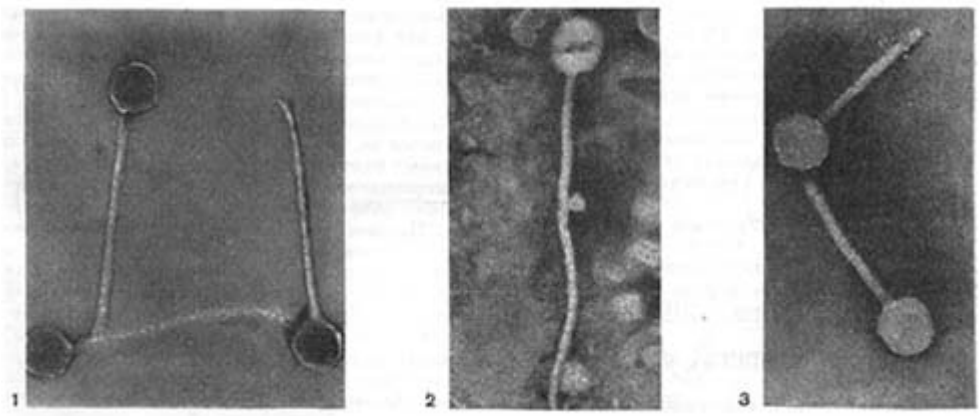


Рисунок 36 – Разные фаги пятого морфологического типа, частица состоит из головки и длинного отростка, чехол которого не способен сокращаться (1, 2 – увел. × 225 000, 3 – увел. × 250 000)

Фаги шестого морфологического типа также широко распространены. Головка частицы различной формы и размеров – от 600 до 1500 □ в диаметре, гексагональная. Размеры отростка: длина – от 800 до 2890 □, ширина – от 140 до 370 □. Важной

особенностью фагов этой группы является то, что чехол, окружающий отросток, способен сокращаться, в результате чего становится видимым внутренний стержень отростка (рисунок 36).

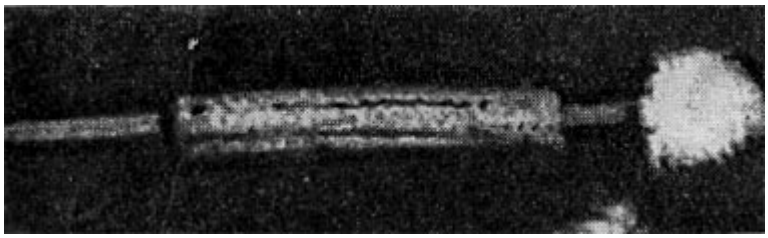


Рисунок 36 – Фаг шестого морфологического типа, частица состоит из головки и длинного отростка, чехол которого способен к сокращению (увел, около 400 000)

Наиболее сложноустроенными являются бактериофаги Т-четной серии. Рассмотрим их организацию на примере бактериофага Т4, образованного 30-ю белками (рисунок 37).

Головка фага Т4 состоит из двух неравноценных частей – белкового изометрического капсида с заключенной в нем ДНК, и миниатюрного комплекса, который находится в основании одного из углов капсида. Этот комплекс состоит из муфты и шейки. Шейка, в свою очередь, организована цилиндром и воротничком с 6-ю короткими воротничковыми нитями.

Рисунок 37 – Строение бактериофага Т4

Хвостовой отросток состоит из стержня, окруженного белковым чехлом, и базальной пластинки, ассоциированной с 6-ю длинными и 6-ю короткими фибриллами. Чехол хвостового отростка образован 144 белковыми субъединицами и может находиться в растянутом или сокращенном состоянии. Растянутый чехол — это структура, состоящая из стопки дисков (24 диска, каждый образован 6-ю субъединицами), в то время как сокращенный чехол – это спирально закрученный тяж из 144 белковых субъединиц.

8.3 Химический состав фагов

В настоящее время изучен химический состав фагов, принадлежащих к разным морфологическим типам и поражающих микроорганизмы почти всех систематических групп.

Основными компонентами фагов являются белки и нуклеиновые кислоты. Важно отметить, что фаги, как и другие вирусы, содержат только один тип нуклеиновой кислоты – дезоксирибонуклеиновую (ДНК) или рибонуклеиновую (РНК). Этим свойством вирусы отличаются от микроорганизмов, содержащих в клетках оба типа нуклеиновых кислот.

Нуклеиновая кислота находится в головке. Внутри головки фагов обнаружено также небольшое количество белка (около 3 %).

Таким образом, по химическому составу фаги являются нуклеопротеидами. В зависимости от типа своей нуклеиновой кислоты фаги делятся на ДНК-содержащие и РНК-содержащие. Количество белка и нуклеиновой кислоты у разных фагов разное. У некоторых фагов содержание их почти одинаковое и каждый из этих компонентов составляет около 50 %. У других фагов соотношение между этими основными компонентами может быть различно.

Кроме указанных основных компонентов, фаги содержат в небольших количествах углеводы и некоторые преимущественно нейтральные жиры.

Все известные фаги второго морфологического типа РНК-содержащие. Среди фагов третьего морфологического типа встречаются как РНК-содержащие, так и

ДНК-содержащие формы. Фаги остальных морфологических типов – ДНК-содержащие.

8.4 Антигенные свойства фагов

Известно, что при введении в организм животного подкожно или внутривенно белка, бактериальных клеток, некоторых продуктов жизнедеятельности микроорганизмов и других веществ в крови животного вырабатываются вещества, названные антителами. Вещества, способные вызывать образование антител, называются антигенами.

Антитела очень специфичны и способны вступать в реакции только с теми антигенами, которые вызвали их образование. Они или связывают соответствующие антигены, или нейтрализуют их, или осаждают, или растворяют.

Оказалось, что все фаги обладают антигенными свойствами. При введении фага в организм животного в сыворотке крови образуются специфические антитела, способные действовать только против данного фага. Такие сыворотки называются антифаговыми. Когда фаг смешивается со специфической антифаговой сывороткой, происходит инактивация фага – фаг теряет способность вызывать лизис чувствительных к нему микробов.

Так как каждая антифаговая сыворотка специфична, ее можно успешно применять для идентификации и классификации фагов и очистки микробной культуры от фага. При помощи сыворотки удалось доказать, что белок оболочки фага отличается от белка оболочки отростка и от белка базальной пластинки и ее нитевидных образований, что говорит о сложности структуры фаговой частицы. По антигенным свойствам фаг резко отличается от чувствительных к нему микробов.

8.5 Размножение фагов

Взаимоотношения между фагом и чувствительной к нему клеткой очень сложны и не всегда завершаются лизисом клетки и размножением в ней фага. Одни

бактериофаги весьма специфичны и способны лизировать клетки только одного какого-либо вида микроорганизмов (монофаги), другие – клетки разных видов (полифаги). Рассмотрим такую инфекцию клетки, которая заканчивается гибелью клетки и размножением в ней фага. Такая инфекция называется продуктивной.

Важнейшей особенностью размножения фага является то, что оно может происходить только в живых клетках, находящихся в стадии роста.

В мертвых клетках, а также продуктах клеточного обмена размножение фага не происходит. По характеру взаимодействия с микробной клеткой различают вирулентные и умеренные бактериофаги. Процесс взаимодействия вирулентного бактериофагов с клеткой весьма сложный и состоит из следующих последовательно протекающих этапов (рисунок 38):

1) адсорбция фаговой частицы на поверхности микробной клетки;

2) проникновение содержимого головки фаговой частицы (нуклеиновой кислоты) в микробную клетку;

3) внутриклеточное развитие фага, заканчивающееся образованием новых фаговых частиц;

4) лизис клетки и выход из нее новых фагов.

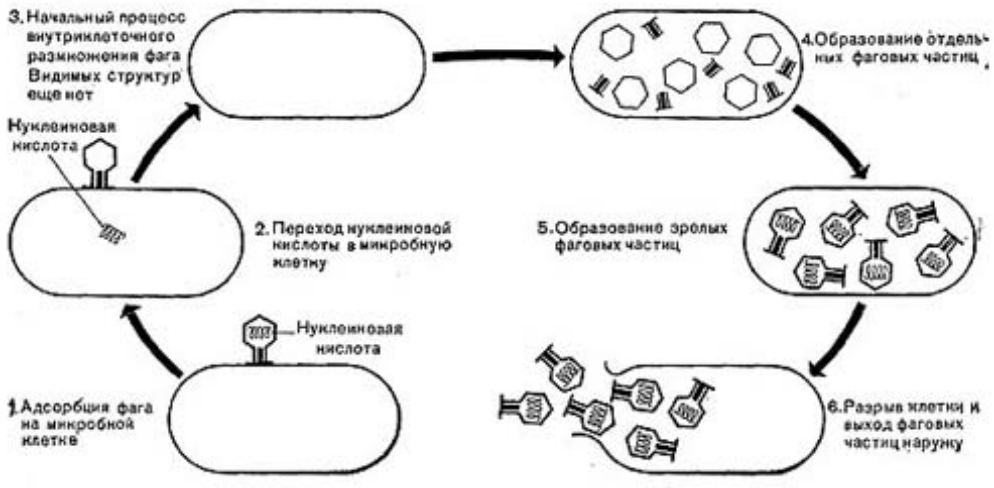


Рисунок 38 – Схема размножения фага

Время с момента инфицирования клетки фагом до лизиса клетки называется

латентным или скрытым периодом. Продолжительность этого периода различна для разных типов фага, зависит от окружающей температуры, состава среды и других факторов. Латентный период фагов, специфичных для одних бактерий, от 15 до 40 мин, для других – 5 ч и более. У фагов актиномицетов латентный период может быть еще продолжительнее. При низкой температуре латентный период значительно увеличивается.

Из всех этапов размножения фага наиболее изучен первый – адсорбция.

Адсорбция фага на клетке – реакция весьма специфичная. В клеточной стенке бактерий имеются особые структуры (рецепторы), к которым могут прикрепиться фаги. Адсорбируются на рецепторах только те фаги, к которым чувствительна клетка.

Фаги, имеющие отростки, прикрепляются к микробной стенке свободным концом отростка. Нитевидные фаги, а также фаги, не имеющие отростков, адсорбируются не на микробной стенке, а на нитевидных структурах, окружающих стенку, – фимбриях. Описаны фаги, которые прикрепляются отростком к бактериальным жгутикам (рисунок 39). У некоторых фагов процесс адсорбции может осуществляться лишь в том случае, когда в среде имеются определенные вещества – кофакторы: аминокислоты (триптофан, тирозин и др.) или соли (кальциевые, магниевые).

Рисунок 39 – Адсорбция фага на клетке

На конце фагового отростка имеется особый фермент типа лизоцима. После адсорбции фага под влиянием этого фермента происходит растворение стенки микробной клетки и содержимое головки фага – нуклеиновая кислота – перекачивается в микробную клетку. Этим завершается второй этап процесса размножения фага.

Остальные структуры фаговой частицы – оболочка головки, отросток и его субструктуры – внутрь инфицированной фагом клетки не попадают. Их роль заключается в обеспечении сохранности фаговой частицы, находящейся вне клетки, и содействии проникновению фаговой нуклеиновой кислоты в клетку при инфекции.

У нитевидных фагов, в отличие от других видов фагов, внутрь клетки проникает весь белок или его часть. После проникновения нуклеиновой кислоты фага в клетку начинается сложный процесс внутриклеточного размножения фага. Под влиянием нуклеиновой кислоты фага резко изменяется весь обмен микробной клетки. Основные процессы, протекающие в инфицированной клетке, направлены на образование новых фаговых частиц. Инъецированная ДНК подавляет синтезирующие механизмы клетки, заставляя ее синтезировать ДНК и белки бактериофага. Из образовавшихся в разных частях клетки в разное время фаговой нуклеиновой кислоты и белка формируются новые фаговые частицы (сборка Б.). Вначале формируются отдельно головки и отростки, которые затем объединяются в зрелые фаговые частицы. К этому времени внутри клетки образуется особый литический фермент, который вызывает лизис клетки изнутри. Клетка распадается, и новые зрелые частицы фага выходят наружу.

Количество новых фаговых частиц, образуемых одной клеткой при фаговой инфекции, называют выходом фага или его урожайностью. Выход фага зависит от свойств данного фага и не зависит от клетки-хозяина и ее размеров. Одни фаги отличаются очень низким выходом (5–50 частиц на клетку), у других выход значительно выше (от 1000 до 2500). Особенно высоким выходом отличаются мелкие РНК-овые фаги (свыше 20 000 частиц на клетку). Если большое количество бактериальных клеток смешать с небольшим количеством фаговых частиц, то процесс размножения фагов проходит несколько циклов. В начале инфицируется часть кле-

ток. Первое потомство фага инфицирует оставшиеся клетки – происходит второй цикл, за ним может следовать третий и т.д., пока не будут лизированы все чувствительные к данному фагу клетки. Среди фагов встречаются такие, размножение которых возможно лишь при наличии в среде определенных кофакторов. Одни из этих веществ, как уже указывалось, необходимы для адсорбции фага; другие – для внутриклеточного размножения фага.

Если произвести рассев по поверхности агаризованной питательной среды в чашках Петри смеси фага и чувствительных к нему микробов и чашки выдержать в термостате, то происходит лизис клеток в результате размножения фага. Если взять большое количество частиц фага, то лизируется большая часть или весь выросший газон культуры. Если количество фаговых частиц таково, что они распределяются только на отдельных участках газона, лизируя в этих местах культуру, то возникает колония фага.

Эти колонии фага получили название бляшек, стерильных пятен. Правильнее их называть негативными колониями. Каждая негативная колония состоит из десятков и сотен миллионов фаговых частиц. Размер негативных колоний и их форма зависят в первую очередь от свойств фага, а также от состава среды и культуры микробов. У одних фагов негативные колонии очень мелкие и еле видимы невооруженным глазом, другие достигают 10 мм в диаметре и более. Колонии бывают светлые и четкие, когда лизировалась вся культура, или мутноватые, когда лизировались не все клетки. Вокруг негативных колоний некоторых фагов могут возникнуть различной формы и величины ореолы (рисунок 40).

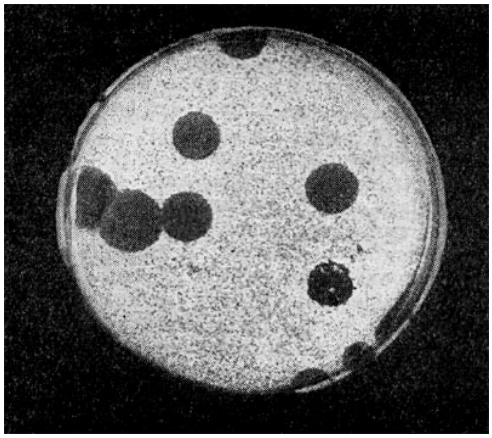


Рисунок 40 – Крупные негативные колонии актинофага (увел. 1:1)

Морфология негативных колоний служит одним из признаков, которым пользуются при дифференциации фагов.

8.6 Видовая и штаммовая специфичность бактериофагов

Видовая специфичность бактериофагов, как и в случае других вирусов, определяется наличием на клеточной поверхности специфических рецепторов и реализуется на стадии адсорбции. Адсорбция является физико-химическим процессом взаимодействия структур фаговой частицы, отвечающих за адсорбцию, и особых компонентов клеточной стенки, получивших название фаговые рецепторы. Чаще всего рецепторами являются липополисахариды и белки клеточной стенки. Описаны фаги E. Coli f1 и f2 (Inovirus), адсорбирующиеся на половых пилях, в связи с чем, они размножаются только на мужских штаммах (F^+). Взаимодействие фага и рецептора высоко специфично. Именно стадия адсорбции определяет круг бактерий — хозяев фага. Как правило, определенный тип бактериофага паразитирует на бактериях одного вида, реже – на нескольких близкородственных видах (например, на кишечных палочках и шигеллах). Потеря фаговых рецепторов или их изменение является основной причиной устойчивости бактерий к фагу.

Круг хозяев бактериофагов, кроме наличия у них специфических фаговых рецепторов, определяется и другими специфическими особенностями клеток бактерий. Способность того или иного фага заражать разные виды и штаммы бактерий в определенной степени зависит от систем рестрикции-модификации клеток последнего хозяина, где этот фаг реплицировался. В общем виде сущность феномена модификации хозяином состоит в том, что клетки, где может происходить репликация вируса, имеют специфические эндонуклеазы рестрикции, вызывающие деградацию чужеродных ДНК (система рестрикции или r-система), и одновременно имеют ферменты (метилазы, гликозилазы), защищающие свою ДНК путем придания ей дополнительной, «уточняющей» специфичности в виде минорных метилированных оснований (система модификации или m-система). Клетка защищает свою ДНК от своей r-системы метилированием оснований в строго специфичных местах (сайтах) рест-

рикции. Поскольку такие сайты (короткие последовательности нуклеотидов) имеются и в ДНК вируса, они также метилируются, то есть клетка как бы метит «свои» вирусы. В разных видах бактерий присутствуют разные эндонуклеазы рестрикции и соответствующие им m-системы. В итоге возникает видовая и даже штаммовая специфичность систем r-m. В связи с этим, пометив и защитив ДНК вируса, бактериальная клетка разрешает размножаться только «своим» вирусам и запрещает реплицироваться «чужим», которые перед этим размножались в других штаммах или видах бактерий.

Целый ряд вирусов бактерий научился сам преодолевать г-систему клетки хозяина за счет приобретения фаговой ДНК хозяйских генов, кодирующих специфические метилазы, и таким образом гарантировать себе получение полноценного потомства. Примером такой приспособляемости бактериофагов является фаг Т2 (*Myoviridae*). Паразитизм и высокая приспособляемость бактериофагов могут идти еще дальше. Некоторые фаги (λ, Р1 – *Syphoviridae*) приобрели себе не только т-систему, но и собственные системы рестрикции. При попадании таких фагов в клетку фагоспецифические рестриктазы могут воздействовать на клеточную ДНК, обеспечивая первый этап вирусной инфекции — подавление функции генома клетки хозяина.

8.7 Введение фаговой нуклеиновой кислоты в бактериальную клетку

Особенности строения бактериальных клеток, имеющих устойчивую к воздействию факторов внешней среды и относительно жесткую клеточную стенку, определяют существование ряда отличительных механизмов введения нуклеиновой кислоты бактериофага в клетку хозяина. Остановимся на двух примерах.

1 Введение ДНК в клетку хозяина фагами с сократительным хвостовым отростком происходит с использованием ***«шприцевого»*** механизма. Адсорбция фага на клеточной поверхности и введение нуклеиновой кислоты в клетку представляют собой многоступенчатый энергозависимый процесс, в котором участвуют три структурно и функционально разделенные системы: сенсорная (включает длинные и короткие хвостовые фибриллы), сократительная (хвостовой чехол) и проводящая (хво-

стовой стержень).

Введение ДНК в клетку хозяина включает несколько этапов:

- обратимое связывание длинных фибрилл бактериофага с липополисахаридами клеточной стенки бактерии, сопровождающееся их сгибанием и реорганизацией базальной пластинки, что приводит к контакту коротких фибрилл с клеточной поверхностью;
- необратимое связывание коротких фибрилл бактериофага с липополисахарид-белковым комплексом бактериальной стенки;
- перестройка базальной пластинки, приводящая к энергозависимому сокращению хвостового чехла (каждая молекула белка хвостового чехла содержит 1 молекулу ГТФ, гидролиз которой обеспечивает энергией процесс сокращения);
- сокращение хвостового чехла приводит к экспонированию хвостового стержня, который своим дистальным концом остается связанным с базальной пластинкой, обусловливающей точечный лизис клеточной стенки;
- хвостовой стержень проходит через клеточную стенку, проникает в периплазму и достигает цитоплазматической мембраны, ДНК фага из головки по полому стержню поступает в периплазму и через цитоплазматическую мембрану транспортируется в клетку. Строгая специфичность взаимодействия сенсорных систем вируса с клеткой и скоординированность структурных перестроек его специализированных компонентов обеспечивает фагу Т4 самую высокую эффективность заражения среди всех известных вирусов.

2 Введение РНК бактериофага φ6 (*Cystovirus*) в клетку хозяина – фитопатогенной псевдомонады *Pseudomonas pseudoalcaligenes* – представляет собой не менее уникальный механизм. Он включает целый ряд уже известных стадий: слияние мембран, лизис пептидогликана клеточной стенки, эндоцитоз и прямую пенетрацию.

Схематично этот процесс выглядит следующим образом: оболочечный вирус адсорбируется на клеточных рецепторах с использованием шипов, образованных прикрепительным белком Р3, которые при этом сокращаются. Сокращение Р3 позволяет белку слияния Р6 войти в контакт с клеточной поверхностью. Слияние Р6 с

поверхностью псевдомонады активирует литический фермент P5, входящий в состав нуклеокапсида. Фермент P5 осуществляет разрушение пептидогликана клеточной стенки. В результате этого нуклеокапсид приходит в контакт с цитоплазматической мембраной. Нуклеокапсид проникает через цитоплазматическую мембрану по механизму эндоцитоза, покидая эндосому путем прямой пенетрации с потерей основных белков нуклеокапсида P8 и P5. В цитоплазму выходит полимеразный комплекс, ассоциированный с тремя сегментами днРНК.

8.8 Типы взаимодействия фагов с бактериями

На основании особенностей жизненного цикла бактериофаги разделяют на две группы:

1) ***вирулентные бактериофаги*** — фаги, жизненный цикл которых завершается лизисом клетки хозяина и выходом зрелых фаговых частиц;

2) ***умеренные или лизогенизирующие бактериофаги*** — фаги, способные после проникновения в бактериальную клетку переходить в состояние профага и длительное время реплицироваться совместно с бактериальным геномом, передаваясь очередному поколению бактерий.

Существуют два основных типа взаимодействия фагов с бактериями – ***продуктивный*** и ***лизогенный***, осуществляемый, соответственно, вирулентными и умеренными фагами.

Продуктивный тип взаимодействия. После проникновения нуклеиновой кислоты фага в клетку начинается экспрессия фаговых генов, при этом используется синтетический аппарат клетки-хозяина. В первую очередь синтезируются белки, регулирующие работу фагового генома, ферменты, участвующие в синтезе фаговых нуклеиновых кислот. Затем реплицируется геномная нуклеиновая кислота фага и синтезируются структурные белки фагового капсида. Механизм репликации фагового генома зависит от его вида и в общих чертах подчиняется принципам, изложенным в разделе «Репликация вирусных геномов». На последнем этапе происходит сборка фаговых зрелых частиц.

Продуктивный тип взаимодействия сопровождается наработкой зрелого вирусного потомства и может завершаться двумя исходами – лизисом клетки и внезапным выходом в среду вновь образовавшихся вирионов (литический тип взаимодействия) или секрецией вирионов в среду, не сопровождающейся разрушением клетки хозяина (секреторный тип взаимодействия).

При литическом типе взаимодействия к моменту завершения сборки фаговых частиц нарабатываются особые, так называемые, киллерные белки, которые убивают бактериальную клетку, останавливая все метаболические процессы и разрушая клеточную стенку. Зрелые фаговые частицы выходят во внешнюю среду не в результате механического разрушения бактериальной клетки, а в результате лизиса изнутри. Каждая из этих частиц способна инфицировать чувствительную бактериальную клетку и повторить вышеописанный цикл развития.

Уникальное завершение жизненного цикла наблюдается у иновирусов (фаги *E. coli* f1, M13). Зрелые нитевидные частицы этих фагов секретируются из зараженной клетки без лизиса последней. Иновирусы инфицируют только мужские клетки, так как адсорбируются на кончиках F-пилей. В процессе морфогенеза фаговые белки концентрируются на внутренней поверхности клеточной мембраны, зрелые молекулы ДНК проходят через мембрану, захватывая капсидный белок, и секретируются в среду. Иновирусы выделены из E. coli (фаги f1, fd, M13), *Salmonella* (фаги if1, if2), *Pseudomonas* (фаги Pf1, Pf3), *Xanthomonas* (бактериофаг Xf), *Vibrio* (бактериофаг v6).

Особый интерес представляет фаг M13. Существование этого вируса в двух формах – репликативной (в форме плазмиды) и секреторной (инкапсидированная однонитевая кольцевая ДНК) делают его удобным инструментом молекулярно-генетических исследований. Путем различных модификаций генома фага M13 сконструирован целый ряд удобных векторов клонирования на основе репликативной формы. Секретируемая одноцепочечная рекомбинантная молекула ДНК широко применяется при определении нуклеотидных последовательностей клонированных фрагментов ДНК.

Лизогенный тип взаимодействия. У умеренных бактериофагов первые две стадии жизненного цикла совпадают со стадиями жизненного цикла вирулентных

фагов. После введения нуклеиновой кислоты в клетку хозяина умеренные фаги способны в дальнейшем либо пойти по литическому пути, аналогично вирулентному фагу, либо перейти в особое состояние, получившее название «профаг». При этом генетический материал фага интегрирует в бактериальную хромосому или переходит в плазмидоподобное состояние и реплицируется синхронно с геномом клетки. Все бактерии – потомки клетки, инфицированной умеренным фагом, содержат профаг. Такая бактериальная культура называется лизогенной. Лизогенная культура может существовать продолжительное время.

Лизогенная культура обладает следующими свойствами: она устойчива к повторной инфекции данным типом фага или фагами, близкородственными ему; всегда содержит небольшое количество зрелых фаговых частиц, о чем свидетельствует спонтанный лизис отдельных клеток в культуре.

Для системы «лизогенная бактерия – профаг» описано явление, получившее наименование индукция. При индукции профаг активизируется во всех клетках лизогенной культуры, в результате чего наблюдается продуктивный цикл развития фага, завершающийся полным лизисом клеток и выходом зрелого фагового потомства. Индукция может происходить как спонтанно, без видимых причин, так и в результате воздействия определенных факторов, получивших название индукторов. К индукторам относятся ультрафиолетовое излучение, мутагены, такие как нитрозогуанидин, акридиновые красители и ряд других.

В результате детального изучения различных типов мутантов фага λ было показано, что в *формировании и поддержании лизогенного состояния* участвует белок cI, получивший название иммунитетный репрессор. Установлено, что белок cI связывается с фаговой ДНК в районе области иммунности. В этой области на хромосомной карте фага λ, между геном N и геном CII находятся два промотора P_R (R – правый) и P_L (L – левый) с соответствующими им операторами O_R и O_L. Именно с этими операторами и связывается белок cI, выполняя регуляторную функцию белка-репрессора.

Блокирование белком cI левого оператора предотвращает синтез мРНК с гена N, а блокирование правого оператора предотвращает синтез мРНК с генов O и P.

Продукты генов N, O, P необходимы для выражения всех остальных генов фага λ, поэтому прямое действие репрессора на операторы O_R и O_L косвенным образом подавляет выражение практически всего генома.

Каждый оператор состоит из трех участков длиной 16 нуклеотидов, расположенных тандемно, и способен связывать от 1 до 3 молекул белка cI. Присоединение хотя бы одной молекулы репрессора предотвращает достижение РНК-полимеразой точки инициации транскрипции.

Существует репрессор синтеза репрессора cI, являющийся продуктом гена его. В клетке, содержащей геном фага λ, образование репрессора cI и репрессора репрессора cro являются взаимно исключающими состояниями. При лизогенизации и поддержании лизогении синтезируется репрессор cI и подавлен репрессор репрессора cro. При *литической* реакции репрессор репрессора образуется, а образование репрессора cI подавлено.

В клетке, инфицированной умеренным фагом λ, могут протекать как события, приводящие к лизогенизации, так и события, приводящие к продуктивному развитию фага. Выбор определяется соотношением уровня синтеза репрессора cI и уровня синтеза продукта гена его. Так, суперинфицирование нормальным фагом лизогенных клеток, содержащих продукт его, всегда приводит к литической реакции, а суперинфицирование нормальным фагом лизогенной клетки, содержащей репрессор cI, никогда не приводит к литическому ответу.

Кроме продуктов генов cI, cII, cIII, cro, промоторных и операторных участков существенную роль в процессах регуляции выражения генома фага λ играют гены N, O, P, Q.

Продукт гена N осуществляет позитивный контроль транскрипции всех остальных генов фага λ. При индукции профага, дефектного по гену N, с промотора P_L транскрибируется только сам ген N, а с промотора P_R – только ген его. При наличии продукта гена N с обоих промоторов транскрибируются длинные полигенные мРНК. Действие продукта гена N является примером аттенуаторного контроля (*аттенуация* – регуляция транскрипции на уровне терминации). Аттенуаторные участки закодированы в ДНК фага λ между генами N и CIII, между генами его и CII, а

также между генами P и Q. Именно в этих точках обрывается синтез мРНК при отсутствии продукта гена N.

Под контролем группы генов C, генов его и N находится выражение, так называемых, *ранних белков*, участвующих в рекомбинации фаговой ДНК (int, xis, red, rex), регуляторных белков (cI, cII, cIII, cro, N), белков, участвующих в репликации фаговой хромосомы (C, P). Ни один из этих белков не относится к компонентам зрелой фаговой частицы.

Структурные компоненты фага кодируются поздними генами, расположенными справа от гена Q. Их выражение начинается после того, как пройдет 1/3 латентного периода. Выражение поздних генов находится под позитивным контролем продуктов генов O, P, Q. Поздние гены транскрибируются в виде единой полигенной мРНК. При отсутствии продуктов генов O и P фаговая ДНК не реплицируется и не синтезируются продукты поздних генов.

Трансдукция. При изучении бактериофагов было открыто явление, получившее название *трансдукция* – перенос фагом генов бактерии-хозяина от клетки к клетке. Различают специфическую и неспецифическую (общую) трансдукцию.

Специфическая трансдукция впервые описана Ледербергом и его сотрудниками на примере колифага λ.. Они проводили заражение различных типов ауксотрофных мутантов штамма E. coli K12 фагом λ, выращенном на исходном прототрофном штамме K12. Чтобы проверить, не передались ли с помощью бактериофага ауксотрофам гены штамма дикого типа, культуры высевали на селективные среды. Результаты были в основном отрицательные, ни один из признаков донора не передавался фагом λ лизогенизированным реципиентам. Было лишь одно исключение – бактерии gal^- (не способные утилизировать галактозу) с вероятностью 10^{-6} приобретали от донорского штамма признак gal^+. Таким образом, было установлено, что фаг λ способен переносить (трансдуцировать) гены, но трансдукция носит специфический характер и ограничивается только генами gal, так как ДНК фага λ интегрирует в бактериальную хромосому в непосредственной близости от гена gal. С определенной вероятностью при выщеплении профага λ из состава бактериальной хромосомы происходит ошибка, и наряду с генами фага выходит область gal-гена E. coli, а часть

фаговых генов остается в хромосоме. Трансдуцирующий фаг λ (λ gal) является дефектным. От 1/4 до 1/3 его генома замещается на область gal бактериальной хромосомы. Такие фаги не способны к вегетативному размножению, не образуют негативных колоний на газоне чувствительных бактерий. Однако при попадании в клетку хозяина, они делают ее устойчивой к повторной инфекции фагом λ. Дефектный фаг размножается и дает структурно полноценное потомство только при наличии фага-помощника (нормального фага λ, присутствующего в клетке-хозяине одновременно с дефектным). Такое возможно при одновременном инфицировании бактерии, как дефектным по гену gal, так и нормальным, диким фагом λ.

Неспецифическая (общая) трансдукция была описана Ледербергом и Татумом несколько раньше, чем специфическая. Это явление было открыто неожиданно, при попытке изучить половой процесс у *Salmonella typhimurium*. Для этого был использован метод, ранее позволивший продемонстрировать коньюгацию у *E. coli*. На синтетическую среду, содержащую только соли и углевод как источник углерода и энергии и не содержащую аминокислот, высевали смесь двух ауксотрофных мутантов S. typhimurium. Один из них нуждался для роста в фенилаланине, триптофане, тирозине (Phe^-, Trp^-, Tyr^-), другой — в метионине и гистидине (Met^-, His^-). Одна из 100 000 колоний образовывала прототрофные колонии. Они являлись результатом генетической рекомбинации этих двух штаммов, в котором объединились аллели дикого типа Phe^+, Trp^+, Tyr^+ от одного штамма и Met^+, His^+ – от другого. Был сделан вывод, что у *Salmonella*, как и у *Escherichia*, может происходить генетический обмен, в результате которого образуются рекомбинанты с генетическими признаками разных предков. Однако, в отличие от E. coli, Для образования рекомбинантов у сальмонелл не требуется контакта между родительскими клетками. Обмен генов происходил за счет фага P22, который содержался в одном из родительских штаммов в форме профага.

Фаг P22 способен трансдуцировать любой ген *Salmonella*. Такой вариант трансдукции получил наименование «общая», «неспецифическая». Было выяснено, что частота трансдукции для всех генов приблизительно одинакова и невысока – 10^{-5}. Одновременно несколько признаков (генов), как правило, не передаются. Ис-

ключение составляют тесно сцепленные гены (расположенные рядом на хромосоме). Величина трансдуцируемого фрагмента ДНК ограничена объемом фаговой головки. Фаговая частица, осуществляющая общую трансдукцию и содержащая только бактериальную ДНК, не способна к вегетативному размножению и не «иммунизирует» клетку хозяина. Такие частицы возникают в результате ошибок при упаковке ДНК в фаговые капсиды.

Фаги, подобные P22, были выделены также и для *E. coli*, в частности фаг P1. В экспериментах по общей трансдукции генов *E. coli* фагом P1 была подтверждена правильность построения генетических карт хромосомы E. coli, уточнены расстояния между генами, созданы карты тонкой структуры генома.

При трансдукции фаги изменяют свойства бактериальной клетки, привнося в нее генетическую информацию (фрагмент хромосомы) от предыдущей клетки-хозяина. Однако и сам «дикий» не дефектный профаг при лизогенизации клетки, делая ее «иммунной», может сообщать ей новые признаки. Такое явление получило название «фаговая конверсия». Например, *E. coli* после лизогенизации фагом λ приобретает устойчивость к ряду мутантов вирулентных Т-четных фагов.

Наличие профага P1 в клетке *E. coli* делает ее устойчивой к инфицированию неродственным фагом λ. Фаг λ способен адсорбироваться на лизогенизированных клетках E. coli и инъецировать в них свою ДНК. Затем эта ДНК подвергается рестрикции (разрезанию на несколько фрагментов) за счет эндонуклеазы, кодируемой профагом P1, после чего внутриклеточное развитие фага λ прекращается.

Наиболее ярким примером лизогенной конверсии служит образование дифтерийного токсина у *Corynebacterium diphtheriae*. После обработки нетоксигенных штаммов коринобактерий умеренными дифтерийными фагами среди выживших бактерий можно выделить токсигенные штаммы. При этом существует четкое соответствие между токсигенностью и лизогенностью. Однако, в отличие от системы *E. coli* – фаг λ, где конверсия проявляется в состоянии профага, образование дифтерийного токсина происходит только после индукции профага, в период внутриклеточного вегетативного развития фага. Таким образом, дифтерийный токсин является побочным продуктом вегетативного развития фага.

8.9 Фаговые векторы

Генетические исследования фаговых геномов, построение их точных генетических карт, позволили разработать на основе фаговых ДНК векторные системы для решения генно-инженерных задач. Особенно удачный вектор был сконструирован на основе колифага λ.

Фаг λ – умеренный колифаг с длинным несократительным хвостовым отростком и днДНК геномом размером 48 502 п.н. Центральная часть генома фага несущественна для его функционирования и используется для заместительной вставки клонируемой ДНК по единственному сайту узнавания для рестриктазы EcoRI. Сам по себе этот вектор короток для упаковки в головку фага (размеры головки накладывают ограничение не только на максимальную, но и на минимальную длину генома). Таким образом, чтобы получить фаг, способный размножаться с образованием зрелых фаговых частиц, в разрезанный родительский вектор должен быть непременно встроен фрагмент чужеродной ДНК. Это приводит к образованию автоматической селективной системы для отбора химерных фаговых геномов. Для удобства отбора рекомбинантных фагов в несущественную область генома, используемую для вставки, введен ген lacZ. Рекомбинантные фаги отбирают из зон лизиса бактериального газона, имеющих белый цвет.

Фаг M13 – нитевидный колифаг, имеющий кольцевой онДНК-геном. Для получения рекомбинантных ДНК используют репликативную форму фага, представляющую собой кольцевую двухнитевую ДНК размером 6400 п.н., в которую вставлен ген lacZ, содержащий полилинкер сайтов для целого ряда рестриктаз. Рекомбинантные фаги отбирают из зон лизиса бактериального газона, имеющих белый цвет. Использование векторов на основе фага M13 имеет ряд положительных моментов. Так, одно клонирование дает два вида фагов с однонитевым ДНК-геномом. Каждый вид фага содержит только одну из нитей вставки ДНК, которые могут находиться в разных ориентациях. В связи с этим, клонирование с использованием фага M13 удобно для создания однонитевых ДНК-зондов и секвенирования ДНК.

Попытка объединить преимущества плазмидных и фаговых векторов привела

к созданию ***космид***. Это плазмиды со встроенными специфическими последовательностями ДНК (cos — сайтами), отвечающими за Упаковку ДНК фага λ в фаговой частице. Такие векторы могут существовать в бактерии в виде плазмид, но могут быть выделены в чистом виде путем их упаковки в фаговые частицы in vitro. Ценность космидных векторов заключается в их большой емкости — то есть в возможности клонирования вставок большого размера. На длину этих векторов также накладываются ограничения, обусловленные размером головки фага, но в таком геноме не обязательно присутствие генов, необходимых для литического цикла.

8.10 Лечебные препараты бактериофагов

Применение бактериофагов в качестве антибактериальных лечебных препаратов начато достаточно давно, ранее открытия антибиотиков.

Уступая антибиотикам в спектре антибактериальной активности, технологически, бактериофаги обладают рядом характеристик, которые позволили им сохраниться в перечне лекарственных средств до настоящего времени. В первую очередь, их отличает высокая специфичность и избирательность действия. Они поражают только один вид болезнетворных бактерий, не влияя на нормальную микрофлору человека. Бактериофаги не взаимодействуют с клетками человека, что обуславливает отсутствие противопоказаний к их применению и побочных реакций от их использования.

Бактериофаги преимущественно используются для лечения пациентов с выраженной отрицательной реакцией на антибиотики: недоношенных детей, лиц с аллергическим статусом, дисбактериозами.

В Нижегородском НИИ эпидемиологии и микробиологии совместно с сотрудниками кафедры молекулярной биологии и иммунологии ННГУ им. Н.И. Лобачевского и Нижегородского предприятия по производству бактерийных препаратов под руководством академика РАМН И.Н. Блохиной разработаны фаговые препараты, направленные против большинства бактериальных возбудителей острых кишечных и гнойно-воспалительных инфекций: дизентерийный, сальмонеллезный, колипро-

тейный, клебсиеллезный, стафилококковый, синегнойный бактериофаги. Все перечисленные препараты являются поливалентными, то есть способными разрушать клетки большинства вариантов соответствующего вида бактерий.

Исходно фаговые препараты представляли собой суспензию фаговых частиц в питательной среде. Благодаря разработке методов концентрирования фага были созданы новые формы – фаги в таблетках и свечах. Дальнейшее совершенствование технологий производства бактериофагов позволило увеличить активность фагов, приступить к выпуску комплексных форм, эффективных в отношении нескольких видов бактерий, расширить области применения фаговых препаратов.

9 Прионы

Прионные болезни – это группа нейродегенеративных заболеваний человека и животных. Клиническая феноменология большинства из них известна давно, в то время как концепция их этиологии разработана около 20 лет назад, когда был введен термин "прион" и обнаружен прионный белок (PrP). У человека известны 4 болезни, вызываемые прионами, которые манифестируют в виде инфекционных, спорадических и наследственных форм.

Куру, регистрируемый в одном из племен Папуа Новой Гвинеи, возникает в результате употребления в пищу мозга умерших соплеменников во время ритуального каннибализма. *Болезнь Крейтцфельдта-Якоба* (БКЯ) возникает первично как спорадическое заболевание. Однако существует и ятрогенная БКЯ, развивающаяся в результате случайного инфицирования. Семейная БКЯ, *синдром Герстманна-Штреусслера-Шейнкера* (СГШШ) и *фатальная семейная инсомния* (ФСИ) являются доминантно наследуемыми прионными болезнями, связанными с мутациями прионного гена.

В последние годы интерес к прионным болезням резко возрос в связи с эпидемией трансмиссивной спонгиоформной энцефалопатии коров ("бешенство коров") в Англии, возбудителем которой является прион. Зарегистрированы 52 спорадических

заболевания новым вариантом БКЯ, в основном в Англии. Его дебют отмечался в молодом возрасте, что нетипично для этого заболевания, а при патогистологическом исследовании мозга умерших больных были выявлены изменения, сходные с таковыми при спонгиоформной энцефалопатии коров. Это дало основание предположить о возможности заражения людей через продукты, производимые из мяса этих животных. Предположение подтвердилось, когда была установлена идентичность линий прионов, выделенных от больных, с новым вариантом БКЯ, и от коров с трансмиссивной спонгиоформной энцефалопатией.

9.1 Прионы – новый класс возбудителей инфекций

Установлено, что прионы являются мелкими белковыми инфекционными частицами, устойчивыми к ферментативной инактивации. Прогресс в понимании природы прионных болезней у человека связан с изучением возможности их передачи у животных и с выделением прионного белка в результате молекулярного клонирования его гена, который картирован на коротком плече 20-й хромосомы и обозначается PRNP, а также с созданием трансгенных мышей, экспрессирующих мутировавший PRNP.

Прионный белок в очищенных прионных препаратах скрепи обозначили PrP^{Sc} в отличие от нормальной клеточной изоформы PrP^{C}. От PrP^{C} PrP^{Sc}отличается своей высокой резистентностью к действию протеаз, нерастворимостью после экстракции, способностью накапливаться во вторичных лизосомах, посттрансляционным синтезом и обогащением в процессе выделения. На основании анализа фрагмента PrP^{Sc}, резистентного к действию протеазы К, идентифицированы по меньшей мере 2 гликоформы этого белка (PrP^{res}).

Прионный белок контагиозен независимо от причин его возникновения. Это установлено экспериментальными исследованиями, когда животные заболевали при инокуляции экстракта мозга больных, умерших не только от инфекционных прионных болезней, но и от спорадических и наследственных их форм. Экспериментально прионными инфекциями было заражено 18 животных куру, 278 – различными фор-

мами БКЯ, 4 – СГШШ и несколько – ФСИ и спорадической фатальной инсомнией. При этом патологическая PrP изоформа образуется путем конформации PrP^{C} хозяина в PrP^{Sc}. Это отличает их от вирусных белков, которые кодируются вирусным геномом.

Трансмиссивные прионы состоят главным образом, если не целиком, из PrP^{Sc}. Хотя PrP^{Sc} синтезируется из клеточного PrP (PrP^{C}) в результате посттрансляционного процесса, окончательно неясно, происходит ли превращение PrP^{C} в PrP^{Sc} в результате неизвестной химической модификации либо возникает лишь вследствие конформационных изменений. В опытах с использованием мышей, дефектных по наличию PrP^{C}, показано, что чувствительность к инфекции PrP^{Sc} зависит от присутствия PrP^{C}, которое является обязательным условием развития патологического процесса, возникающего в результате инфицирования.

Исследования трансгенных мышей показали, что синтез прионов, инкубационный период при скрепи и гистопатологические изменения значительно зависят от селективного взаимодействия инокулированных прионов с PrP субстратом, синтезируемым хозяином. Считается, что биосинтез прионов является экспоненциальным процессом, в котором посттрансляционная конформация PrP^{C} или предшественника PrP^{Sc} является обязательным этапом.

Полагают, что молекула PrP^{Sc} соединяется с молекулой PrP^{C} для образования гетеродимерного промежуточного продукта, который трансформируется в 2 молекулы PrP^{Sc}. В следующем цикле каждая из 2 PrP^{Sc} молекул соединяется с PrP^{C} молекулой, давая начало 4 PrP^{Sc} молекулам. В 3-м цикле каждая из 4 молекул PrP^{Sc} связывается с молекулой PrP^{Sc}, давая начало 8 молекулам PrP^{Sc}, что и обеспечивает экспоненциальный рост.

Положение о том, что синтез PrP^{Sc} – посттрансляционный процесс, подтверждается результатами изучения меченых скрепи-инфицированных клеточных культур. Показано, что PrP^{C} синтезируется и распадается быстро, в то время как PrP^{Sc} синтезируется медленно в результате еще окончательно неидентифицированного посттрансляционного процесса.

Эти наблюдения соответствуют ранее полученным данным, показавшим, что

PrP^{Sc} накапливается в мозгу инфицированных вирусом скрепи животных, в то время как уровень PrP мРНК остается неизменным. Кроме того, структура и организация PRNP таковы, что наиболее вероятно образование PrP^{Sc} в результате посттрансляционного процесса.

Появляясь, обе PrP изоформы проходят через аппарат Гольджи, где их Asn-связанные олигосахариды модифицируются. PrP^{C} в основном транспортируется секреторными пузырьками к наружной поверхности клетки, где оседает, связываясь с гликозилфосфатидилинозитолом. В отличие от PrP^{C} PrP^{Sc} накапливается первично в пределах клетки, где откладывается в цитоплазматических пузырьках, многие из которых являются вторичными лизосомами. В последующем PrP^{Sc} высвобождается во внеклеточное пространство и откладывается в амилоидных бляшках.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что прионные болезни возникают в результате накопления PrP^{Sc}, а не подавления функции PrP^{C}. Механизмы взаимодействия PrP^{Sc} и нейрона недостаточно изучены. Имеются данные о том, что события, связанные с реализацией функции как PrP^{C}, так и PrP^{Sc}, очевидно, происходят в мембране.

Так, при изучении свободной клеточной трансляции выявлено 2 формы PrP^{C}: трансмембранной и секреторной. Видимо, мембранозависимые процессы важны для синтеза PrP^{Sc}, так как брефелдин А, селективно разрушающий вещества, депонированные в аппарате Гольджи, препятствует синтезу PrP^{Sc} в инфицированных скрепи культурах клеток.

В действительности связь инфекционности скрепи с мембранными фракциями известна довольно давно. Считается, что гидрофобные взаимодействия определяют многие физические свойства, проявляемые инфекционными прионными частицами. В последние годы получены данные о том, что в реализации взаимодействия PrP^{Sc} и нейрона имеют значение экзайтотоксические механизмы.

9.2 Классификация прионных болезней

Таблица 5 – Классификация прионных заболеваний

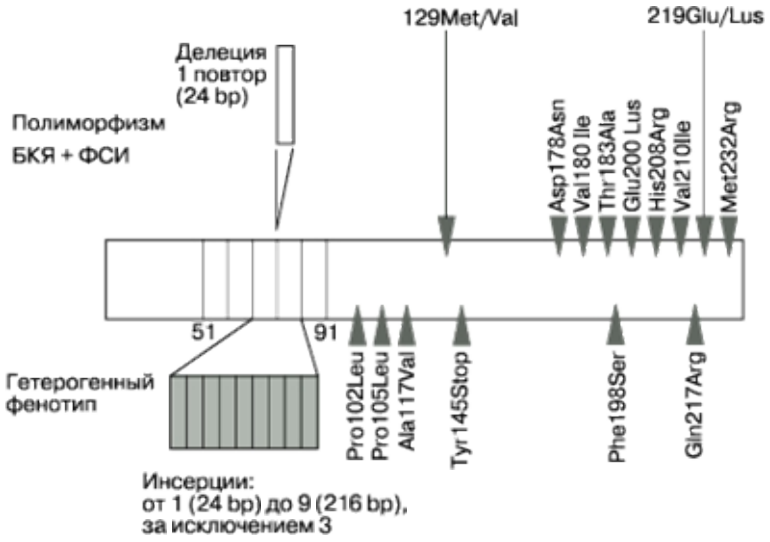
Заболевание	Носитель	Название приона	PrP изоформа
Скрейпи	овцы и козы	Прион скрейпи	$OvPrP^{Sc}$
Трансмиссивная энцефаломиопатия норок (ТЭН)	Норки	Прион ТЭН	$MkPrP^{Sc}$
Chronic wasting disease (CWD)	Олени	CWD прион	$MDePrP^{Sc}$
Губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота (ГЭКРС)	Коровы	Прион ГЭКРС	$BovPrP^{Sc}$
Губчатая энцефалопатия кошачьих (ГЭК)	Кошки	Прион ГЭК	$FePrP^{Sc}$
Куру	Люди	Прион куру	$HuPrP^{Sc}$
Болезнь Крейцфельда-Якоба (БКЯ)	Люди	Прион БКЯ	$HuPrP^{Sc}$
Синдром Герстманна—Штройслера—Шейнкера (GSS)	Люди	GSS прион	$HuPrP^{Sc}$
Хроническая семейная бессониица (ХСБ)	Люди	Прион ХСБ	$HuPrP^{Sc}$

Куру, ятрогенная форма и новый вариант БКЯ манифестируют как инфекции. Семейные формы БКЯ, СГШШ и ФСИ начинаются как наследственные болезни. Эти две группы заболеваний составляют не более 10 % от числа всех наблюдений прионных болезней. Основная масса больных (90 %) регистрируется как спорадическая форма БКЯ с частотой 1:1 000 000 в популяции.

9.3 Генетика прионных болезней

Всего обнаружено более 20 мутаций PRNP, достоверно связанных с наследственными прионными болезнями. Точечные мутации в кодонах 178, 180, 183, 200, 208, 210 и 232, а также 8-членные аминокислотные повторы в кодонах 51 – 91 связаны с семейной БКЯ, точечные мутации в кодонах 102, 105, 117, 145, 198 и 217 – с синдромом СГШШ, в кодоне 178 – с ФСИ (рисунок 41).

Описанные мутации предположительно вызывают конформационные превращения PrP^{C} белка. При спорадической БКЯ не обнаружено специфических мутаций PrP. Генетический полиморфизм в кодоне 129, кодирующем метионин и валин, может влиять на восприимчивость к инфекционным прионным болезням.



bp – пара оснований, Ala – аланин; Arg – аргинин; Asn – аспарагин; Asp – аспартатовая кислота; Gln – глицин; Glu – глютамат; His – гистидин; Ile – изолейцин; Leu – лейцин; Lys – лизин; Met – метионин; Phe – фенилаланин; Pro – пролин; Ser – серин; Thr – триптофан; Tyr – тирозин; Val – Валин; БКЯ – Болезнь Крейтцфельдта-Якоба; ФСИ – фатальная семейная инсомния; СГШШ – Синдром Герстманна-Штреусслера-Шейнкера. Открытая рамка считывания гена (кодирующий участок) обозначена в виде прямоугольника. Над ним показан полиморфизм нормального гена по кодонам 129 и 219. Отмечены точечные мутации, характерные для наследственных форм прионных болезней человека (БКЯ и ФСИ вверху и СГШШ – внизу), инсерции и делеции.

Рисунок 27 – Ген прионного белка человека – мутации и полиморфизм

Так, у части больных с ятрогенной БКЯ, возникшей в результате заражения через экстракт гормона роста, была выявлена гомозиготность по валину в кодоне 129 PrP, в то время как при заражении в результате пересадки твердой мозговой оболочки выявляется гомозиготность как по валину, так и по метионину. С другой стороны, гомозиготность по этому кодону связана с более ранним началом наследственных форм БКЯ. Полиморфизм кодона 129 влияет на фенотипические особенности всех семейных форм прионных болезней.

9.4 Морфология прионов

Результаты патоморфологического исследования мозга больных, погибших от прионных болезней, показали черты сходства и различия. Макроскопически определяется атрофия головного мозга, особенно значительная при БКЯ, степень которой влияет на продолжительность выживания. Гистологически выявляются спонгиоформная дегенерация, атрофия и утрата нервных клеток, астроцитарный глиоз, амилоидные бляшки, содержащие прионный белок, а также отсутствие воспалительных реакций.

При БКЯ указанные изменения регистрируются в коре головного мозга, стриатуме, таламусе, молекулярном слое мозжечка и верхней части ствола мозга, причем амилоидные бляшки обнаруживались от 5 % до 10 % случаев.

Новый вариант БКЯ характеризуется:

– амилоидными бляшками, окруженными вакуолями;

– спонгиоформными изменениями, больше проявляющимися в базальных ганглиях;

– выраженным таламическим астроглиозом;

– скоплением прионного белка, включая внутриклеточные отложения в церебральной и мозжечковой коре, особенно в молекулярном слое.

Патоморфологический диагноз СГШШ основывается на выявлении характерных амилоидных бляшек, дегенерации белых проводниковых систем, преимущественно спиноцеребеллярных трактов, и утраты нейронов по всему мозгу. При этом с разной частотой и степенью выраженности могут присоединяться спонгиоформные изменения и глиоз. Амилоидные бляшки при СГШШ чаще обнаруживаются в мозжечке.

При ФСИ отмечаются атрофия переднего и медиодорсального ядер таламуса, олив, различная степень глиоза церебральной и мозжечковой коры, отсутствие бляшек, нерезко выраженные спонгиоформные изменения.

Патоморфологические диагностические критерии для трансмиссивных спонгиоформных энцефалопатий человека унифицированы. При БКЯ (спорадической,

ятрогенной или семейной) наблюдается спонгиоформная энцефалопатия в коре головного мозга и коре мозжечка и подкорковом сером веществе, а также и/или энцефалопатия с PrP иммунореактивностью, при СГШШ – энцефало(миело)патия с мультицентрическими PrP бляшками, при ФСИ – дегенерация таламуса, различные спонгиоформные изменения в головном мозге.

Следует отметить, что ткани погибших от прионных болезней остаются контагиозными даже после их фиксации формалином.

Болезнь Крейтцфельдта-Якоба

Продромальные симптомы БКЯ, самой распространенной из указанной группы болезней, неспецифичны и возникают примерно у 30 % больных. Они появляются за недели и месяцы до возникновения первых признаков деменции и включают астению, нарушения сна и аппетита, внимания, памяти и мышления, снижение массы тела, потерю либидо, изменение поведения.

Для первых признаков заболевания обычно характерны зрительные нарушения, головные боли, головокружение, неустойчивость и парестезии. У основной части больных постепенно развивается БКЯ, реже – острый или подострый дебют. Обычно болезнь начинается в возрасте 50-65 лет. Несколько чаще болеют мужчины.

Клинической тетрадой БКЯ являются подострая прогрессирующая деменция, миоклонии, типичные периодические комплексы на *электроэнцефалограмме* (ЭЭГ) и нормальный ликвор. Наряду с этим наблюдаются мозжечковые симптомы, расстройство зрительного восприятия, надъядерные глазодвигательные нарушения, а в далеко зашедших стадиях – припадки, экстрапирамидные и пирамидные нарушения, переднероговые симптомы. Большинство больных погибает в первый год болезни, редко – в течение 2 лет и позже.

Новый вариант БКЯ характеризуется более ранним, чем обычно, началом. Возраст больных колеблется от 16 до 40 лет. Между тем классическая БКЯ очень редка в возрасте до 40 лет – не чаще 2-3 %. Клинически при новом варианте БКЯ в дебюте отмечаются психические нарушения в виде тревоги, депрессии, изменений поведения, реже – дизестезии лица и конечностей. Спустя недели и месяцы присоединяются неврологические нарушения, в основном мозжечковые. На поздних этапах

болезни отмечаются нарушения памяти, деменция, миоклонии или хорея, реже – пирамидные симптомы. На ЭЭГ отсутствуют характерные для БКЯ изменения.

До недавнего времени кроме биопсии мозга с последующим исследованием биоптата на наличие прионного белка не существовало специфической диагностики БКЯ. Однако в последние годы для этих целей используется биопсия глоточной миндалины. Имеются сообщения о диагностике БКЯ с помощью моноклональных антител.

Наибольшее диагностическое значение из других методов исследования имеет ЭЭГ, при которой выявляется повторяющаяся трифазная и полифазная активность длительностью менее 200 мкВ, возникающая каждые 1-2 с. При компьютерной томографии головного мозга может определяться корковая атрофия. При магнитно-резонансной томографии иногда выявляются гиперинтенсивные сигналы в проекции базальных ганглиев или таламуса, при позитронной эмиссионной спектроскопии – региональное снижение метаболизма глюкозы, коррелирующее с патоморфологическими изменениями. Определенное диагностическое значение имеет обнаружение в ликворе больных БКЯ патологических белков 26 и 29 кDA и нейрональной специфической энолазы, особенно белка 14-3-3. Причем последний рассматривается в качестве маркера прионных болезней.

С целью прижизненной диагностики БКЯ и других прионных болезней человека и животных в России используется оригинальный метод индикации изменений в перевиваемых клетках нейроглии, вызываемых PrP^{Sc}, а также исследование антител к нейрофиламентам.

Клинический диагноз БКЯ обычно основывается на наличии следующих симптомов: деменции, миоклонуса и периодических электрических всплесков на ЭЭГ у нелихорадящего 60-летнего больного. Наличие лихорадки, повышения СОЭ, лейкоцитоз в крови или плеоцитоз в ликворе должны настораживать врача в отношении иной этиологии заболевания центральной нервной системы.

Обращают на себя внимание клинические и патоморфологические особенности при семейной БКЯ, связанные с характером мутации. Так, при мутации в кодоне 178 происходит замена аспартата на аспарагин, что клинически характеризуется

ранним началом болезни, относительно длительным течением (до 2 лет), нарушением памяти на ранних этапах патологического процесса, миоклонусом, отсутствием типичных изменений на ЭЭГ.

В случаях мутации в кодоне 200 (замена глютаминовой кислоты на лизин) клинически отмечается схожесть со спорадической БКЯ, но при морфологическом исследовании редко выявляются амилоидные бляшки. При 8-членных аминокислотных повторах отмечаются раннее начало (25-35 лет), асоциальное поведение, нарушения речи, координации движений и когнитивных функций, редко миоклонус и изменения на ЭЭГ. С увеличением числа повторов нарастает тяжесть клинических и морфологических изменений (при вставке с 10-11 повторами нарушения минимальны, при 12 повторах картина напоминает спорадическую БКЯ, при 13 и 14 повторах она сходна с СГШШ).

В документированных наблюдениях случайной передачи БКЯ инкубационный период составлял 1,5-2 года. Однако при передаче болезни через зараженные инструменты и при пересадке тканей инкубационный период может длиться до 10 лет. Причем БКЯ в этих случаях манифестирует в первую очередь нарушениями интеллекта.

Ятрогенная БКЯ, приобретенная при лечении экстрактами тканей, содержащими гормон роста и гонадотропин, проявляется мозжечковыми симптомами с более продолжительным инкубационным периодом – 5-17 лет (границы разброса – 4-30 лет).

В последние годы диагностика БКЯ унифицирована. В соответствии с этим выделяют достоверную, вероятную и возможную БКЯ.

Достоверный диагноз БКЯ устанавливается с помощью стандартных патоморфологических методов и в соответствующих лабораториях с помощью дополнительных методов (PrP иммунохимические методы, западный блоттинг и/или выявление скрепиассоциированных фибрилл). Остальные случаи БКЯ трактуются как вероятные или возможные.

Вероятный диагноз спорадической БКЯ основывается на прогрессирующей деменции и типичных изменениях на ЭЭГ, а также на наличии 2 из следующих кли-

нических признаков: миоклонуса, зрительных или мозжечковых нарушений (атаксии), пирамидных или экстрапирамидных нарушений, акинетического мутизма.

При *возможной* БКЯ имеются те же критерии, что и при вероятном БКЯ, но при отсутствии изменений на ЭЭГ и при длительности болезни менее 2 лет.

Приобретенная БКЯ регистрируется при прогрессирующем мозжечковом синдроме у больного, получавшего гормоны гипофиза, а также при спорадической БКЯ, если в анамнезе имелись ситуации риска возникновения болезни, например, при трансплантации твердой мозговой оболочки или роговицы.

Семейная форма БКЯ регистрируется в случае достоверного или возможного диагноза БКЯ в сочетании с достоверным или возможным диагнозом БКЯ у ближайшего родственника, а также при нейропсихических нарушениях, сопряженных со специфическими для заболевания мутациями PrP гена, выявляемыми при исследовании лейкоцитов больных.

Синдром Герстманна-Штреусслера-Шейнкера

СГШШ описывается как семейное заболевание с аутосомно-доминантным типом наследования, в популяции регистрируется с частотой 1 случай на 10 000 000 населения. Болезнь начинается на 3-4-м десятилетии жизни и продолжается в среднем 5 лет.

Начальными симптомами СГШШ являются мозжечковые нарушения, позже присоединяется деменция, которая иногда может и не проявляться. В развернутой стадии болезни преобладают мозжечковые симптомы, но в некоторых семьях ведущими признаками могут быть экстрапирамидные нарушения, в других – параличи взора, глухота и слепота. Характерно отсутствие сухожильных рефлексов на нижних конечностях при наличии разгибательных патологических знаков. Редко наблюдаются миоклонии.

Для большинства генетических подтипов СГШШ характерна замена пролина на лейцин в кодоне 102 PrP гена. Клинически они характеризуются мозжечковой атаксией, миоклониями, афазией, аграфией, агнозией, пирамидными парезами, амиотрофиями, фасцикуляциями. Деменция развивается поздно.

Морфологически отмечаются амилоидные бляшки, негрубые спонгиоформные

изменения, атрофия проводниковых систем спинного мозга и мозгового ствола, а также подкорковых ядер. Мутация в кодоне 105 (замена пролина на лейцин) зарегистрирована в Японии. У этих больных определяются спастический парапарез, эмоциональная слабость; морфологически – амилоидные бляшки в коре головного мозга, реже в мозжечке и подкорковых ядрах, грубый глиоз.

Замена аланина на валин в кодоне 117 отмечена в одной из азиатских семей и в американской семье немецкого происхождения. Для этих семей характерно нарастание с каждым поколением выраженности психических нарушений, пирамидной недостаточности и морфологических проявлений (амилоидные бляшки, нейрональная дегенерация, умеренные спонгиоформные изменения).

В семье из Индианы (США) описана мутация в кодоне 198 (замена фенилаланина на серин), которая клинически характеризуется деменцией, атаксией, паркинсонизмом, параличом взора на ранней стадии болезни; морфологически – амилоидными бляшками, нейрофибриллярными сплетениями, легкими спонгиоформными изменениями.

Мутация в кодоне 217 (замена глютамина на аргинин) описана в шведской семье. Клинически развивалась деменция, позже – атаксия, дисфагия, спутанность сознания; морфологически – нейрофибриллярные сплетения в *neocortex*, амилоидные бляшки в церебральной и мозжечковой коре.

Фатальная семейная инсомния

ФСИ – аутосомно-доминантное заболевание, характеризующееся некурабельной прогрессирующей бессонницей, симпатической гиперактивностью (гипертензией, гипертермией, гипергидрозом, тахикардией), тремором, атаксией, гиперрефлексией, миоклониями, нарушениями внимания, памяти, дезориентацией, галлюцинациями.

Болезнь начинается в возрасте от 25 лет до 71 года. У больных нарушены циркадианные ритмы секреции мелатонина, пролактина, гормона роста, АКТГ и кортизола. У всех описанных больных (около 40) выявлена мутация в кодоне 178. Установлены 2 фенотипа ФСИ, обусловленные гаплотипом кодона 129 в нормальном аллеле (129 Met/Met или 129 Met/Val), которые отличаются по клиническим и патоло-

гоанатомическим признакам.

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что та же мутация описана и при семейной БКЯ. Два различных по фенотипу заболевания связаны с одной патогенной мутацией, которая характеризуется общим полиморфизмом в кодоне 129 (Met/Val). Это связывают с тем, что фенотипы данных заболеваний обусловлены кодоном 129 мутантного аллеля, которые в связи с мутацией Asp178Asn приводят к экспрессии PrP^{res}, отличающихся по биофизическим параметрам.

В последние годы описано 5 спорадических случаев ФСИ без мутации в кодоне 178, но с характерными для нее изменениями в головном мозге.

Куру

Куру – заболевание, сыгравшее главную роль в развитии концепции трансмиссивных спонгиоформных энцефалопатий человека.

Для куру характерны атаксия, тремор и деменция. Смерть наступает примерно через 12 мес. Однако в настоящее время это заболевание имеет скорее исторический интерес, поскольку традиции каннибализма у племен восточных высокогорий Новой Гвинеи исчезли.

9.5 Изоформы прионов

Вариабельность проявлений прионных болезней ставит вопрос о возможности существования различных линий прионов. Это предположение вытекает не только из разнообразия клинических синдромов, но и в связи с неодинаковым инкубационным периодом и различной патоморфологической картиной прионных болезней. Для объяснения этого обстоятельства предложено 2 гипотезы.

Первая утверждает, что соответствующая специфическая информация кодируется третичной и четвертичной структурами PrP^{Sc}. Поскольку в процесс размножения прионов включается образование промежуточного продукта, то есть комплекса PrP^{C}/PrP^{Sc}, было высказано предположение, что специфическая для линии (изолята) информация содержится в третичной структуре PrP^{Sc}. Однако эта гипотеза подразумевает, что число различных конформаций PrP^{Sc} ограниченно.

Альтернативная гипотеза предполагает, что различие прионов происходит из гликоформ PrP^{Sc}. Эта гипотеза более привлекательна, так как различий PrP^{Sc} гликоформ достаточно для объяснения большого числа линий прионов, и к размножению определенного изолята прионов может привести синтез молекул PrP^{Sc} в пределах ограниченной субпопуляции клеток [10]. Эта гипотеза не только подтверждается результатами ряда экспериментов, но также объясняет, как каждый прионный изолят проявляет свои специфические черты, такие, как инкубационный период, особенности патоморфологических изменений и характер накопления PrP^{Sc}.

9.6 Прионы и видовой барьер

Следует отметить, что замена аминокислот в PrP приводит не только к врожденным прионным болезням. С ними связано существование и видовых барьеров. В последние годы появились прецеденты прорыва этого барьера. Так, прионные заболевания стали регистрироваться у животных, у которых в обычных условиях эта патология не наблюдается (у содержащихся в неволе обезьян и жирафов), что связывается с их кормлением продуктами, из тканей животных – традиционных носителей патологической формы прионного белка (овцы, козы).

Теоретически и практически важный вопрос о наличии видового барьера и о возможности межвидового переноса прионных инфекций обсуждается в литературе. Указывается, что на межвидовой перенос инфекта влияют два фактора:

1) эффект вида донора, связанный с различиями в последовательностях гена PrP у двух видов – донор-реципиент;

2) штаммовые особенности приона, влияющие на легкость или сложность преодоления межвидового барьера.

Существование высокоэффективного видового барьера между крупным рогатым скотом и человеком не может исключить переноса инфекции у немногих людей.

Клиническое, гистологическое и электронно-микроскопическое изучение инфекционного процесса у норок, являющихся природным хозяином возбудителя, и

инфекционного процесса, вызванного у норок заражением агентом скрепи (природный хозяин – овца), показало сходство по всем изучаемым параметрам.

Пассирование агентов трансмиссивных энцефалопатий от одного вида к другому может также непредсказуемо изменить инфекционный спектр каждого конкретного приона.

9.7 Устойчивость прионов

Прионы очень стойки к обычным методам дезинфекции. Ионизирующее, ультрафиолетовое или микроволновое излучение на них практически не действует. Дезинфекционные средства, обычно используемые в медицинской практике, действуют на них лишь в очень ограниченной мере. Надежно их ликвидируют дезинфицирующие реактивы — сильные окислители, разрушающе действующие на протеины.

Другое затруднение представляет собой стойкость прионов к высоким температурам. Даже при автоклавировании при 134 °C в течение 18 минут невозможно достичь полного разрушения прионов, и прионы «выживают» в форме, способной вызвать заражение. Стойкость к высоким температурам еще более возрастает, если прионы засохнут на поверхности металла или стекла или если образцы перед автоклавированием были подвергнуты действию формальдегида.

В Великобритании, где *новый вариант* является очень серьезной проблемой, по этим причинам уже используются одноразовые хирургические инструменты для тонзиллэктомии. В будущем напрашивается альтернативное решение: создания новых инструментов, с учётом повышенных требований к очистке и обеззараживанию. Одноразовое использование инструментов согласно принципам ВОЗ требуется в случае стоматологического обслуживания пациентов с диагностированным прионным заболеванием или в случае подозрения на него.

Намного более сложным решением этой проблемы является лечение пациентов группы риска. К ним относятся пациенты, которые подверглись операциям, при которых была использована потенциально зараженная твердая мозговая оболочка,

или пациенты из семей с наследственной формой болезни Крейтцфельдта-Якоба. ВОЗ в этом случае не требует никаких специальных мер. Британский Консультационный научный комитет по губчатой энцефалопатии в своем решении в 1998 г. счел возможным ограничиться более тщательной очисткой и обеззараживанием инструментов, в сочетании с более длительным автоклавированием.

Потенциальная опасность для человека

Несмотря на незначительное количество явных случаев прионных заболеваний у людей, многие специалисты считают, что имеется высокая степень опасности «медленных» инфекций для человека.

Имеются данные, что источником распространения могут быть стоматологические процедуры, связанные с попаданием прионов в кровяное русло.

Под подозрение попал также лецитин животного происхождения, что вызвало сокращение применения его в фармакологической промышленности, и вытеснение растительным (в основном, соевым) лецитином.

Исследования прионов дрожжей и др. микромицетов

Прион-подобные белки, поведение которых подобно поведению PrP найдены в природных популяциях микромицетов и дрожжей. Исследования прионов дрожжей подтвердили гипотезу о том, что превращение белков в приононное состояние зависит только от белков. Было показано, что прионы, экстрагированные из клеток, могут служить «семенами» образования прионов в пробирке. Одним из наиболее хорошо изученных белков, склонных к образованию прионов у дрожжей — фактор терминации трансляции (eRF3), который образует так называемые PSI+ клетки. Такие клетки имеют изменёное физиологическое состояние и изменённый уровень выражения некоторых генов, что позволило выдвинуть гипотезу о том, что у дрожжей образование прионов может играть адаптативную роль.

10 Принципы и методы диагностики вирусных инфекций

Для обнаружения и подтверждения вирусных инфекций у животных и человека в настоящее время применяют два основных принципа микробиологической диагностики (рисунок 42):

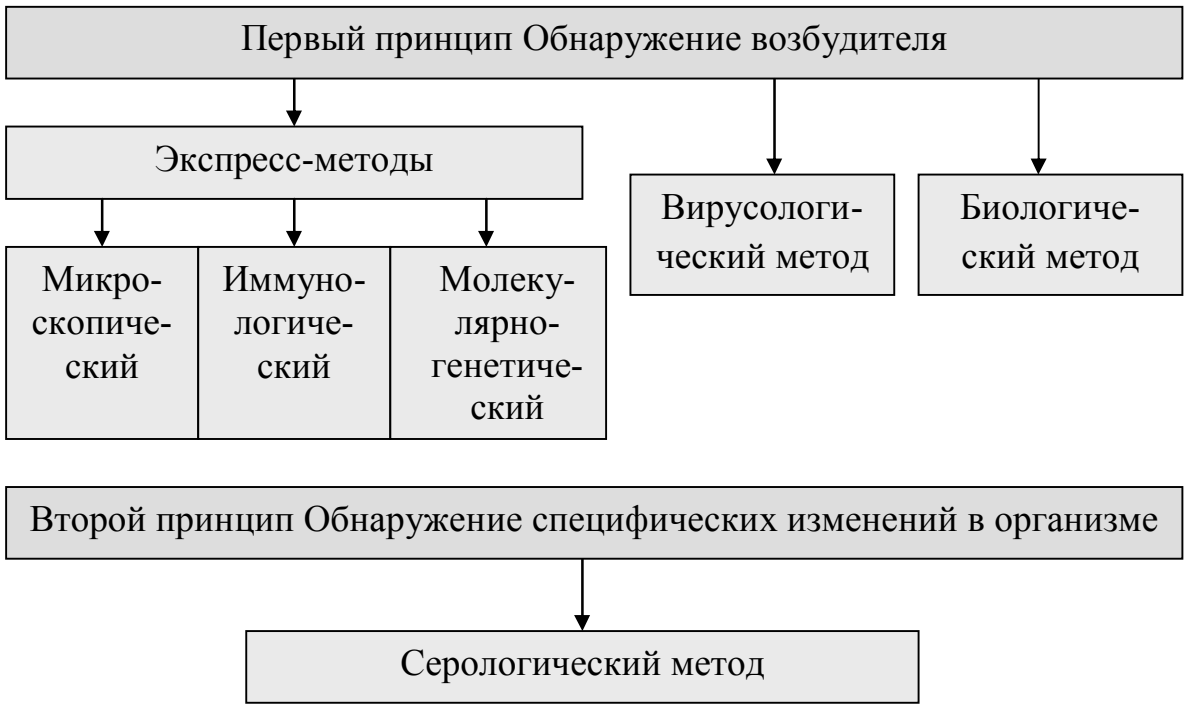


Рисунок 42 – Принципы и методы лабораторной диагностики вирусных инфекций.

– первый принцип выявления возбудителя или его компонентов (гены, антигены и др.) в исследуемом материале;

– второй принцип выявления специфических изменений в организме под воздействием возбудителя.

В первом принципе реализуются следующие методы микробиологических исследований:

1) экспресс-методы диагностики (микроскопические, иммунологические и молекулярно-генетические);

2) вирусологический метод;

3) биологический метод (биопроба).

Во втором принципе используется серологический метод исследования, основанный на выявлении специфических антител в организме обследуемого.

Выбор вышеперечисленных методов лабораторной диагностики отдельных вирусных инфекций определяется характером заболевания, клиническими особенностями течения, биологическими свойствами возбудителя, периодом болезни и возможностями лаборатории.

Взятие и подготовка материала

Для экспресс-диагностики и выделения вирусов важно взять материал у больного как можно раньше. Исследуют содержимое везикул, пустул, соскобы эпителия, спинномозговую жидкость, фекалии, мазки и смывы из верхних дыхательных путей.

Пробы для исследования нужно брать, соблюдая правила асептики, чтобы предотвратить внесение посторонней микрофлоры и не инфицировать себя. Сохраняют пробы во влажном состоянии на холоде и пересылают в контейнерах с сухим льдом. Если пробы не использованы сразу, их следует заморозить, желательно при минус 70 ºС. Такие материалы, как мазки из носоглотки и соскобы с пораженных участков кожи, погружают в стабилизирующую среду (нейтральный физиологический раствор с белком и антибиотиками). Можно использовать также питательные среды или раствор Хенкса с добавлением 10 % инактивированной коровьей сыворотки и антибиотиков (для подавления сопутствующей микрофлоры).

10.1 Экспресс-методы диагностики вирусных инфекций

10.1.1 Микроскопические методы

С помощью светового микроскопа могут быть обнаружены только крупные вирусы, размеры которых превышают 150 нм. Распознавание вирусов, имеющих меньшие размеры, возможно лишь в электронном микроскопе. Для выявления крупных вирусов может применяться световая, фазово-контрастная и люминесцентная

микроскопия.

При вирусных инфекциях в зараженных клетках развиваются своеобразные включения. Одни инфекции сопровождаются образованием включений в цитоплазме пораженных клеток (бешенство, оспенная вакцина), другие в цитоплазме и ядре (корь, натуральная и ветряная оспа, аденовирусные заболевания). Включения имеют различную природу, структуру, форму и размеры, колеблющиеся от 0,25 до 25 мкм. Согласно современным данным, при одних инфекциях включения являются местом размножения вируса и представляют собой его скопления, окруженные веществами клетки, при других – продукт дегенерации клетки.

Включения могут быть выявлены в окрашенных отпечатках органов и тканей, соскобах клеток, гистологических срезах из пораженной ткани и препаратах культур клеток, инфицированных вирусом. Окраску чаще производят по методу Романовского-Гимзы. Для окраски этим методом препараты фиксируют в смеси Дюбоска-Бразиля-Буэна, состоящей из пикриновой кислоты, формалина, спирта, уксусной кислоты. Внутриклеточные включения при большинстве вирусных инфекций являются оксифильными и красятся по методу Романовского-Гимзы в розовый или сиреневый цвета.

10.1.2 Иммунологические методы

В последнее время для экспресс-диагностики вирусных инфекций используют ряд иммунологических методов, направленных на выявление антигенов вирусов в различных видах клинического материала; их отличает высокая специфичность и чувствительность.

В последние годы эти методы стали ведущими в лабораторной диагностике вирусных инфекций. Это во многом объясняется экономическими причинами, поскольку классические методы вирусологического анализа довольно дороги. Кроме того, длительность исследований с помощью вирусологических методов (недели), даже если они оказываются вполне эффективными, делают их ретроспективными.

Иммунологические методы используют как для обнаружения вирусных анти-

генов в различных биосубстратах и объектах внешней среды, так и для серодиагностики – выявлении в сыворотках крови больных людей и лабораторных животных антител к вирусным антигенам. Помимо этого, иммунологические методы исследования незаменимы при идентификации вирусов.

10.1.2.1 Реакция иммунофлюоресценции

Для обнаружения и идентификации вирусных антигенов используют прямой и непрямой методы иммунофлюоресценции. Основу МФА составляет реакция между антигеном и специфическим по отношению к нему антителом. Флюоресцирующие антитела – это иммуноглобулины, выделенные из иммунных сывороток высаливанием сернокислым аммонием или другим способом и меченые флюорохромами. Для метки чаще используют изотиоцианат флюоресцеина (ФИТЦ). Меченный флюорохромом иммуноглобулин при нанесении на исследуемый мазок специфически адсорбируется на поверхности антигена, прочно с ним связываясь. Если антиген не комплементарен антителу, находящемуся в данной люминесцирующей сыворотке, то при промывании препарата такие антитела легко смываются.

Для обнаружения вирусов в нативном исследуемом материале используют прямой МФА. С целью уменьшения неспецифической флюоресценции исследуемых препаратов применяют контрастирование неспецифического свечения. Исследуемые препараты при этом окрашивают смесью специфических флюоресцирующих антител, меченных ФИТЦ, обеспечивающим зеленое свечение, и альбумина нормальной сыворотки быка (БСА), меченного родамином, дающим красную люминесценцию фона.

Препараты для люминесцентной микроскопии готовят на предметных стеклах, хорошо обезжиренных. Все надписи делают простым карандашом на матовой площадке у края предметного стекла. Несколько капель исследуемого материала наносят пастеровской пипеткой или бактериологической петлей вдоль предметного стекла.

Если вирусы предварительно накапливают в культурах клеток, то последние

выращивают на узких пластинках стекла. Извлеченные в разные сроки после заражения из пробирок с культурой клеток эти пластинки осторожно отмывают от питательной среды физиологическим раствором или фосфатным буфером, высушивают при комнатной температуре, положив клеточным слоем вверх на чистом листе фильтровальной бумаги.

Мазки и препараты культур клеток фиксируют от 15 до 20 минут в охлажденном химически чистом обезвоженном ацетоне в закрытом сосуде.

Сухие специфические иммунные люминесцирующие сыворотки и альбумин перед окрашиванием мазков растворяют в дистиллированной воде в объеме, указанном на этикетке ампулы. Растворенными препаратами, сохраняемыми при плюс 4 °С, можно пользоваться в течение нескольких недель. Перед окраской исследуемых препаратов готовят рабочую смесь специфической люминесцирующей сыворотки с альбумином, меченым родамином.

Окрашивают мазки при 37 °С в течение 30 минут во влажной камере, чтобы капли флюоресцирующей сыворотки не высыхали. После этого избыток флюоресцирующих смесей смывают водой, и препараты отмывают 10 минут в фосфатно-буферном растворе (pH от 7,2 до 7,4), промывают дистиллированной водой и сушат при комнатной температуре на воздухе. Исследуют с применением люминесцентного микроскопа, при работе с микроскопом МЛД обычно в качестве возбуждающих фильтров используют синие фильтры типа СС-4 или ФС-1 и запирающие – типа ЖС-8. При люминесцентной микроскопии для иммерсии необходимо специальное нефлюоресцирующее масло. Заменителем его может служить диметилфталат. Результаты иммунофлюоресцентной микроскопии учитывают по интенсивности и специфической флюоресценции исследуемого объекта; при одних вирусных инфекциях специфический антиген выявляется в цитоплазме пораженных клеток в виде ярко светящихся изумрудно-зеленых конгломератов различной величины и формы, при других инфекциях антиген обнаруживается в ядре. В поздней стадии инфекции может наблюдаться свечение всей массы цитоплазмы и ядра.

Оценивают специфическое свечение по следующей шкале:

«++++» – яркая, сверкающая флюоресценция изумрудно-зеленого цвета;

«+++» – яркая флюоресценция зеленого цвета;

«++» – слабая флюоресценция желтовато-зеленого цвета;

«+» – очень слабая флюоресценция;

«–» – объект не флюоресцирует.

Для доказательства специфичности выявленной флюоресценции обязательно предусматривают контроли – микроскопию препаратов из материалов, не содержащих искомый вирус (нормальные тканевые культуры, отпечатки органов здоровых животных). Если в препарате обнаруживают от 3 до 5 и более пораженных вирусом клеток, флюоресцирующих специфическим зеленым цветом на «+++» – «++++» при отрицательном контроле, результат считают положительным.

Непрямой метод имеет преимущество перед прямым как более доступный: с помощью одной и той же антивидовой сыворотки, меченной флюорохромом, можно обнаружить различные вирусные антигены. Например, имея набор специфических иммунных сывороток кроликов к различным вирусным антигенам и единую меченую глобулиновую фракцию сыворотки лошади, иммунизированной нормальной сывороткой кроликов, можно осуществлять лабораторную диагностику многих вирусных инфекций.

РИФ применяют в прямом и непрямом вариантах для выявления вируса в материале, полученном от больных, в инфицированных культурах клеток и организме животных (таблица 6).

Таблица 6 – Диагностика вирусных инфекций при помощи РИФ

Вирусная инфекция	***Материал для иммунофлюоресцентного исследования***	
	от больных для экспресс-диагностики	***из инфицированных культур клеток и животных для выявления и идентификации вируса***
1	2	3
Грипп	Слущенные эпителиальные клетки носовых ходов, кусочки легких и трахеи, полученные при аутопсии	Первичные культуры клеток почек обезьян, эпителиальные клетки носовых ходов от экспериментально зараженных хорьков
Парагрипп	То же	Культуры клеток почек обезьян, эмбрионов человека, СОЦ, НЕр-2
Аденовирусная	Соскоб с конъюнктивы	Культуры клеток (НЕр-2, КВ и др.)
Респираторно-синцитиальная	То же	Культуры клеток (НЕр-2, Некг; диплоидные человека)

Продолжение таблицы 6

1	2	3
Корь	Эпителиальные клетки в осадке мочи, лейкоциты крови, биопсийные и секционные препараты мозга	
Краснуха	То же	Культуры клеток почек кролика, обезьян, ЯК, Vero, SIRK ВНК-21 Культуры клеток почек обезьян
Энтеровирусная	Секционные препараты миокарда (Коксаки), эпителиальные клетки в осадке мочи	Культуры клеток почек обезьян
Паротит	То же	Культуры клеток почек обезьян, амниона человека, куриных фибробластов
Бешенство	Биопсийные препараты мозга	Мазки-отпечатки мозга и слюнных желез инфицированных мышей
Герпетическая	Мазки из содержимого везикул, соскоба везикул и роговицы, секционные и биопсийные препараты мозга	Культуры диплоидных клеток Н>7-38, фибробластов; срезы ткани мозга зараженных мышей

10.1.2.2 Иммунная электронная микроскопия

Электронная микроскопия в настоящее время играет важную роль в изучении вирусов. Именно данные электронной микроскопии служат основой современной классификации вирусов.

Новый этап в развитии электронно-микроскопического изучения вирусов – применение техники иммунноэлектронной микроскопии (ИЭМ). С помощью этого метода стали возможными не только прямое обнаружение вирусов, но и их идентификация, а также быстрое серотипирование вирусных штаммов и титрование антител к ним. Большое значение ИЭМ приобрела для определения локализации вирусных антигенов внутри клеток макроорганизма.

ИЭМ позволяет обнаружить специфически связанные с антителами вирусные частицы. Преимуществом этого метода является одновременная концентрация вируса и его идентификация с помощью специфической сыворотки. Предложенные модификации ИЭМ предусматривают обработку вирусосодержащего материала антисывороткой в высоком титре, добавление к осадку фосфорно-вольфрамовой кислоты или уранилацетата с последующим нанесением на пленку (подложку) и высушиванием. При электронной микроскопии видны скопления вирусных частиц.

ИЭМ используют также для выявления в биологическом материале полиовирусов, цитомегаловирусов, вирусов гепатита А и В, некультивируемых аденовирусов в ткани миндалин, некультивируемых энтеро- и ротавирусов в фекалиях, вирусов оспы в оспенном детрите.

Несомненным преимуществом ИЭМ является ее высокая чувствительность по сравнению с обычными электронно-микроскопическими методами.

При контакте антигена вируса или вирусного компонента с гомологичной антисывороткой формируется комплекс антитело-антиген. Данный феномен является основой методики, употребляемой для обнаружения и идентификации вирусных антигенов или антител к ним. Именно эти комплексы антигенов с антителами после негативного контрастирования можно наблюдать в электронном микроскопе. В клинической диагностике антигенный материал не требует тщательной очистки. Так, в случае выявления вируса гриппа можно исследовать неочищенную аллантоисную жидкость. В настоящее время считается, что практически любой вид клинического материала пригоден для ИЭМ. В диагностических целях можно применять обычную несанкционированную сыворотку, а также сыворотки реконвалесцентов. Необходимо отметить, что на конечные результаты большое влияние оказывает соотношение количеств антигена и антител. При избытке антигена наблюдают изобилие частиц; агломераты в данном случае будут немногочисленны. При избытке антител вирусные частицы окружены их толстым слоем, выявить мелкие структурные детали вириона будет практически невозможно; агрегаты также немногочисленны. При оптимальном соотношении количеств антигена и антител агрегаты укрупняются при хорошем изображении деталей вирионов. Из вышеизложенных соображений желательно использовать иммунную сыворотку в нескольких разведениях.

Для ИЭМ применяют обычные медные сетки. На опорную сетку наносят пленку-подложку, приготовленную из палладия в концентрации от 0,5 % до 2 % (возможна замена палладия чистой нитроцеллюлозой). При использовании низких концентраций палладия и для улучшения адсорбционных свойств подложки ее укрепляют с помощью угля. Для этого на готовую сухую пленку-подложку на электронно-микроскопической сетке напыляют уголь в вакууме. Толщина пленки-

подложки и укрепляющего слоя углерода оказывает существенное влияние на контраст и изображение мелких деталей объекта. Конкретную толщину пленок-подложек и слоя угля каждый исследователь определяет индивидуально, исходя из того, что углерод более электронно-прозрачен, нежели палладий.

Вирусы и антитела к ним имеют малую электронную плотность. Поэтому биологические объекты практически невозможно выявлять с помощью электронного микроскопа без предварительной обработки. Для визуализации вирусов используется техника так называемого негативного контрастирования (или негативной окраски). Для негативного контрастирования вирусов и комплексов вирус – антитело применяют различные соли тяжелых металлов. Контрастирующие вещества (атомы тяжелых металлов) проникают в гидрофильные участки объектов и замещают в них воду. В результате электронная плотность объекта возрастает, становится возможным его наблюдение в электронном микроскопе. Используют от 1 % до 3 % водный раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты (pH от 6,6 до 7,0).

Прямой метод ИЭМ нашел наибольшее применение в практике. Вирусную суспензию смешивают с неразведенной антисывороткой, а также с ее разведениями в 10 и 100 раз. Обычно используют 0,8 или 0,9 мл суспензии и, соответственно, 0,2 или 0,1 мл антисыворотки. После энергичного перемешивания смесь инкубируют в течение 1 ч при 37 °С, затем в течение ночи – при 4 °С. На следующий день смесь центрифугируют 30 мин при 10000 об/мин (для осаждения иммунных комплексов), а при исследовании мелких вирусов (типа пикорнавирусов) – в течение того же времени при 15000 об/мин. Крупные вирусы могут быть осаждены на обычной лабораторной центрифуге. Осадок ресуспендируют в капле дистиллированной воды и подвергают негативному контрастированию.

При оценке результатов ИЭМ продукты взаимодействия между антигеном и антителом в электронном микроскопе могут иметь различный вид (отдельная вирусная частица, покрытая антителами полностью или частично; агломераты вирусных частиц). Агломераты могут занимать различную площадь, иметь различный внешний вид, содержать различное количество частиц. Поэтому, наряду с опытными, необходимо исследовать контрольные препараты (с буферным раствором или

гетерологичной антисывороткой).

Критерий оценки результатов, полученных с помощью ИЭМ – наличие или отсутствие в препаратах скоплений вирусных частиц, агрегированных иммунной сывороткой. Наличие агломератов антигена и антител специфической антисыворотки – признак положительной реакции. Тем не менее, следует учитывать возможность неспецифической агрегации частиц антигена под влиянием высокоскоростного центрифугирования. Она основана на оценке степени покрытия одиночных или агрегированных частиц антителами сыворотки:

0 – в препарате видны одиночные частицы или небольшие их скопления, поверхность которых не покрыта антителами;

«+» – поверхность частиц слегка покрыта антителами;

«++» – поверхность частиц умеренно покрыта антителами, агломераты та же картина;

«+++» – частицы и агрегаты сплошь покрыты антителами, но структура частиц еще видна;

«++++» – частицы и агрегаты покрыты антителами настолько, что структуры самих частиц не различимы.

10.1.2.3 Встречный иммуноэлектрофорез

Реакция встречного иммуноэлектрофореза (РВИЭФ) в вирусологической диагностике широко применяется для обнаружения в сыворотках больных не антител, а поверхностных антигенов (например, HBsAg у больных гепатитом В), а также для выявления других вирусных антигенов, имеющих отрицательный заряд.

На стеклянную пластину наносят слой агара. После затвердения в нем вырезают два параллельных ряда лунок. Антигены помещают в лунки, расположенные ближе к катоду, а антитела – в лунки, находящиеся ближе к аноду, и проводят электрофорез. HBsAg, имея отрицательный заряд, передвигается к аноду, а антитела – к катоду. Затем стекла помещают во влажную камеру и через промежуток времени от 12 до 24 ч учитывают результаты реакции по образованию линий преципитации

между искомым антигеном и антителом.

10.1.2.4 Реакция гемадсорбции на твердой основе

Высокая чувствительность реакции позволяет применять ее для экспресс-диагностики вирусных инфекций.

Методика. Лунки полистероловых панелей одноразового использования обрабатывают иммунным глобулином (иммунной сывороткой) и вносят в них суспензию исследуемого материала, содержащего антиген. Через промежуток времени от 30 до 60 минут лунки многократно промывают буфером, добавляют взвесь эритроцитов, покрытых специфическим иммуноглобулином, и спустя от 30 до 60 минут определяют наличие гемагглютинации.

Если в материале содержится специфический антиген, он соединяется с сывороткой, адсорбированной на поверхности лунок, и, в свою очередь, связывает иммуноглобулины на поверхности эритроцитов. В результате происходит адсорбция эритроцитов к поверхности лунок. В описанной модификации реакция применяется для выявления антигенов ротавирусов и других вирусов в фекалиях больных.

10.1.2.5 Метод ИФА с использованием индикаторных полосок

В данном методе используется система ферментных каналов, предусматривающая включение двух ферментов. Эта пара подбирается таким образом, чтобы продукты одной ферментативной реакции служили субстратами для второго фермента. Поверхность индикаторной полоски покрыта антителами против вирусного антигена. Вместе с антителами на твердой фазе иммобилизованы молекулы фермента глюкозооксидазы. Готовую полоску погружают в исследуемый образец. Антитела связывают молекулы антигена из образца. Степень заполнения вакантных антител пропорциональна концентрации вирусного антигена. Затем индикаторную полоску переносят в раствор, содержащий конъюгат стандартного антигена с пероксидазой, субстрат для глюкозооксидазы (глюкозу) и хромоген (4-хлорпафол).

Глюкозооксидаза катализирует превращение глюкозы в глюконовую кислоту с образованием перекиси водорода. Конъюгат связывается свободными антителами на полоске, и пероксидаза оказывается в непосредственной близости от области наибольшей концентрации перекиси водорода. Атомарный кислород, образующийся в результате ферментативного расщепления перекиси, окисляет хромоген. В результате образуется голубое нерастворимое соединение, которое проявляется па полоске.

Интенсивность развивающейся окраски обратно пропорциональна концентрации определяемого вещества в образце. Регистрацию проводят визуально или с помощью фотометра, предназначенного для измерения отраженного света. Такой вариант иммуноферментного анализа не требует промывок и разделения связанных и свободных молекул конъюгата. Анализируемый материал (сыворотки, слюна, моча) не требует предварительного разведения и дополнительной обработки.

Для упрощения интерпретации полученных результатов в индикаторные полоски вводят внутренний стандарт. На индикаторной полоске в отдельном месте иммобилизуют антитела к пероксидазе. Концентрацию антипероксидазных антител подбирают в такой концентрации, чтобы связанный ими конъюгат пероксидаза-антиген содержал некоторое диагностически значимое количество антигена. Интенсивность окраски зоны внутреннего стандарта сравнивают с окраской основной части индикаторной полоски. Если таковая превышает зону опытного образца, значит концентрация определяемого вещества больше условной концентрации антигена внутреннего стандарта.

10.1.3 Молекулярно-генетические методы

Молекулярно-генетическая диагностика – обнаружение в клиническом материале фрагментов нуклеиновых кислот вирусов-возбудителей с помощью зондов (методы молекулярной гибридизация нуклеиновых кислот) или полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Методы молекулярной биологии получили свое развитие еще в 50-е годы XX столетия. Они стали возможными в связи с тем, что в геноме каждого микроор-

ганизма имеются уникальные видоспецифичные нуклеотидные последовательности, обнаружив которые можно идентифицировать любой инфекционный агент. Наибольшее значение данные методы имеют при выявлении микроорганизмов, которые длительно или трудно культивируются обычными методами. В 70-е годы для выявления инфекционного возбудителя или мутации использовали ДНК-зондовую детекцию, основанную на гибридизации специфических олигонуклеотидных зондов, меченных радиоактивным изотопом (или флюорохромом) с образцом выделенной ДНК. Гибридизационный анализ использует способность нуклеиновых кислот в определенных условиях образовывать специфические комплексы с нуклеиновыми же кислотами, имеющими комплиментарные к ним последовательности. Метод детекции инфекционных возбудителей ДНК-гибридизацией оказался крайне трудоемким, длительным и дорогостоящим. Кроме того, его чувствительность оказывается недостаточной при идентификации микроорганизмов в таких клинических материалах, как фекалии и моча. На смену ДНК-гибридизации пришел метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаружить и многократно копировать с помощью термофильной ДНК-полимеразы определенный фрагмент ДНК.

Методы молекулярно-генетической индикации (методы молекулярной гибридизации – ММГ, полимеразная цепная реакция – ПЦР) основаны на выявлении специфических участков ДНК возбудителя в исследуемом материале.

Для детекции вирусов в воде из проб выделяют вирусную РНК методом аффинной сорбции (Boom et all, 1987) с последующей обратной транскрипцией и ПЦР: одностадийной в случае энтеровирусов и двустадийной в случае вируса гепатита А.

Возможности ПЦР:

1) одновременное обнаружение и идентификация патогенов;

2) выявление некультивируемых форм микроорганизмов;

3) оценка жизнеспособности возбудителя;

4) оценка вирулентности штаммов по наличию генов патогенности;

5) определение эпидемической значимости возбудителя;

6) определение источника инфекции и уточнение пути передачи.

При определении гомологии РНК водных и клинических штаммов ВГА путем секвенирования нуклеотидных последовательностей различных штаммов показана их идентичность в пределах от 90,4 % до 92,1 %, что подтверждает водный путь передачи возбудителя гепатита А.

Метод рестрикционного анализа хромосомной ДНК с использованием рестриктазы EcoRI на основе пульс-электрофореза позволяет разделять выделенные штаммы на группы по типу рестриктограммы. Полимеразная цепная реакция – это изящный метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаружить и многократно копировать с помощью термофильной ДНК-полимеразы определенный фрагмент ДНК.

Открытие метода полимеразной цепной реакции стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние годы.

Полимеразная цепная реакция – ПЦР (*PCR – polymerase chain reaction*)

Принцип метода заключается в естественной репликации ДНК, включающей тепловую денатурацию нуклеиновой кислоты (плавление), ее отжиг с синтетическими олигонуклеотидными праймерами и удлинение цепи (элонгация). Смена этих этапов происходит в результате простого изменения температуры реакционной смеси. Метод ПЦР обеспечивает многократное приумножение (амплификацию, *amplification* – усиление, увеличение) в условиях *in vitro* фрагментов генома и быстрое накопление практически в любых количествах определенной, интересующей исследователя последовательности ДНК, которая первоначально может быть представлена всего лишь одной молекулой. В результате получают количество материала, достаточное для проведения анализа обычными методами детекции. Сущность метода ПЦР составляет многократный циклический процесс, попеременно включающий полимеразную реакцию и денатурацию синтезированного фрагмента двунитевой ДНК и отжиг праймеров, что, в конечном счете, может привести к неограниченному увеличению исходного материала.

Реактивы (компоненты реакционной смеси).

1 Праймеры – синтетические олигонуклеотиды, состоящие из нуклеотидов в количестве от 18 до 25, комплиментарных сайтам (участкам) на идентифицируемой

матричной ДНК. Синтез праймеров – довольно трудоемкий процесс. В настоящее время подбор последовательности обеспечивается автоматически с использованием соответствующих компьютерных программ. Выбор праймеров является наиболее важным звеном ПЦР, так как именно ими определяется возможность амплификации и выявления нужной последовательности. Особенно важно наличие комплиментарности 3' -концевых нуклеотидов праймеров в выявляемой генетической структуре, так как отсутствие данного условия приводит к резкому снижению (в десятки раз) эффективности присоединения к 3'-концу новых нуклеотидов, что, естественно затрудняет последующий рост полинуклеотидной цепи. Конструирование праймеров проводится после определения нуклеотидных последовательностей в исследуемой ДНК методом секвенирования. Существенным образом на успех ПЦР-диагностики влияет и длина амплифицируемого участка ДНК или РНК. В большинстве случаев она должна находиться в диапазоне от 100 до 300 нуклеотидов. Для подбора оптимальных условий ПЦР с выбранными праймерами применяют различные компьютерные программы, например, *OLIGO*. Для анализа сходства испытуемых ДНК с известными нуклеотидными последовательностями используют данные международных компьютерных банков *Gen Bank* и *EMBL*, поставляющих программы анализа *DNASUN* и *DNASIS.*

2 Смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ) – дезоксиаденозинтрифосфат (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфат (дГТФ), дезоксицитидинтрифосфат (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфат (дТТФ) – «строительный материал», используемый Taq-полимеразой для синтеза второй цепи ДНК. Необходимо помнить, что дНТФ при комнатной температуре легко распадаются, поэтому маточные их растворы разливают по 10 мкл и 20 мкл и хранят в замороженном состоянии при температуре от минус 20 °С до минус 70 °С. Для работы используют размороженные пробы (рабочие образцы), разведенные в 100 раз деионизированной водой (по 2 мкл каждого). Избыток угнетает активность полимеразы.

3 Taq-ДНК-полимераза (термостабильный фрагмент). Выделена из водорослей *Thermus Aquaticus*, живущих в горячих источниках, обладает ДНК-полимеразной активностью. Несколько лет назад удалось получить из бактерий *Thermus Thermophilis*

Tth-полимеразу, которая выполняет целый ряд функций, в том числе обеспечивает репарацию и репликацию ДНК и обладает обратнотранскриптазной активностью, позволяя получать из РНК комплиментарную ДНК. Она способна удлинять короткие олигонуклеотидные последовательности (праймеры), присоединяя к их 3′-концу дополнительный нуклеотид при условии, что праймер, как уже отмечалось, комплиментарен сайту цепи ДНК (матрице). Наращивание длины праймера с помощью полимеразы происходит до тех пор, пока не будет достигнут конец матрицы. Экспериментально доказано, что процесс амплификации происходит более эффективно при использовании Taq-ДНК-полимеразы.

4 Буферный раствор для обеспечения оптимальных условий работы.

5 Ионы магния (Mg^{2+}) – катализатор фермента Taq-ДНК-полимеразы.

6 Анализируемый образец – подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, служащий мишенью для последующего многократного копирования (например, ДНК микроорганизмов). При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется.

7 Положительный контроль – образец ДНК выделяемой биологической системы.

8 Минеральное масло – наслаивается па поверхность реакционной смеси для предотвращения испарения и разбрызгивания продуктов ПЦР в случаях, если не применяется амплификатор с горячей крышкой.

Приборы.

Важным фактором воспроизводимости реакции амплификации является приборное обеспечение. Основным прибором для проведения ПЦР является амплификатор (термоциклер), представляющий собой аппарат, в гнезда которого устанавливаются специальные амплификационные пробирки, изготовленные из особого термопроводимого пластика, с реакционной смесью или предметные стекла с образцами тканей. Различными фирмами выпускается большое количество разнообразных моделей амплификаторов. Модели отличаются друг от друга системами охлаждения (водяное, воздушное, фреоном и более надежное и современное – на полупроводниковых кристаллах), способами обогрева (передача тепла через пробирки с жидко-

стью и воздушная передача тепла в микроколориметр для обогрева срезов тканей, мазков и т.д.), объемом памяти при программировании, режимами регулирования смены температуры (по матрице, активное), количеством платформ (от 1 до 4) – такие модели осуществляют амплификацию по одной и той же программе на нескольких платформах сразу, что позволяет увеличивать число анализируемых одновременно проб или проводить амплификацию на разных платформах по нескольким разным программам для одновременного анализа проб на наличие нескольких типов возбудителей.

Кроме надежности амплификатора и точности поддержания температуры, следует упомянуть о таком важном свойстве приборов, как использование активного регулирования, позволяющего добиваться достижения нужной температуры реакционной смеси внутри пробирки в существенно более короткие сроки, чем при обычном регулировании. Использование активных методов регулирования температуры реакционной смеси (в отличие от метода регулирования по матрице) позволяет значительно сокращать процесс амплификации: тем самым уменьшается время реакции (от 1,5 до 2 раз), увеличивается время сохранения активности Taq-ДНК-полимеразы, что позволяет увеличить количество циклов амплификации, снизить риск неспецифического отжига праймеров, а, следовательно, повысить чувствительность и специфичность реакции.

Регулирование по матрице – классический вариант регулирования, при котором заданный в программе амплификации температурный профиль трактуется как температурный профиль термоблока (матрицы). В этом случае реальная температура реакционной смеси в пробирке может существенно отличаться от температуры термоблока из-за плохой термопроводности стенок пробирки, наличия контактного теплового сопротивления между матрицей и пробиркой, конечной скорости распространения тепла внутри объема смеси, т.е. ограниченной скорости теплообмена между матрицей и пробиркой со смесью. Данный метод был наиболее распространен до последнего времени. При таком регулировании температуры реакционной смеси необходимы довольно продолжительные участки поддержания постоянной температуры матрицы для того, чтобы температура смеси успела выйти на заданный уро-

вень (от 0,5 до 2 мин в зависимости от необходимой точности).

Активный метод регулирования ориентируется на более эффективное достижение конечной цели: установление заданной температуры реакционной смеси основывается на том, что программой непосредственно задается температура реакционной смеси и время удержания смеси при этой температуре. Температура внутри пробирки вычисляется на основе измерения температуры термоблока и известного (заданного в программе) объема реакционной смеси. Такой подход позволяет существенно сократить время реакции, поскольку в этом случае регулирование температуры матрицы осуществляется так, чтобы обеспечить наиболее эффективные температурные переходы в реакционной смеси. Известно несколько модификаций метода активного регулирования; активное регулирование повышенной точности – алгоритм, позволяющий свести к минимуму неравномерность температуры внутри пробирок (не более 0,5 °С); быстрое активное регулирование – алгоритм, допускающий неравномерность температуры в пробирке в пределах ± 1,5 °С, но существенно экономит время.

Другие приборы, необходимые для проведения исследования: центрифуга, ламинарный шкаф, водяная баня или термоблок, аппарат для электрофореза, денситометр.

Оптимизация проведения ПЦР.

Важную роль в проведении ПЦР играет оптимизация таких факторов, как число циклов амплификации, временные и температурные характеристики процесса, концентрация искомых последовательностей нуклеиновых кислот, концентрация ионов магния, дезоксинуклеозидтрифосфатов, ДНК-полимеразы.

Циклический температурный режим. Если в анализируемом образце присутствует искомая ДНК, то в ходе реакции амплификации с ней происходит ряд процессов, обеспечиваемых определенными температурными циклами. Параметры температурного режима играют исключительно важную роль для успешного проведения реакции. Для того, чтобы осознать, сколь сложным было решение этой задачи, укажем, что К. Мюллис работал над ней совместно с математиком Ф. Фалуном несколько месяцев.

Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов; денатурации, отжига (*annealing*) и синтеза (достройки).

Денатурация. В результате нагревания (обычно от 90 °С до 95 °С в течение от 40 до 50 с) двойная цепь ДНК разделяется на 2 отдельные цепи. Многими исследователями рекомендуется более длительный начальный прогрев реакционной смеси (от 93 °С до 95 °С до 5 мин), который обеспечивает полную денатурацию всех молекул ДНК в образце. Последующие этапы плавления занимают меньше времени.

Отжиг или присоединение праймеров.

На данном этапе праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени. Этот процесс носит название «отжиг», которое происходит от английского термина «*annealing*», используемого в металлургии и означающего охлаждение сплавов в определенном режиме. Праймеры состоят обычно из нуклеотидов в количестве от 20 до 30, их подбирают так, чтобы они ограничивали искомый фрагмент и были комплиментарны противоположным цепям ДНК. При создании оптимальной температуры (обычно от 40 °С до 65 °С) происходит комплиментарное связывание праймеров с соответствующими участками ДНК: один праймер на одной цепи, другой на противоположной цепи ДНК. Отжиг протекает в соответствии с правилом комплиментарности Чаргаффа, означающим, что в двух цепочечной молекуле ДНК напротив аденина всегда находится тимин, а напротив гуанина – цитозин. Если данное условие не соблюдено, то отжига не происходит.

Температура отжига праймера в значительной степени влияет на специфичность получаемого продукта ПЦР. Она определяется длиной праймера и содержанием Г-Ц-пар и может быть рассчитана по формуле:

$$T = 4\ °C \times (G + C) + 2\ °C \times (A + T) - 3,$$

где А – аденин (количество нуклеотидов);

Т – тимин (количество нуклеотидов);

G – гуанин (количество нуклеотидов)

С – цитозин (количество нуклеотидов).

На практике температура отжига подбирается опытным путем с использованием положительных и отрицательных контролей. Она находится в диапазоне от 40 °С до 65 °С.

После отжига праймеров Taq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК, начиная с 3'-конца праймера.

Элонгация **(синтез)**.

На данном этапе происходит достраивание праймеров. Температуру реакционной смеси доводят до оптимальной для активности Taq-ДНК-полимеразы (около 72 °С), которая начинает достраивание второй цепи ДНК из дНТФ. Синтез всегда начинается от 3'-конца каждого праймера. Достраивание новой нити ДНК идет, таким образом, от 5'-конца к 3'-концу каждой имеющейся нити ДНК, т.е. синтез, протекает в противоположных друг другу направлениях. Именно поэтому классическую ПЦР называют методом направленной амплификации. Время, необходимое для элонгации, определяется размером продуктов амплификации. Считается, что достраивание 1000 пар нуклеотидов занимает 1 мин. Обычно оно занимает от 40 до 60 с.

В завершение первого цикла ПЦР из одной образуются две новые молекулы ДНК, идентичные оригиналу, но не по всей длине ДНК, а только в тех участках, которые ограничены присоединением праймеров. То есть дочерние молекулы ДНК идентичны не всей материнской ДНК, а только ее части.

Следует отметить, что во время первого цикла удлинение новой цепочки от праймера заканчивается произвольно. Однако со второго цикла в смеси начинают накапливаться специфические продукты амплификации – ампликоны, которые ограничены по длине двумя праймерами. Именно они и являются непосредственным предметом детекции, которую проводят с помощью электрофореза либо иммуноферментного анализа.

Во втором цикле ПЦР два синтезированных участка ДНК, образованные из одной материнской ДНК, также служат матрицей (шаблоном) для последующих циклов ПЦР. Начиная с третьего цикла, в процессе синтеза образуются отрезки ДНК (ампликоны) со строго определенным количеством нуклеотидных последовательностей и, соответственно, с определенной молекулярной массой, что позволяет в про-

цессе классического метода детекции – гель-электрофореза, легко выявить такие ампликоны. В случае близкого значения температуры отжига праймеров к температуре, оптимальной для действия фермента, иногда становится возможным использовать 2-стадийный цикл ПЦР, совместив две стадии (отжиг и элонгацию) в одной.

3-стадийный цикл (денатурация, отжиг, элонгация), длящийся от 2 до 3 мин при использовании амплификаторов, регулируемых по матрице, или от 30 до 40 с при применении современных термоциклеров, работающих по принципу активного регулирования, может быть повторен многократно. 1 цикл ПЦР дает две копии ДНК, затем 4, 8, 16 и т.д., т.е. в результате каждого проведенного цикла количество синтезированных копий удваивается. Данный процесс повторяют от 20 до 30 раз, что обеспечивает синтез как минимум 1 млн. копий.

Результатом циклического синтеза является экспоненциальное увеличение количества фрагмента ДНК, которое может быть описано формулой:

$$A = M\text{-}(2^n - n - 1) = 2^n,$$

где А – количество специфических (ограниченных праймерами) продуктов реакции амплификации;

М – начальное количество ДНК-мишеней; n – число циклов амплификации.

Реальное значение эффективности отдельных циклов амплификации составляет, по некоторым данным от 78 % до 97 %. В случае присутствия в пробе ингибиторов реакции эти значения могут быть намного меньше, поэтому фактическое количество специфических продуктов амплификации лучше описывает уравнение:

$$A = M \times (1 + E)^n,$$

где Е – значение эффективности реакции.

Экспоненциальный характер увеличения копий ДНК носит только при первых 20 циклах. В дальнейшем в результате истощения дНТФ, праймеров, снижения активности Taq-ДНК-полимеразы и др. причин увеличение количества образующихся копий прекращается.

Следуем отметить, что в процессе амплификации на исходной цепи синтезируются и длинные фрагменты, однако их накопление происходит лишь в арифметической прогрессии:

$$\mathbf{К = М \text{ Ч } n,}$$

где К – количество длинных фрагментов амплификации;

n – число циклов амплификации.

Таким образом, специфические фрагменты, ограниченные на концах праймерами, впервые появляются в конце второго цикла, накапливаются в геометрической прогрессии и очень скоро начинают доминировать среди продуктов амплификации.

Гель-электрофорез.

Как правило, для детекции продуктов ПЦР применяется электрофорез в 1,5-3 % агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Также можно использовать полиакриламидные и более концентрированные агарозные гели. Камера для электрофореза заполняется трис-боратным буфером (pH от 8,1 до 8,2). Для исследования используют от 10 мкл до 20 мкл амплифицированиой ДНК. Электрофорез проводят при высоком напряжении (≈ от 10 В/см до 15 В/см). По окончании электрофореза гель просматривают в УФ-свете на трансиллюминаторе и оценивают результаты. ПЦР – исследование можно интерпретировать как отрицательное или положительное в зависимости от того, обнаружена в образце интересующая последовательность или нет (имеет вид компактной светящейся полоски – «бэнда»).

При проведении ПЦР необходимо учитывать возможность контаминации исследуемых проб продуктами амплификации предыдущих опытов. Это может стать причиной появления ложноположительных результатов. Поэтому оборудование, предназначенное для подготовки проб к ПЦР (микропипетки, центрифуги, пробирки

и т.д.) и анализа амплифицированной ДНК должно быть отдельным, а помещения для выполнения этих этапов исследования не должны сообщаться. В идеале основные этапы проведения ПЦР рекомендуется проводить в разных зданиях.

Описанный метод «классической» направленной полимеразной цепной реакции, который используется в тест-системах первого поколения, претерпевает значительные изменения, связанные с разработкой и внедрением различных тест-систем (в том числе и отечественных), для ПЦР-диагностики второго (применяемых для количественного анализа ДНК (РНК), и третьего («сухих» тест-систем, находящихся в стадии разработки) поколений, а также различных модификаций ПЦР(лонг-ПЦР, гнездная ПЦР, РТ-ПЦР, LIPA-ПЦР-технологии, ПЦР *in situ*, мультиплексная ПЦР) и альтернативных методов амплификации нуклеиновых кислот.

Основное отличие тест-систем ПЦР второго поколения (Ген-гем-тест НС) от первого – наличие внутреннего стандарта, который представляет собой ДНК или РНК выявляемого возбудителя в концентрации от 10 до 100 молекул, которая амплифицируется одновременно с фрагментом гена инфекционного агента, но детектируется при этом в виде отдельных сигналов. Так при использовании тест-систем для ПЦР-диагностики ДНК вируса гепатита В в 3 % агарозном геле искомая последовательность выявляется в виде 350 нуклеотидных последовательностей, то есть продукты, определяемые на электрофореграмме, размещены в разных местах вследствие их различной молекулярной массы. При этом гарантируется достоверность «отрицательного» результата ПЦР-определения инфекционного агента и своевременного выявления ложноположительных результатов. Наличие внутреннего стандарта при использовании системы видеокомпьютерной детекции позволяет рассчитать концентрацию возбудителя в пробе, т.е. оценить нагрузку (вирусную, бактериальную или иной природы) – количество возбудителя в единице биологического материала. Повысить чувствительность и специфичность тест-систем второго поколения можно при использовании модификации ПЦР, такой как *nested-PCR* («гнездная» ПЦР) с использованием внутреннего стандарта, что нашло применение в тест-системах второго поколения, рекомендованных для диагностики ВИЧ-инфекции.

Для удобства транспортировки и хранения систем генотестирования, а также

для обеспечения стандартности проведения анализов произведена разработка «сухих» тест-систем третьего поколения. Их несомненным преимуществом по сравнению с аналогичными «жидкими» тест-системами является возможность хранения и транспортировки при любой температуре (от минус 40 °С до 30 °С), ускорение и упрощение работы исполнителя. При этом тест-системы третьего поколения позволяют использовать все преимущества тест-систем первого и второго поколений в различных модификациях.

В настоящее время метод ПЦР адаптирован для выявления большинства бактерий, простейших и вирусов, имеющих медицинское значение. Особенное место данный метод приобрел в вирусологии. Благодаря своим высоким диагностическим качествам ПЦР является общепризнанным дополнением к традиционным методам, использующимся в вирусологии: размножению вируса в культуре клеток, серологическому выявлению вирусных антигенов, электронной микроскопии. Существенным преимуществом данного метода является возможность выявлять вирусы при латентных инфекциях (цитомегаловирус, вирус герпеса) и вирусы, которые трудно или пока невозможно культивировать (вирус иммунодефицита человека, вирус Эпштейна-Борр, вирус папилломы человека, вирус гепатита В и др.). С методом ПЦР связываются перспективы изучения таких заболеваний, как болезнь Крейтцфельда-Якоба, Альцгеймера, рассеянный склероз.

10.2 Вирусологический метод

Вирусологическая диагностика — основана на выделении из исследуемого материала вируса и его последующей идентификации.

Вирусы в отличие от бактерий размножаются лишь в живых клетках. В связи с этим культивирование вирусов может осуществляться на уровне организма подопытного животного (куриный эмбрион как развивающийся организм относят к подопытным животным) или живой клетки, выращиваемой вне организма, т.е. на уровне культуры клеток.

10.2.1 Работа с клеточными культурами

Как известно, вирусы являются генетическими внутриклеточными паразитами, способными к размножению только в живых системах. Следовательно, первым этапом вирусологической диагностики является получение и подготовка одной из живых систем: культур клеток, куриных эмбрионов или чувствительных лабораторных животных. Наиболее трудоемкой является работа с клеточными культурами, на которой следует остановиться подробнее.

На практике используют первичные, полуперевиваемые (диплоидные) и перевиваемые клеточные культуры.

Первичные клеточные культуры. Эти культуры получают непосредственно из ткани животного или человека путем разрушения протеолитическими ферментами (трипсин, коллагеназа, проназа) межклеточного вещества. Разобщенные (диспергированные) клетки, помещенные в питательную среду, способны прикрепляться к поверхности культурального сосуда и размножаться, образуя так называемый монослой – слой толщиной в одну клетку. С помощью специальных реактивов (трипсина, версена) клетки можно снять с поверхности одного сосуда и пересадить в другой. Такая манипуляция называется пассажем. Поскольку первичные культуры получают из уже сформировавшихся, высокодифференцированных клеток, их способность к делению и размножению ограниченна. Первичные культуры выдерживают от 5 до 10 пассажей.

Первичные клеточные культуры готовят из любой эмбриональной ткани животных и человека, поскольку эмбриональные клетки обладают повышенной способностью к росту и размножению. Чаще культуры клеток готовят из смеси нескольких тканей, например кожной, костной и мышечной. Так получают фибробласты эмбриона человека (ФЭЧ) и кур (КФ), клетки почек человека (КПЧ) и др. Для получения клеточных культур используют эмбриональную ткань человека (в случае прерывания беременности), а также 8-12-дневные куриные эмбрионы.

Культивирование клеток осуществляют в стеклянных или пластмассовых сосудах различной формы и размера, желательно одноразового пользования, при стро-

гом соблюдении асептики на всех этапах.

Приготовление клеточной взвеси. Ткань, доставленную в лабораторию, отмывают от крови, жировых компонентов, клеточного детрита и других примесей в растворе Хенкса или фосфатного буфера с антибиотиками, измельчают ножницами и продолжают отмывать до полной прозрачности раствора. Затем ее заливают трипсином (на 100 г ткани – от 200 мл до 300 мл раствора трипсина) и диспергируют при помощи магнитной мешалки или пипетированием. Надосадочную жидкость, содержащую трипсинизированные клетки, сливают и помещают в холодильник при 4 °С.

Трипсинизацию повторяют несколько раз. Взвесь клеток центрифугируют при 600 об/мин в течение от 5 до 10 мин, ресуспендируют в питательной среде и окрашивают фуксином, метиленовой синью или другими красителями, а затем определяют их концентрацию в камере Горяева. Клеточную взвесь разводят питательной средой до концентрации от 4×10^5 до 8×10^5 клеток в 1 мл, разливают в культуральные сосуды, плотно закрывают резиновыми пробками и культивируют в термостате при температуре от 35 °С до 37 °С в течение времени от 48 до 96 ч (пробирки кладут под углом 5°), после чего отбирают культуры с хорошо сформировавшимся монослоем.

Пассирование клеточных культур. Во флаконы с клетками после отсасывания питательной среды наливают подогретый до 37 °С раствор 0,25 %-го трипсина или 0,02 %-го версена и помещают их на промежуток времени от 3 до 5 мин в термостат. Затем версен или трипсин удаляют, в культуральный сосуд добавляют небольшое количество питательной среды и, интенсивно взбалтывая, добиваются суспензирования клеток в питательной среде. После этого подсчитывают количество клеток, доводят их до необходимой концентрации и разливают в новые флаконы.

Перевиваемые (пассажные) клеточные культуры. Такие культуры способны выдерживать неограниченное число пассажей. Они происходят из опухолевых клеток, утративших дифференциацию, и не имеющих ограничений роста. Перевиваемые (стабильные) клеточные культуры получены из разнообразных нормальных и опухолевых тканей человека: амниона (А-0, АЛ, FL), почек (Rh, ППЧ), карциномы шейки матки (HeLa), раковой опухоли гортани (НЕр-2), костного мозга больного ра-

ком легких (Detroit), рабдомиосаркомы эмбриона человека (RD) и др.

Клетки перевиваемых линий сохраняют замороженными в жидком азоте, при необходимости их оттаивают и используют для исследований.

Помимо стационарного способа культивирования с регулярными пассажами, описанного выше для первичных культур, для большинства перевиваемых клеточных культур возможно применение метода суспензионных культур, при котором клетки находятся в жидкой среде во взвешенном состоянии. Модификацией данного метода является проточное культивирование, при котором в специальный аппарат (ферментер или роллерный культиватор) непрерывно добавляют свежую питательную среду и удаляют отработанную. Подобный метод позволяет в любой момент получить значительные количества клеточной массы для культивирования вирусов; он применяется, как правило, в крупных лабораториях или при промышленном производстве вакцин.

Полуперевиваемые (диплоидные) культуры. В результате нескольких последовательных пассажей иногда формируется так называемая диплоидная культура – популяция фибробластоподобных клеток, которые способны к быстрому размножению, выдерживают от 30 до 60 пассажей и сохраняют исходный набор хромосом. Диплоидные клетки человека высокочувствительны к ряду вирусов и широко используются в вирусологии, занимая промежуточное положение между первичными и перевиваемыми клеточными культурами.

Получены культуры диплоидных клеток человека (PW-38, MRC-5, MRC-9, IMR-90 и др.), а также коровы, свиньи, овцы, ягненка.

Питательные среды для культур клеток. В составе этих сред имеется полный набор аминокислот, витамины, ростовые факторы. Наряду с сухими средами и отдельными компонентами выпускают готовые жидкие среды (199, Игла, гидролизат лактальбумина, сухие среды и концентраты), которые перед использованием обычно разводят в воде.

Культуральные среды делят на ростовые и поддерживающие. Для выращивания клеточных культур применяются ростовые среды, обогащенные сыворотками животных и человека, например бычья сыворотка, фетальная (эмбриональная) коро-

вья сыворотка и др. Количество сыворотки в питательной среде обычно составляет от 2 % до 30 % и зависит от свойств культуры клеток и состава среды.

Поддерживающие среды. Их применяют для сохранения выросших монослоев клеток после заражения их вирусами. Эти среды содержат меньшее количество сыворотки или добавляются к культуре без нее. Перед использованием среды в нее вносят антибиотики для предотвращения роста случайно попавших микроорганизмов. Культуральные среды стерилизуют, а при наличии нестабильных компонентов – фильтруют. Оптимальные значения pH питательных сред (от 7,2 до 7,6) поддерживают с помощью буферных систем (чаще всего используют бикарбонатный буфер). В среды добавляют индикатор феноловый красный, который становится оранжево-желтым при закислении и малиновым при защелачивании среды.

Культивирование клеток вне организма требует выполнения ряда условий. Одним из них является строгое соблюдение стерильности при работе, т.к. используемые питательные среды служат отличным питательным субстратом также для бактерий и грибов. Клетки тканей обладают весьма высокой чувствительностью к солям тяжелых металлов. Поэтому необходимо придавать исключительное значение качеству различных ингредиентов, входящих в состав солевых растворов и питательных сред, а также способам обработки посуды и резиновых пробок, применяемых при культивировании клеток.

Одним из обязательных условий успешной работы с клетками является высокое качество дистиллированной воды (проверяется 2 раза в неделю). Для работы с клетками используют бидистиллированную или деионизированную воду. Лучшими дистилляторами являются приборы из стекла или легированной стали: из такой аппаратуры не вымываются ионы тяжелых металлов, являющиеся токсичными для клеток. Деионизированную воду получают на специальных установках, где очистка воды от солей осуществляется при ее последовательном прохождении через колонки с анионитом и катионитом.

При культивировании клеток особенно большие требования предъявляют к подготовке и стерилизации посуды и пробок. Во многих случаях именно неправильные их мойка и стерилизация служат причиной неприкрепления клеток к стеклу или

быстрой дегенерации клеточного монослоя. Обработка стеклянной посуды для культур клеток состоит из нескольких этапов.

1 Тщательное мытье с помощью ерша в горячей воде нейтральным моющим средством.

2 Многократное промывание (с трехкратной сменой) дистиллированной водой.

3 Сушка в сушильном шкафу при температуре от 80 °С до 100 °С.

4 Матрацы для культивирования клеток закрывают фольгой или бумагой; пипетки с тупого конца закрывают ватой, обёртывают бумагой и укладывают в металлические пеналы по 10 или 30 шт. Пробирки закрывают фольгой, укладывая в пачки по 10 шт., и заворачивают в бумагу. Чашки Петри обёртывают бумагой по 1, 2, 3 шт. Стеклянную посуду стерилизуют сухим жаром от 3 до 4 ч при 180 °С в сухожаровом шкафу.

Новую стеклянную посуду моют теплой водой с моющим порошком, ополаскивают раствором хромпика, тщательно промывают водопроводной водой в течение 15 мин. После этого обрабатывают посуду по приведенной методике.

Использованную посуду автоклавируют при 130 °С в течение 30 мин, затем заливают на 24 ч 5 % раствором хлорамина. Затем промывают не менее 3 раз водопроводной водой и обрабатывают по приведенной ранее методике.

Металлические инструменты моют в горячей воде с мылом, промывают водопроводной и дистиллированной водой. Стерилизуют кипячением в дистиллированной воде в течение 30 мин. Во время работы в стерильном боксе металлические инструменты держат в стакане с 96 % этиловым спиртом, перед использованием обжигают. Новые резиновые пробки кипятят в 2 % растворе соды в течение 30 мин и 5 раз промывают водопроводной водой, дважды повторяя кипячение и промывку. Затем кипятят 30 мин в дистиллированной воде, сушат при комнатной температуре, укладывают в пачки, стерилизуют в паровом стерилизаторе.

Пробки, бывшие в употреблении, кипятят 30 мин в водопроводной воде с нейтральным порошком, промывают водопроводной и дистиллированной водой, затем кипятят в дистиллированной воде 30 мин и обрабатывают по приведенной методике.

Для роста и размножения клеток вне организма необходим сложный комплекс физико-химических факторов: определенная температура, концентрация водородных ионов, неорганические соединения, углеводы, аминокислоты, белки, витамины, кислород и углекислота. Чтобы обеспечить все эти требования для культивирования вирусов в культурах клеток, используют сложные по составу питательные среды. По характеру компонентов, входящих в их состав, эти среды делят на две группы.

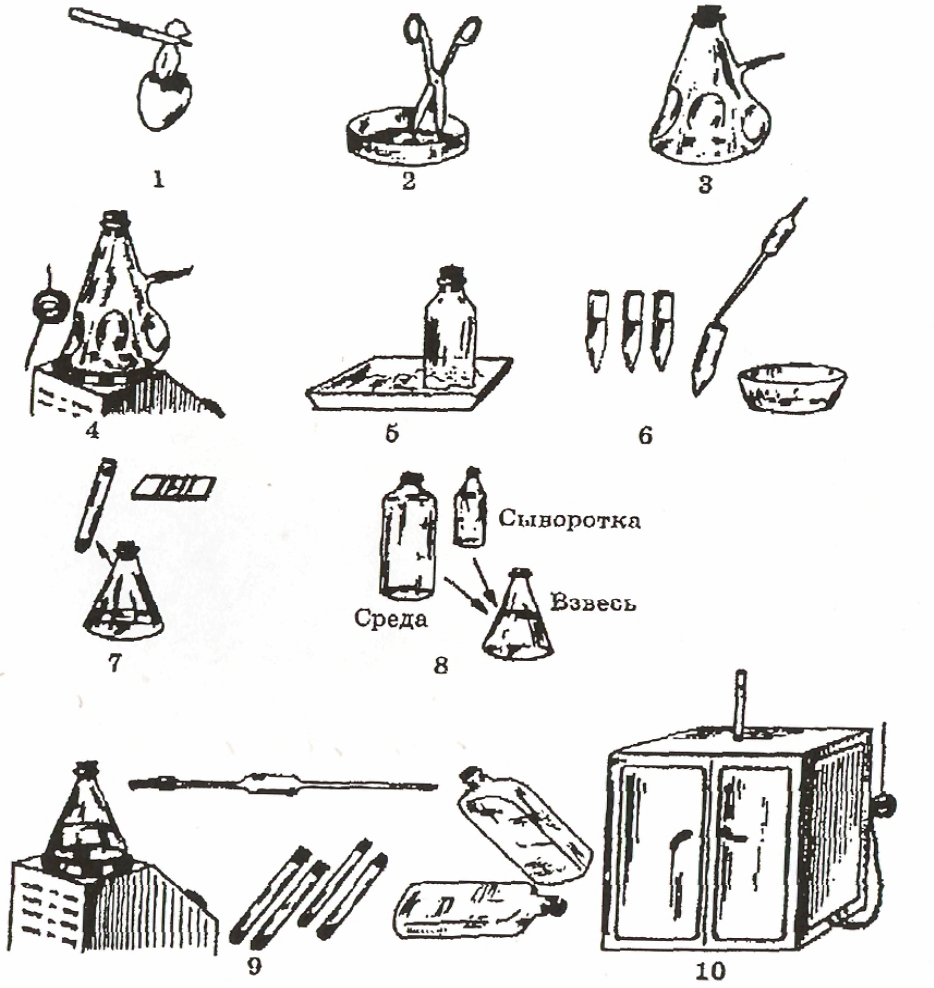
1 Среды, представляющие смеси солевых растворов (Хенкса, Эрла и др.) и естественных компонентов (сыворотка крови животных и человека, гидролизат альбумина). Количество каждого из этих компонентов в разных прописях сред значительно варьирует.

2 Синтетические и полусинтетические среды, состоящие из солевых растворов (Эрла, Хенкса и др.) с добавлением аминокислот, витаминов, коэнзимов и нуклеотидов (среды Игла, 199 и др.). В синтетических средах клетки могут существовать в жизнеспособном состоянии непродолжительное время (до 7 дней). Для более длительного поддержания их в жизнеспособном состоянии, а также для создания лучших условий роста и размножения клеток к синтетическим средам добавляют сыворотку животных (коров, телят и др.).

Для выделения вирусов могут быть использованы разные методы культивирования клеток вне организма. Однако в настоящее время наибольшее практическое применение получили однослойные культуры первично-трипсинизированных и перевиваемых линий клеток. Однослойные культуры клеток выращивают в стеклянных плоскостенных сосудах-матрацах вместимостью 1 л, 250 мл и 100 мл или в обычных бактериологических пробирках, обработанных соответствующим способом.

При использовании первично-трипсинизированных культур клеток сущность метода заключается в разрушении межклеточных связей в тканях протеолитическими ферментами и разобщении клеток для выращивания монослоя на поверхности стекла. Источником получения клеток могут служить ткани и органы эмбрионов человека и животных, забитых животных и птиц, а также извлеченные у человека при операции. Используют нормальные и злокачественные перерожденные ткани, эпи-

телиальные, фибробластического типа и смешанные. Способность к размножению клеток, извлеченных из организма, тесно связана со степенью дифференциации ткани. Чем меньше дифференцирована ткань, тем более интенсивной способностью пролиферации обладают ее клетки *in vitro*. Поэтому клетки эмбриональных и опухолевых тканей значительно легче культивировать вне организма, чем нормальные клетки взрослых животных. Схема получения культуры клеток из куриных эмбрионов представлена на рисунке 43.



1 – извлечение эмбриона; 2 – отсечение головы, измельчение; 3 – многократное промывание; 4 – трипсинизация; 5 – объединение взвеси клеток в сосуде на тающем льду; 6 – центрифугирование и удаление трипсина; 7 – ресуспензирование осадка в небольшом количестве среды, подсчет; 8 – доведение до нужной концентрации; 9 – посев клеток в сосуды; 10 – термостатирование.

Рисунок 43 – Схема получения культуры клеток

Ткань, подготовленную к трипсинизации, переносят в чашку Петри и в асептических условиях измельчают ножницами до размера от 2 мм до 4 мм. Кусочки тщательно отмывают от крови солевым раствором и пинцетом переносят в колбу для трипсинизации. Наибольший выход жизнеспособных клеток при диспергировании тканей дает трипсин в 0,25 % концентрации. Кусочки ткани в колбе заливают двойным объемом 0,25 % раствора трипсина, подогретого до температуры от 32 °С до 37 °С, и помещают в термостат. Ткани взрослых животных инкубируют при 37 °С – 30 мин, эмбрионов – 10 мин. Во время инкубации ткань периодически перемешивают путем вращения колбы. Надосадочную жидкость, содержащую взвесь клеток, отсасывают в центрифужные пробирки, а ткань заливают повой порцией трипсина. Дробную трипсинизацию проводят до полного истощения ткани, о чем судят по прозрачности надосадочной жидкости. Собранные порции надосадочной жидкости центрифугируют при 1000 об/мин в течение 5 мин. После центрифугирования надосадочную жидкость удаляют, а осадок клеток однократно отмывают солевым раствором. Взвесь клеток контролируют на стерильность путем посева по 0,1 мл в пробирки с сахарным бульоном. Затем подсчитывают клетки в камере Горяева. После подсчета взвесь клеток разводят питательной средой с таким расчетом, чтобы в 1 мл содержалось от 2×10^5 до 3×10^5 клеток, и разливают в пробирки от 1 мл до 1,5 мл; в матрацы, вместимостью 1 л, 250 мл и 100 мл, вносят соответственно 100 мл, 40 мл и 15 мл взвеси клеток.

Пробирки и матрацы с суспензией клеток плотно закрывают резиновыми пробками (для предупреждения улетучивания CO_2 и защелачивания среды) и помещают в термостат при 37 °С. Матрацы располагают в горизонтальном положении, а пробирки укладывают на лотки или специальные подставки под углом от 5° до 10°.

Ежедневно культуры просматривают под малым увеличением микроскопа для определения характера их роста. Если клетки не пролиферируют, они выглядят округлыми, зернистыми, темными и отслаиваются от стекла, это свидетельствует о плохой обработке посуды или токсичности ингредиентов питательной среды.

Наряду с первично-трипсинизированными тканями, для культивирования ви-

русов широко используют культуры перевиваемых клеток, т.е. культуры клеток, способных к размножению вне организма неопределенно длительное время. Наиболее часто применяют культуры клеток, полученные из нормальных и раковых тканей человека. Широкую известность приобрела линия клеток HeLa, полученная из опухоли шейки матки, Нер-2 – из карциномы гортани, КВ – из ткани рака полости рта. Готовят такие культуры клеток и из нормальных тканей животных – почки обезьяны, кролика и эмбриона свиньи.

Для пересева перевиваемых клеток питательную среду отсасывают пипеткой и выливают. Сформировавшийся тонкий слой клеток разрушают 0,25 % раствором трипсина или 0,02 % раствором версена и освобожденные таким образом клетки переносят в новый сосуд со свежим питательным раствором, где вновь образуется монослой клеток.

10.2.2 Инфицирование живых систем вируссодержащим материалом

10.2.2.1 Культуры клеток

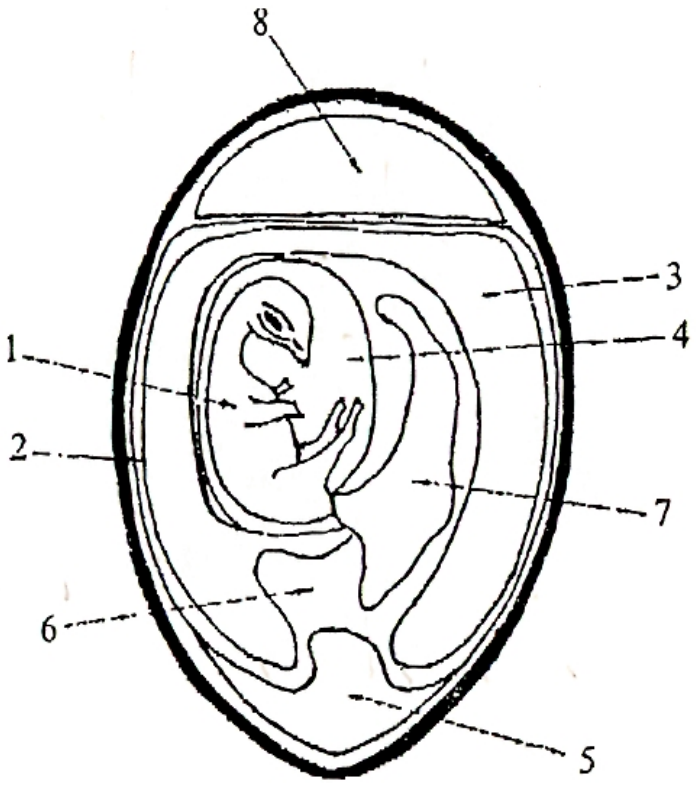
При выделении вирусов из различных инфекционных материалов в каждом случае применяют культуры клеток, обладающие наибольшей чувствительностью к предполагаемому вирусу. Для выделения вируса отбирают пробирки со сформированным монослоем, сливают питательную среду и промывают клетки несколько раз раствором Хенкса для удаления сывороточных антител и ингибиторов. В каждую пробирку вносят от 0,1 мл до 0,2 мл материала, специально подготовленного для вирусологического исследования.

В 4, 5, 6 пробирок с культурами клеток каждой пробы исследуемого материала вводят вирусы. Чтобы исследуемый материал (фекалии и др.) не оказывал токсического действия на монослой клеток, его предварительно разводят в 1 мл питательной среды. После контакта вируса с клетками от 30 до 60 мин при комнатной температуре в пробирки вносят 1,5 мл поддерживающей среды (питательная среда без добавления сыворотки крови телят). Заражение культуры инкубируют при температу-

ре от 35 °С до 37 °С. Температура и срок инкубации культур определяются свойствами вируса.

10.2.2.2 Куриные эмбрионы

В тканях эмбриона, его оболочках, желточном мешке способны размножаться многие патогенные вирусы человека и животных. При этом имеет значение избирательность вирусов к той или иной ткани: вирусы группы оспы хорошо репродуцируются и накапливаются в клетках хорион-аллантоисной оболочки, вирус паротита – в амнионе, вирусы гриппа – в амнионе и аллантоисе, вирус бешенства – в желточном мешке. Строение 12-дневного куриного эмбриона представлено на рисунке 44.



1 – эмбрион; 2 – хорион-аллантоисная оболочка; 3 – аллантоисная полость; 4 – амниотическая полость; 5 – белок; 6 – экстраэмбриональная полость; 7 – желточный мешок; 8 – воздушная полость.

Рисунок 44 – Строение 12-дневного куриного эмбриона

Метод культивирования вирусов в развивающихся эмбрионах имеет ряд преимуществ перед другими методами:

- плотная скорлупа довольно надежно защищает внутреннее содержимое от микроорганизмов;
- эмбрионы не имеют антител и восприимчивы ко многим группам вирусов;
- при заражении куриных эмбрионов получают больший, чем при других методах культивирования, выход вируссодержащего материала;
- метод заражения куриных эмбрионов прост и доступен любым вирусологическим лабораториям, эмбрионы обладают достаточной жизнеспособностью и устойчивостью к возбудителям внешних факторов.

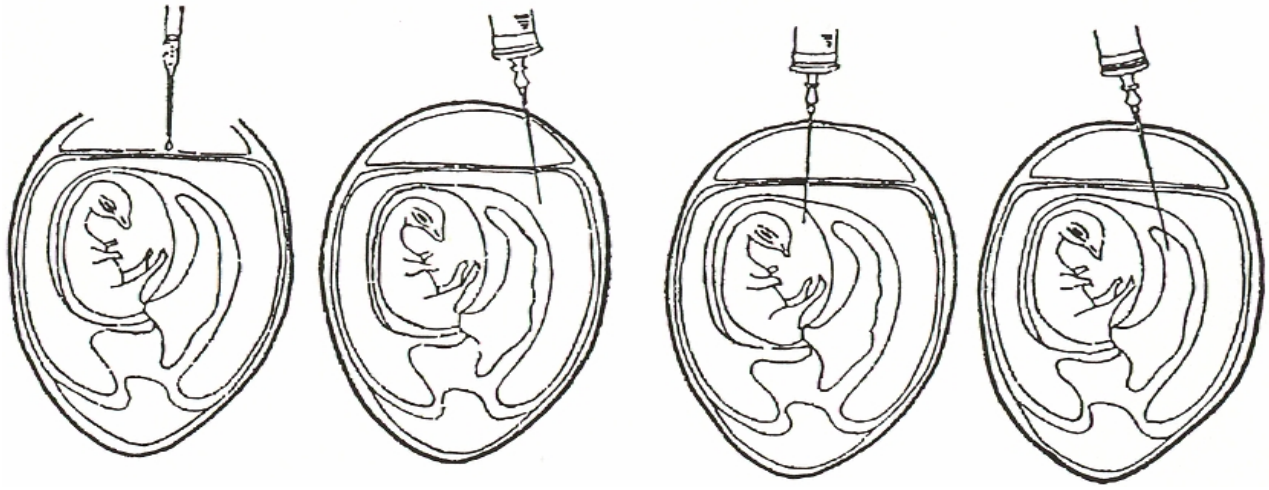
Однако куриные эмбрионы не всегда свободны от латентных вирусных и бактериальных инфекций. Трудно наблюдать за динамикой патологических изменений, происходящих в эмбрионе после заражения его вирусом. При вскрытии зараженных эмбрионов часто не обнаруживают видимых изменений и выявляют вирус с помощью реакции гемагглютинации и другими методами. В зараженных эмбрионах невозможно проследить за нарастанием титра антител. Метод культивирования в куриных эмбрионах пригоден не для всех вирусов.

Для вирусологических исследований используют эмбрионы 7-12-дневного возраста, которые получают из птицеводческих хозяйств. Можно выращивать эмбрионы в обычном термостате, на дно которого ставят лотки с водой для увлажнения воздуха. Температура в термостате должна быть 37 °С, а влажность воздуха – от 60 % до 65 %. Отбирают крупные, чистые (но немытые), оплодотворенные яйца от белых кур, хранившиеся не более 10 суток при температуре от 5 °С до 10 °С. Оплодотворенные яйца распознают по наличию зародышевого диска, который при просвечивании с помощью овоскопа имеет вид темного пятнышка. В термостате яйца содержат на специальных деревянных или металлических подставках, имеющих несколько рядов отверстий размером от 3,5 до 4 см. В процессе инкубации яйца следует ежедневно выносить из термостата на время от 20 до 30 мин для проветривания и периодически просматривать их в затемненной комнате под овоскопом с целью кон-

троля за развитием эмбриона.

При работе с вирусами могут быть использованы различные методы заражения эмбрионов, но наибольшее практическое применение получили нанесение вируса на хорион-аллантоисную оболочку, введение в аллантоисную, амниотическую полости и желточный мешок (рисунок 45). Выбор метода зависит от биологических свойств изучаемого вируса. Перед заражением определяют жизнеспособность эмбриона на овоскопе. Живые эмбрионы подвижны, хорошо видна пульсация сосудов оболочек. При овоскопировании отмечают простым карандашом на скорлупе границы воздушного мешка или место расположения эмбриона, которое определяют по его тени на скорлупе.

Куриные эмбрионы заражают в боксе в строго асептических условиях, используя инструменты, стерилизованные кипячением. При любом методе заражения скорлупу над воздушным пространством прожигают на огне, затем смазывают 2 % йодной настойкой, снова протирают спиртом и обжигают.



а **б** **в** **г**

а – заражение на хорион-аллантоисную оболочку; б – заражение в аллантоисную полость; в – заражение в амниотическую полость; г – заражение в желточный мешок.

Рисунок 45 – Методы заражения куриных эмбрионов вируссодержащим материалом

При заражении на хорион-аллантоисную оболочку наиболее пригодны 12-дневные эмбрионы (рисунок 45 а). Яйцо берут в левую руку, изогнутыми ножницами срезая скорлупу несколько выше границы воздушного пространства. Пинцетом осторожно снимают часть подскорлупной оболочки, обнажая лежащую под ней хорион-аллантоисную оболочку. Исследуемый материал наносят на хорион-аллантоисную оболочку в объеме от 0,1 мл до 0,2 мл. Отверстие в скорлупе закрывают стерильным стеклянным колпачком или покровным стеклом и заливают расплавленным парафином или воском. На боковой поверхности зараженных яиц простым карандашом пишут дату заражения, название материала и его дозу.

Для заражения в аллантоисную полость используют эмбрионы 10-11-дневного возраста (рисунок 45 б). Эмбрион заражают через воздушное пространство 4-х сантиметровой иглой, помещают его тупым концом вверх и копьем делают прокол в дезинфицированной скорлупе над центром воздушного мешка. Через отверстие в скорлупе вводят в вертикальном направлении на глубину примерно 2 см иглу шприца, которая проходит через воздушное пространство, хорион-аллантоисную оболочку и попадает в аллантоисную полость. Материал инкубируют в объеме от 0,1 мл до 0,2 мл. Отверстие в скорлупе заливают парафином.

Для заражения в амниотическую полость применяют эмбрионы 7-11-дневного возраста (рисунок 45 в). Заражение следует выполнять в затемненном боксе. Скорлупу над воздушным пространством прокалывают в центре. Яйцо укладывают на овоскоп тупым концом направо и через отверстие в скорлупе вводят по направлению к эмбриону иглу шприца с материалом. При попадании в амниотическую полость наблюдается смещение тени эмбриона. Объем вводимого материала – 0,1 мл. После заражения отверстие в скорлупе заливают парафином.

Для заражения в желточный мешок используют эмбрионы 7-дневного возраста (рисунок 45 г). В скорлупе над воздушным мешком в центре прокалывают отверстие. Яйцо помещают на подставку тупым концом вправо так, чтобы желточный мешок был обращен вверх (сторона яйца, противоположная той, где расположен эмбрион). Через отверстие в скорлупе вводят в горизонтальном направлении на глубину 3 см иглу шприца. Материал вводят в желточный мешок в объеме от 0,2 мл до

0,3 мл. Отверстие в скорлупе заливают парафином.

Зараженные эмбрионы устанавливают на подставках тупым концом вверх. Температурный режим и срок инкубации зависят от биологических свойств инокулированного вируса. Ежедневно жизнеспособность эмбрионов контролируют под овоскопом. Эмбрионы, погибшие в первые сутки после заражения вследствие травмы, не исследуют.

Титрованием вируса называют количественное определение инфекционности исследуемого препарата. Наименьшее количество вируса, способное вызвать у чувствительного хозяина распознаваемое проявление инфекции, называется *инфекционной единицей.* Титр исходной вирусной суспензии выражается в количестве инфекционных единиц, содержащихся в 1 мл препарата. Чтобы вызвать инфекцию для большинства вирусов, в принципе достаточно одной вирусной частицы. Вместе с тем число инфекционных единиц, выявляемых при титровании, всегда существенно ниже числа физических частиц, подсчитанных, например, с помощью электронного микроскопа. Основные причины этого явления заключаются в том, что часть вирионов в суспензии по тем или иным обстоятельствам не инфекционна и, главное, что любая система для определения инфекционности имеет ограниченную чувствительность. Поэтому получаемая величина титра вируса всегда зависит не только от его количества в исходном препарате, но и от способа выделения вируса, свойств хозяина и т.п.

Как правило, обязательным компонентом титрования является тест, позволяющий оценить результат инокуляции как положительный или отрицательный, например наличие или отсутствие поражений в культуре клеток, характерная реакция или ее отсутствие у животного, гибель или выживание животных, наличие или отсутствие специфических гемагглютининов в аллантоисной полости куриных эмбрионов и т.п.

Наиболее точные результаты при титровании вирусов животных дают методы, в основе которых лежит подсчет числа дискретных поражений, в частности бляшек, при заражении культуры тканей. Некоторые вирусы, например вирус гриппа, сложно оттитровать методом бляшек, в этом случае инфекционность препарата оценива-

ют при помощи титрования по методу конечных разведений.

Согласно этому методу, чувствительным хозяевам вводят определенный объем суспензии вируса в последовательно возрастающих разведениях и, учитывая результат каждого введения как положительный или отрицательный, рассчитывают конечную точку титрования. В случае вируса гриппа результат оценивают как положительный, если через 48 ч после заражения жидкость эмбрионов будет вызывать агглютинацию куриных эритроцитов.

При проведении титрования подобного типа наблюдается зона, в которой одно разведение может дать отрицательный результат, а следующее, большее – положительный, что объясняется случайным характером распределения вирусных частиц.

10.3 Биологический метод

В основе метода лежит экспериментальная инфекция на животных. В биологическом методе диагностики при воспроизведении экспериментальной инфекции могут быть изучены закономерности инфекционного процесса. Заражение экспериментальных животных может производиться с целью:

1) изучения вирулентности микробов;

2) воспроизведения и изучения инфекционного процесса;

3) испытания лечебного эффекта химиотерапевтических и иммунологических препаратов;

4) выделения чистой культуры возбудителя и ее идентификации.

В зависимости от цели исследования пользуются различными способами заражения: внутрикожным, подкожным, внутримышечным, внутрибрюшинным, внутривенным, пероральным или эндоназальным. Во всех случаях, за исключением перорального и эндоназального способов, заражение осуществляется с помощью шприца. Вскрытие трупов животных производится стерильными инструментами, соблюдая правила асептики. При вскрытии производят осмотр органов, осуществляют посев тканей и органов на питательные среды для бактериологического исследования, готовят мазки-отпечатки для обнаружения микроорганизмов, для изучения

их вирулентных свойств (обнаружение капсулы). Для оценки степени вирулентности микробов определяют LD_{50} (доза микробов, вызывающая гибель 50 % зараженных животных), а затем выделяют чистую культуру и изучают ее вирулентные свойства.

Изменения, обнаруженные при вскрытии трупа животного, а также результаты бактериологического исследования вносят в протокол вскрытия.

После гибели животного производится вскрытие трупа с целью обнаружения возбудителя путем микроскопического исследования мазков-отпечатков из органов и выделения чистой культуры:

- на специальную доску, покрытую ватой, смоченной дезинфицирующим раствором, помещают труп мышки вверх брюшком и фиксируют за лапки металлическими булавками;
- вскрытие трупа производят стерильными инструментами;
- проводят препаровку кожи от подлежащей ткани, вскрывают грудную полость, делают посев крови из сердца на кровяной агар и готовят мазок на предметном стекле;
- вскрывают брюшную полость, осматривают органы брюшной полости, проводят посев ткани печени и селезенки (при необходимости других органов и тканей) на кровяной агар и готовят мазки-отпечатки из этих органов на предметном стекле. Микропрепараты окрашивают, исследуют на обнаружение вирусов.

Помимо этого экспериментальные животные в вирусологии применяются для следующих целей:

- диагностики вирусных инфекций (выделение, накопление, типирование и титрование вирусов);
- получения иммунных противовирусных сывороток и ингредиентов крови (эритроцитов, лейкоцитов, плазмы и т.д.);
- моделирования вирусных инфекций для изучения патогенеза, иммунитета, патоморфологии и т.д.;
- разработки способов специфической и неспецифической профилактики и

лечения.

Лабораторных животных используют главным образом для выделения вирусов, не вызывающих развития цитопатических изменений в культурах клеток и не размножающихся в куриных эмбрионах. Использование лабораторных животных позволяет также по клиническому симптомокомплексу идентифицировать характер вирусной инфекции, ставить реакцию нейтрализации, путем пассажей поддерживать лабораторные штаммы вирусов, сохранять антигенные свойства и активность вирусов, изучать в эксперименте течение вирусной инфекции и развитие иммунитета, получать диагностические и лечебно-профилактические вирусные препараты.

В качестве лабораторных животных, в зависимости от целей работ и вида исследуемых вирусов, чаще всего применяют белых мышей, хомяков, морских свинок, кроликов, реже – хорьков, кошек, собак. Из более крупных животных используют обезьян различных видов и некоторых других животных. Из птиц используют кур, гусей, уток. В последние годы чаще применяют новорожденных животных (более чувствительных к вирусам), «стерильных животных» (извлекают из матки и содержат в стерильных условиях с использованием стерильного воздуха и стерилизованного корма) и животных чистых линий с известной наследственностью (инбредные или линейные животные).

К лабораторным животным предъявляют весьма строгие требования. Животные должны быть в достаточной степени восприимчивы к инфекции данным вирусом и не нести в себе латентной инфекции и каких-либо паразитов. Имеют значение также вид животного, порода, возраст, масса, пол, упитанность, условия содержания. В опыт берут животных одного вида и возраста и содержат их в одинаковых условиях. Иногда используют разные виды животных, обладающих различной чувствительностью к одному и тому же вирусу, что помогает выявить разнообразные формы инфекции.

В эксперимент берут только здоровых животных, лучше из одного питомника и одной партии. Температуру тела измеряют в одно и то же время, т.к. имеются суточные колебания ее.

Для маркировки применяют следующие приемы метки лабораторных живот-

ных: маркировка красками – нанесение краски на различные участки тела животного, татуировка уха тушью, надрезы и насечки ушной раковины, обозначение нумерованными бирками и кольцами, ампутация пальцев.

Исследуемый материал вводят с учетом тропизма вирусов к определенным тканям. Так, для выделения нейротропных вирусов материал вводят в мозг, для выделения пневмотропных – через нос. Внутримозговое заражение новорожденных мышей лучше производить специальной тонкой иглой. Место инъекции середина расстояния между наружным слуховым проходом и наружным краем глаза. При внутрибрюшном заражении крыс или мышей держат головой вниз. Иглу вводят несколько в сторону от средней линии живота в средней его трети на глубину не более 0,5 см. При подкожном заражении иглу вводят под кожу в межлопаточном пространстве и продвигают к хвосту.

Кровь у мышей берут из сердца или после декапитации; у крыс – пункцией сердца или насечек на ушных раковинах или на хвосте; у морских свинок – из сердца, а также из насечек по краю уха, а у кроликов – путем надреза или прокола краевой вены уха. Если животных необходимо убить, то их умерщвляют хлороформом, эфиром или введением воздуха в вену. Приготовление взвесей тканей зараженных животных, обработку органов и другие манипуляции с вируссодержащим материалом проводят в боксах, которые систематически (не реже одного раза в неделю) обрабатывают 5 % раствором хлорамина или другим дезинфицирующим раствором.

Результаты выделения вируса считают положительными, если у животного после соответствующего инкубационного периода развиваются симптомы инфекции.

10.3.1 Выявление (индикация) вирусов

В большинстве случаев перед обнаружением вируса в живой системе его следует освободить от компонентов клеток хозяина. Для этого предусмотрены следующие процедуры:

1) для разрушения клеток в материале используют трехкратное замораживание;

вание с последующим оттаиванием или растирание материала в гомогенизаторе со стерильным песком или стеклянными бусами;

2) для очистки от клеточного детрита и посторонних примесей полученный таким образом материал подвергают центрифугированию с последующим исследованием надосадочной жидкости или пропускают через бактериальные фильтры. При этом вирус ввиду малых размеров не осаждается при центрифугировании и не задерживается бактериальными фильтрами, оставаясь в жидкости;

3) полученный материал обрабатывают антибиотиками для деконтаминации и предотвращения бактериального загрязнения.

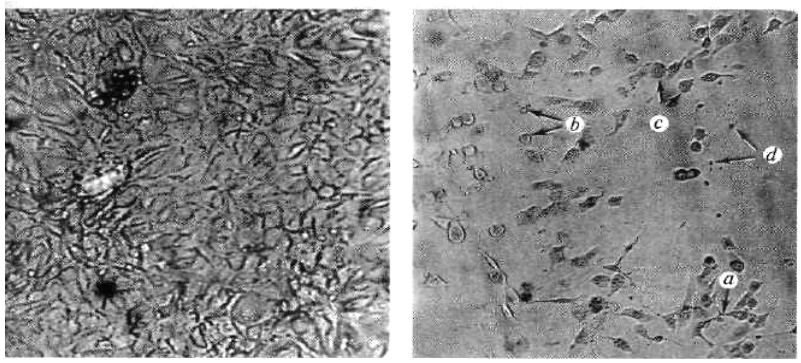
Полученный таким образом материал принято называть вируссодержащим материалом.

Для выявления вирусов в зараженном объекте в настоящее время применяют различные способы (рисунок 46):

Рисунок 46 – Методы выявления вирусов в зараженном объекте

10.3.1.1 Выявление по цитопатическому действию (ЦПД)

Обнаружение ЦПД вирусов в культуре клеток микроскопическим способом. ЦПД представляет собой дегенеративные изменения в клетках, которые появляются в результате репродукции в них вирусов. Одни вирусы проявляют ЦПД в первые дни после заражения культур клеток (вирус оспы, полиомиелита и др.), другие – значительно позже, иногда спустя 2 недели после заражения (аденовирусы, вирусы парагриппа и др.). Характер ЦПД зависит в основном от вида вируса (рисунок 47).



А Б

А – незараженный монослой; Б – зараженный монослой: видно разрушение монослоя и признаки клеточной дегенерации (a – сморщивание и образование звездчатых клеток; b – округление клеток; c – вздутие клеток; d – лизис и образование гранулярного детрита).

Рисунок 47 – Цитопатическое действие вируса полиомиелита на культуре клеток почки обезьяны в неокрашенных препаратах

Различают полную и частичную дегенерацию клеток монослоя. При полной дегенерации, вызываемой, например, вирусами полиомиелита, Коксаки и ECHO, клетки монослоя подвергаются значительным изменениям, большее их количество слущивается со стекла. Остающиеся единичные клетки сморщены (пикноз ядра и цитоплазмы), для них характерно двойное лучепреломление – сильное свечение при микроскопии. Частичная дегенерация культур клеток имеет несколько разновидностей:

а) по типу гроздеобразования – клетки округляются, увеличиваются, частично сливаются между собой с образованием особых гроздевидных скоплений (характерна для аденовирусов);

б) по типу очаговой деструкции – на фоне в целом сохранившегося монослоя появляются очаги пораженных клеток – микробляшки (характерна для некоторых штаммов вирусов оспы, гриппа);

в) по типу симпластообразования – под действием вирусов клетки сливаются между собой с образованием гигантских многоядерных клеток – симпластов, синцитиев (характерна для вирусов кори, паротита, парагриппа, респираторно-синцитиального, герпеса, иммунодефицита человека).

Пролиферативный тип изменений характерен для некоторых онкогенных вирусов, трансформирующих клетки в злокачественные, что проявляется в приобретении ими способности к неограниченному делению.

Если в инфицированных культурах клеток ЦПД отсутствует или слабо выражено, проводят «слепые пассажи», т.е. заражают культуральной жидкостью новые культуры клеток.

Выявление по цветной пробе. Принцип данного теста заключается в следующем. В результате жизнедеятельности клеток в питательной среде накапливаются кислые продукты. В результате цвет входящего в состав среды индикатора (фенолового красного) становится оранжевым. При заражении культуры клеток такими цитопатогенными вирусами, как энтеровирусы или реовирусы, метаболизм клеток подавляется, pH среды и ее цвет не изменяются (она остается красной).

Выявление по образованию бляшек (РБО). Репродуцируясь в культурах клеток, вирусы вызывают разного рода ЦПД, выражающееся в округлении, сморщивании, уменьшении или, наоборот, увеличении размеров клеток, слиянии их и образовании симпластов, деструкции цитоплазмы и ядра. Наконец, в монослое клеток, зараженных вирусами в результате разрушения ими отдельных участков клеточного пласта, могут появляться «стерильные пятна», или бляшки, представляющие собой клон вирусной частицы, что дает возможность не только изолировать вирус, но и определить его титр. Для этого из флакона с монослойной культурой кле-

ток удаляют питательную среду и заражают ее вирусом. После адсорбции вируса на клетках через промежуток времени от 30 до 60 минут культуру клеток быстро покрывают 3 % расплавленным агаром, содержащим лошадиную сыворотку, солевые добавки и индикатор нейтральный красный. В монослое, где происходит нормальный рост клеток, среда подкисляется, и индикатор окрашивает его в розовый цвет. Пораженные вирусом клетки прекращают метаболизм, pH не меняется, и в этих местах четко обозначаются островки неокрашенной среды в виде беловатых бляшек различных размеров и конфигураций.

Бляшки вирусов представляют собой очаги разрушенных вирусом клеток монослоя под агаровым покрытием. Вирусные бляшки подсчитывают для количественного анализа инфекционной активности вирусов.

Для получения бляшек разные разведения вирусной суспензии наносят на однослойные культуры ткани в плоских флаконах или чашках Петри и покрывают их слоем агарового покрытия. При этом репродукция вируса и ЦПД ограничиваются только первоначально инфицированными и соседними с ними клетками. Очаги клеточной дегенерации (бляшки) выявляют путем окрашивания культуры нейтральным красным, который либо включают в состав агарового покрытия, либо добавляют непосредственно перед учетом результатов. Бляшки состоят из погибших клеток, не окрашиваются нейтральным красным и поэтому выглядят в виде светлых пятен на фоне розово-красного монослоя.

Известны и другие способы выявления вирусных бляшек в культурах клеток. Так, например, используется определение бляшек под бентонитовым покрытием. Мелкодисперсный очищенный бентонит добавляют к жидкой питательной среде, и этой смесью заливают инфицированный монослой клеток. В результате адсорбции частиц бентонита на поверхности клеток монослой приобретает молочный цвет. В месте размножения вируса, где клетки частично или полностью слущены со стекла, бентонитовое покрытие нарушено (бляшки).

Для выявления вирусных бляшек под бентонитовым питательным покрытием применяют многослойные культуры перевиваемых клеток человека или животных, чувствительные к исследуемому вирусу, пригодны 2-суточные негустые монослои

клеток. Готовят 10-кратные разведения из исследуемого материала, каждым разведением инфицируют не менее двух матрацев (колб Эрленмейера или пенициллиновых флаконов) с культурой клеток. После адсорбции вируса (от 30 до 40 мин) монослои от 3 до 4 раз отмывают стерильным ИХН и заливают бентонитовым питательным покрытием: бидистиллированная вода – 415 мл, 6 %-й гель бентонита – 5 мл, раствор Эрла (десятикратный концентрат) – 50 мл, нативная бычья сыворотка – 15 мл, 7,5 %-й раствор гидрокарбоната натрия – 15 мл, пенициллин – 200 ЕД/мл, стрептомицин или линкомицин – 100 ЕД/мл. Монослой зараженных клеток в колбах Эрленмейера емкостью 50 мл заливают от 20 мл до 30 мл бентонитового покрытия, а монослой клеток на дне пенициллинового флакона – от 5 мл до 6 мл.

Гель бентонита получают из сухого минерала. Чтобы улучшить сорбционные свойства бентонита, его насыщают катионами натрия. Затем его стерилизуют 40 мин при 111 °С. Сорбционные свойства геля бентонита не изменяются в процессе хранения при комнатной температуре в течение ряда лет.

Время бляшкообразования под бентонитовым покрытием для различных вирусов неодинаково. Результаты образования бляшек для энтеровирусов, например, учитывают через промежуток времени от 36 до 48 ч. Культуральные сосуды переворачивают монослоем вверх, смывая средой дегенерировавшие клетки. Бляшки, образуемые различными типами энтеровирусов, отличаются по величине, интенсивности развития и характеру краев. Поскольку одна вирусная инфекционная частица (вирион) образует одну бляшку, метод бляшкообразования позволяет точно определить количество инфекционных единиц в материале, а также измерить нейтрализующую активность вирусных антител.

10.3.1.2 Выявление по реакции гемадсорбции (РГАд)

Реакцию гемадсорбции (РГАд) применяют для индикации в зараженных культурах клеток вируса, обладающего гемагглютинирующей активностью. Сущность реакции заключается в том, что на поверхности клеток, зараженных вирусами, адсорбируются эритроциты, чувствительные к гемагглютинирующему действию ви-

русов. Так, например, на клетках, зараженных вирусом натуральной оспы, адсорбируются эритроциты кур; вирусом кори – эритроциты обезьян; аденовирусами – обезьян и крыс и др. (рисунок 48).

1 – островковый тип адсорбции эритроцитов на зараженных клетках; 2 – незараженные клетки.

Рисунок 48 – Реакция гемадсорбции

Методика РГадс следующая. Из пробирок с зараженными и незараженными культурами клеток удаляют питательную среду и вносят по 0,2 мл 0,4 % взвеси в изотоническом растворе хлорида натрия трижды отмытых эритроцитов. Пробирки оставляют в наклонном положении на промежуток времени от 20 до 30 мин при температуре 37 °С, 22 °С или 4 °С. Затем пробирки осторожно встряхивают и исследуют под малым увеличением микроскопа. На клетках монослоя, зараженных вирусом, наблюдается диффузная или локальная адсорбция эритроцитов в виде скоплений, гроздей и розеток. При отрицательном результате на монослое адсорбируются лишь единичные эритроциты. Гемадсорбция предотвращается обработкой зараженного вирусами монослоя специфической сывороткой.

Эта реакция позволяет выявить вирусы до развития ЦПД благодаря адсорбции эритроцитов на поверхности клеток, инфицированных гемадсорбирующими вирусами. Эти сложные вирусы имеют в составе супер-капсида специфические глико-

протеиды – гемагглютинины (например, орто- и парамиксовирусы). Для воспроизведения РГАд в культуру клеток (контрольную и зараженную вирусом) после определенного для каждого вируса срока инкубации добавляют 0,2 мл 0,5 %-й взвеси эритроцитов так, чтобы был покрыт монослой и оставляют ее на время от 15 до 20 мин при 4 °С, 20 °С или 37 °С (в зависимости от свойств вируса). Затем пробирки встряхивают для удаления неадсорбированных эритроцитов и учитывают под малым увеличением микроскопа скопление их на отдельных клетках или на всем монослое. На незараженных клетках эритроцитов не должно быть. Следует отметить, что не все вирусы, агглютинирующие эритроциты *in vitro*, способны вызывать гемадсорбцию в культуре клеток. Гемадсорбция наблюдается лишь в том случае, если в процессе взаимодействия вируса с клеткой вирусный гемагглютинин встраивается в структуру наружной клеточной мембраны и тем самым изменяет ее свойства.

10.3.1.3 Непосредственное выявление вирусных частиц

Выявление по внутриклеточным включениям. Внутриклеточные включения образуются при репродукции некоторых вирусов в цитоплазме и ядре клеток (оспы, бешенства, гриппа, герпеса и др.). Они представляют собой участки локализации вирусов и их компонентов в клетках. Включения обнаруживают при микроскопии после окраски монослоя по Романовскому-Гимзе или другими сложными методами, а также при люминесцентной микроскопии после обработки акридиновым оранжевым (1 : 20000).

Электронно-микроскопическое выявление (ЭМВ). Это исследование дает возможность в зависимости от вида вируса выявить в клетках отдельные вирионы и их кристаллоподобные скопления в ядре или цитоплазме. ЭМВ, как правило, используется для обнаружения возбудителей вирусных инфекций с типичной морфологией (оспенные вирусы), особенно в тех случаях, когда их не удается культивировать обычными методами (вирусы гепатитов А и В, ротавирусы). Вирусы, содержащиеся в исследуемом материале, очищают и концентрируют ультрацентрифугированием, колоночной хроматографией, адсорбцией с помощью специальных сорбен-

тов или антител. Последний способ лежит в основе метода иммунной электронной микроскопии (ИЭМ).

Препараты для ЭМВ готовят методом негативного контрастирования. Для этого смешивают равные объемы вирусной суспензии и 1 %-го раствора фосфорно-вольфрамовой кислоты («негативная краска») на формваруглеродной подложке. «Краска» окружает вирусную частицу и контрастирует наружную оболочку вириона, а иногда проникает внутрь капсида, в результате чего получают профильное изображение наружной оболочки. Для выявления вирусов в биологическом материале применяют также метод ультратонких срезов.

Выявление с помощью прямой РИФ.

Как и при ИЭМ, в данном случае происходит взаимодействие вирусных антигенов с АТ диагностической иммунной сыворотки или моноклональными антителами. С помощью РИФ также удается обнаружить специфический вирусный антиген в культурах клеток, инфицированных вирусом.

10.3.1.4 Обнаружение вируса в куриных эмбрионах

Перед сбором материала эмбрионы охлаждают при 4 °С в течение времени от 18 до 20 ч для сужения сосудов и предотвращения кровотечения при вскрытии. Эмбрионы вскрывают в боксе с соблюдением правил асептики. Скорлупу над воздушным пространством обрабатывают так же, как при заражении эмбрионов, и срезают ножницами на 3 мм выше границы прикрепления хорион-аллантоисной оболочки.

Аллантоисную жидкость насасывают пипеткой после прокола хорион-аллантоисной оболочки в месте, лишенном крупных кровеносных сосудов. В случае кровотечения вирус адсорбируется на эритроцитах, его активность снижается. От каждого эмбриона аллантоисную жидкость (от 6 мл до 10 мл) собирают отдельно, проверяют на бактериологическую стерильность путем посева от 0,1 мл до 0,2 мл в сахарный или мясопептонный бульон, проверяют на наличие вируса в реакции гемагглютинации и хранят при 4 °С в замороженном состоянии.

Для получения амниотической жидкости вначале отсасывают аллантоисную жидкость, затем пинцетом захватывают амниотическую оболочку, слегка приподнимают ее и пастеровской пипеткой отсасывают амниотическую жидкость. От одного эмбриона можно получить от 0,5 мл до 1 мл амниотической жидкости. Бактериологический контроль, проверка на наличие вируса и хранение амниотической жидкости осуществляется так же, как и аллантоисной жидкости.

При изучении изменений на хорион-аллантоисной оболочке ее разрезают ножницами и через отверстие выливают все содержимое в чашку Петри. Хорион-аллантоисная оболочка остается внутри скорлупы и ее извлекают пинцетом в чашку Петри с физиологическим раствором. Здесь ее промывают, расправляют и изучают на темном фоне характер очаговых поражений. До исследования хорион-аллантоисные оболочки хранят в 50 % растворе глицерина при 4 °С или без консерванта в замороженном состоянии.

Для получения амниотической оболочки амниотический мешок, в который заключен эмбрион, разрезают и освобождают от эмбриона, просматривают на наличие поражений. Контролируют на стерильность и хранят так же, как хорион-аллантоисную оболочку.

Для получения желточной оболочки разрезают хорион-аллантоис, отсасывают аллантоисную и амниотическую жидкости, извлекают пинцетом плод, отделяют его за пупочный канатик, захватывают желточный мешок и извлекают в чашку Петри. Контролируют на стерильность, просматривают на наличие поражений. В случае необходимости извлечения желтка его можно отсосать шприцем без выведения наружу желточного мешка.

Наличие вируса в аллантоисной и амниотической жидкостях зараженного эмбриона определяют в реакции гемагглютинации. Жидкости эмбрионов с положительным результатом гемагглютинации после проверки на бактериологическую стерильность соединяют и титруют в развернутой реакции гемагглютинации.

При наличии небольшого количества вируса или невозможности выявить его в исследуемом материале, проводят последовательные пассажи па куриных эмбрионах. Если после трех последующих пассажей на эмбрионах в исследуемом материа-

ле вирус не обнаруживают, результат считают отрицательным.

Реакция гемагглютинации (РГА). Показателем накопления ортомиксовирусов и парамиксовирусов является гемагглютинация куриных или других эритроцитов аллантоисной и/или амниотической жидкостью зараженных эмбрионов. Концентрация вирусных частиц соответствует гемагглютинационному титру (максимальное разведение вируссодержащей жидкости, вызывающее агглютинацию эритроцитов). Реакция основана на способности гемагглютинируюших вирусов (орто- и парамиксовирусы, аденовирусы и др.) склеивать (агглютинировать) эритроциты определенных видов животных, птиц или человека. Эти вирусы содержат поверхностные структуры, как правило, гликопротеидной природы – гемагглютинины, ответственные за агглютинацию эритроцитов. Следует подчеркнуть, что РГА не является иммунологической реакцией, так как в ее основе нет взаимодействия АГ и АТ, ведущего к образованию иммунного комплекса.

РГА ставят в пробирках, на специальных полистироловых планшетах, в аппарате Такачи. Из вирусосодержащего материала готовят двукратные разведения в 0,5 мл ИХН. Во все пробирки добавляют 0,5 мл 1 %-й взвеси эритроцитов, трижды отмытых в ИХН. Для контроля смешивают 0,5 мл эритроцитов с равным объемом ИХН, не содержащего вируса. В зависимости от свойств изучаемого вируса инкубацию смеси можно проводить в термостате при температуре 37 °С, 20 °С или 4 °С. Результаты реакции учитывают через время от 30 до 60 мин после полного оседания эритроцитов в контроле:

«++++» – интенсивная и быстрая агглютинация эритроцитов, осадок имеет вид коврика с фестончатыми краями («зонтик»);

«+++» – осадок эритроцитов имеет просветы;

«++» – менее выраженный осадок;

«+» – хлопьевидный осадок эритроцитов, окруженный зоной комочков склеенных эритроцитов;

«–» – компактный осадок эритроцитов такой же, как в контроле. Как указано выше, титром вируса называют его наибольшее разведение, при котором еще наблюдается агглютинация эритроцитов. Это разведение считают содержащим одну

гемагглютинирующую единицу вируса (1 ГЕ).

Результаты РГА зависят от ряда факторов: видовой и индивидуальной чувствительности эритроцитов, температуры, pH среды и т.д. Гемагглютинацию эритроцитов могут вызывать и некоторые микроорганизмы – стафилококки, эшерихии, а также сальмонеллы, шигеллы, холерный вибрион Эль-Тор. Поэтому при выявлении вирусов в материале, загрязненном бактериями, нужно с осторожностью подходить к оценке результатов реакции.

Многие вирусы обладают способностью агглютинировать эритроциты строго определенных видов млекопитающих и птиц. Так, вирусы гриппа и эпидемического паротита агглютинируют эритроциты кур, морских свинок, человека; вирус клещевого энцефалита – эритроциты барана и т.д. В качестве исследуемого материала в реакции гемагглютинации (РГА) используют аллантоисную, амниотическую жидкости, суспензию хорион-аллантоисных оболочек куриных эмбрионов, взвеси и экстракты из культур клеток или органов животных, зараженных вирусами. Реакцию гемагглютинации можно ставить капельным методом на стекле и в развернутом ряду в пробирках или лунках пластин из полистирола.

10.3.2 Обнаружение вирусов в организме лабораторных животных

Способы обнаружения вируса в организмах чувствительных животных различаются в зависимости от вида животного и типа вируса и рассматриваются в специальной литературе по соответствующим вирусным инфекциям.

10.3.2.1 Идентификация выделенных вирусов

Идентификацию вирусов проводят по следующим признакам:

- антигенным свойствам вирусов в серологических реакциях с противовирусными видовыми и типовыми сыворотками (является основной и достаточно точной идентификацией);
- выявлению вирусной НК, например, методом ПЦР;

- результатам электронно-микроскопического изучения морфологии вирусов;
- вирусиндуцированным патологическим изменениям в чувствительных живых системах.

10.3.2.2 Идентификация по антигенной структуре

Реакция нейтрализации (РН).

С помощью РН идентифицируются вирусы, выделенные из материала больных при заражении им культуры клеток, куриных эмбрионов и животных. В таких случаях к вируснейтрализующим сывороткам прибавляют питательную среду из культуры клеток, вируссодержащие жидкости эмбрионов и взвеси пораженных органов животных. После определенного времени инкубации смесями инфицируют культуры клеток, куриные эмбрионы и животных.

РН основана на способности специфических антител достаточно прочно соединяться с вирусной частицей. В результате взаимодействия между вирусом и антителом происходит нейтрализация инфекционной активности вируса вследствие блокады антигенных детерминант, ответственных за соединение вирусной частицы с чувствительными клетками. В результате вирус утрачивает способность размножаться в чувствительной к нему биологической системе *in vitro* или *in vivo*.

Результаты РН становятся очевидными после того, как смесь вируса и гомологичных ему антител после определенной по времени экспозиции будет внесена в чувствительную биологическую систему (тканевая культура клеток, куриный эмбрион, организм восприимчивого животного), где вирус может размножаться и вызывать поддающиеся учету изменения, которые будут подавлены частично или полностью в присутствии антител.

В РН участвуют 3 компонента:

а) вирус;

б) сыворотка, содержащая антитела;

в) биологический объект (лабораторные животные, развивающиеся куриные

эмбрионы, тканевые культуры), выбор, которого зависит от вида вируса, с которым предполагается проводить исследования.

Перед постановкой РН необходимо приготовить вируссодержащую суспензию из выделенного возбудителя или из известного лабораторного штамма (при титровании сывороток). В зависимости от вида вируса его выращивают в культурах ткани, в органах лабораторных животных или в куриных эмбрионах. Для РН используют полученные в результате этого культурные жидкости, суспензии органов лабораторных животных, аллантоисную и амниотическую жидкости куриных эмбрионов.

В зависимости от целей, стоящих перед исследователем, РН используют либо для идентификации выделенного неизвестного возбудителя, либо для обнаружения и титрования антител в сыворотках. В первом случае пользуются сыворотками специально иммунизированных лабораторных животных или переболевших людей. Во втором случае используют сыворотки, взятые в начальной стадии болезни и в период реконвалесценции.

При идентификации выделенных возбудителей пользуются заранее приготовленными гипериммунными сыворотками различных животных: кроликов, белых крыс и мышей, морских свинок, обезьян, баранов, лошадей и т.д. Активность гипериммунных сывороток для РН зависит от способа иммунизации животных.

Взаимодействуя с организмом, вирусы вызывают образование антител, которые, адсорбируясь на вирионах, препятствуют их проникновению в клетки и развитию цитопатического действия (ЦПД); нейтрализуют смертельное действие вирусов при репродукции их в куриных эмбрионах и организме животных; инактивируют вирионные гемагглютинины и нейраминидазы, предотвращая реакцию гемагглютинации (РГА) и реакцию гемадсорбции (РГАд) на пораженных вирусом клетках. Эти вируснейтрализующие антитела вызывают также агглютинацию и преципитацию вирусных частиц, а образующиеся при этом иммунные комплексы связывают комплемент. В связи с этим для идентификации вирионов используется классическая реакция нейтрализации (РН) па культурах клеток, куриных эмбрионах и животных и ее модификации: реакция торможения гемагглютинации (РТГА); реакция торможения гемадсорбции (РТГАд). Те же реакции используются в серодиагностике вирус-

ных инфекций для обнаружения в сыворотке больных вируснейтрализующих антител по известному вирусному антигену (диагностикуму).

Реакция задержки (нейтрализации) цитопатического действия вирусов (РЗЦПД). Реакция нейтрализации цитопатического действия вирусов воспроизводится в чувствительных к вирусу живых системах. РН основана на нейтрализации инфекционной активности вирусов при связывании со специфическими противовирусными антителами.

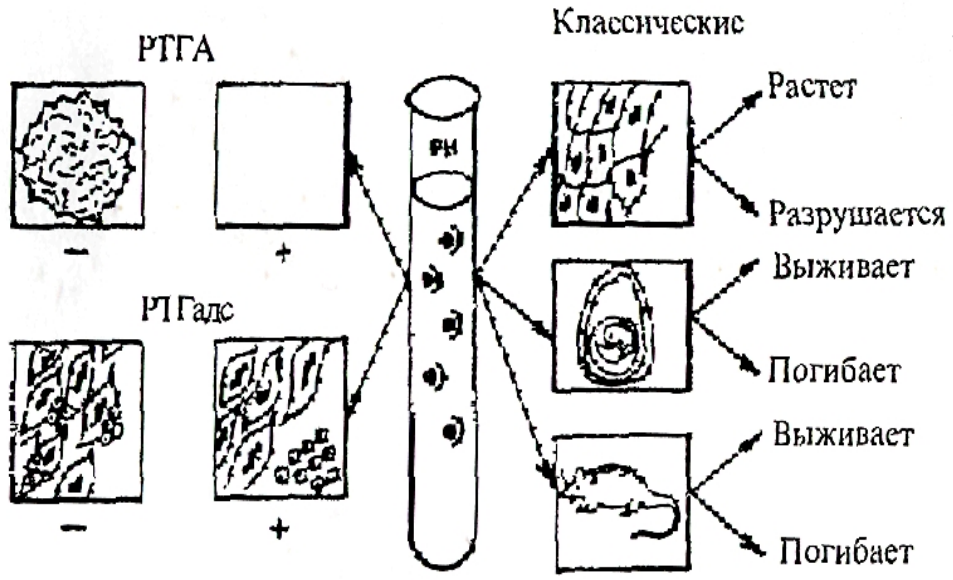
Из материала, содержащего вирус, готовят серийные разведения и добавляют к ним специфическую сыворотку в разведении в соответствии с титром, указанным на этикетке ампулы. Смеси вирус-сыворотка инкубируют от 30 до 60 мин при 37 °С для обеспечения связывания антигенов с антителами. После этого смесью заражают культуру ткани, куриные эмбрионы или лабораторных животных. Контролем служит чувствительная система, зараженная вирусом без сыворотки.

Положительной считают реакцию в случае нейтрализации ЦПД в культуре клеток, патологических изменений в куриных эмбрионах или организме животных. На основании результатов РН определяют индекс нейтрализации – отношение титра вируса (где еще имеется ЦПД) в контроле к титру вируса в опыте. Если индекс нейтрализации менее 10 – реакция отрицательная, от 11 до 49 – сомнительная, от 50 и выше – положительная (достоверное соответствие вируса антисыворотке).

Смесью вирусов и сывороток можно заражать чувствительных животных. В таких случаях нейтрализующую активность антител чаще всего определяют по нейтрализации смертельного действия вируса на животных. Одновременно вычисляют индекс нейтрализации, выражающий максимальное количество смертельных доз вируса, которое нейтрализуется данной сывороткой, по сравнению с результатами контрольного опыта, принимаемыми за единицу (рисунок 49).

Для разведения вирусов для постановки РН на лабораторных животных или в куриных эмбрионах используют ФБР (рН от 7,0 до 7,2). При работе с культурами тканей используют ту среду, которую употребляют в качестве поддерживающей для данного вида клеток (среда 199, растворы Игла или Эрла, от 2,5 % до 5 % гемогидролизат и т.п.).

Перед постановкой каждого нейтрализационного опыта вирус предварительно титруют, определяя конечное разведение, вызывающее повреждение культуры ткани или инфицирование лабораторных животных (или куриных эмбрионов). Для этого готовят 10-кратные разведения вируссодержащего материала в любой питательной среде или в ФБР. Титр вируса выражают в 50 % дозе (ТКИД$_{50}$-50 % инфекционная доза для тканевой культуры; ИД$_{50}$-50 % инфекционная доза для животных или для куриных эмбрионов; ЛД$_{50}$-50 % смертельная доза, рассчитывая ее методом Рида и Менча или Кербера (таблице 7).



«+» – положительная; «–» – отрицательная.

Рисунок 49 – Реакция нейтрализации для идентификации вирусов и противовирусных антител

Таблица 7 – Расчет титра по формуле Рида и Менча

Разведение вируса	Умерло	Выжило	Кумулятивные данные			
			умерло	выжило	летальность	
					отношение числа умерших животных к числу учтенных при данном разведении	%
10^{-1}	8	0	25	0	25/25	100
10^{-2}	8	0	17	0	17/17	100
10^{-3}	7	1	9	1	9/10	90
10^{-4}	2	6	2	7	2/9	22
10^{-5}	0	8	0	15	0/15	0

Кумулятивные количества умерших и выживших животных получают путем сложения чисел в соответствующих колонках в последовательности, указанной стрелками. Число животных в опыте равно 8 для каждого разведения вируса.

По данным учета гибели животных, определяют интервал, в котором находится доза вируса, вызвавшая 50 % смертность. В примере, показанном в таблице 7, она находится в промежутке между разведениями 10^{-3} и 10^{-4}. Интервал рассчитывается по следующей формуле

$$\frac{[\%\ \textit{летальности, где гибель превышала}\ 50\%]-50\%}{\left[\begin{array}{l}\%\ \textit{летальности, где}\\ \textit{гибель превышала}\ 50\ \%\end{array}\right]-\left[\begin{array}{l}\%\ \textit{летальности, где}\\ \textit{гибель была менее}\ 50\ \%\end{array}\right]}=\frac{90-50}{90-22}=\frac{40}{68}=0,6$$

Получив показатель пропорциональности интервала (0,6), рассчитывают отрицательный логарифм титра $ЛД_{50}$, равный сумме: (отрицательный логарифм разведения, в котором отмечена гибель более 50 % животных) + (пропорциональный интервал). Отрицательный логарифм титра $ЛД_{50}$ - 3,0 + 0,6 = - 3,6. Отсюда титр $ЛД_{50} = 10^{-3,6}$.

Таким же способом рассчитывают титр $ТКИД_{50}$, заменяя отношение чисел погибших и инфицированных животных отношением числом пробирок с цитопатическим эффектом и зараженных пробирок. Метод Кербера. Пользуясь данными, таблицы 7, подставляем их в формулу

$$\textit{Логарифм ЛД50} = 0,5 + \left[\begin{array}{l}\textit{логарифм максимальной концентрации}\\ \textit{используемого вируса}\end{array}\right] - \left[\frac{\textit{сумма процентов погибших животных}}{100}\right] =$$

$$= 0,5+(-1.0) - \frac{100 + 100 + 88 + 25}{100}$$

Логарифм титра $ЛД_{50} = 0,5\text{-}1,0\text{-}3,1 = -3,6$.

Титр$ЛД_{50} = 10^{-3,6}$

При расчете индекса нейтрализации разведения суспензии вируса соединяют с равными объемами неразведенной иммунной или неразведенной контрольной сывороток. Индекс нейтрализации представляет собой отношение титра вируса в $ЛД_{50}$ в

смеси с контрольной сывороткой к числу вируса в $ЛД_{50}$ в смеси с неразведенной иммунной сывороткой. Для нахождения индекса из логарифма титра $ЛД_{50}$ в присутствии контрольной сыворотки вычитают логарифмы титра $ЛД_{50}$ вируса в присутствии иммунной сыворотки. Индекс выражают либо логарифмом количества $ЛД_{50}$, нейтрализуемого обследуемой сывороткой, либо соответствующим антилогарифмом, обозначающим его количество арифметически.

Основываясь на данных таблицы 8, можно провести расчет индекса нейтрализации (число животных в опыте равно 6 для каждого разведения вируса).

Таблица 8 – Расчет индекса нейтрализации по формуле Рида и Менча

Разведение вируса в смеси с сывороткой	Умерло	Выжило	Кумулятивные данные			
			умерло	выжило	летальность отношение числа умерших животных к числу учтенных при данном разведении	%
Нормальная сыворотка						
10^{-3}	6	0	14	0	14/14	100
10^{-4}	6	0	8	0	8/8	100
10^{-5}	2	4	2	4	2/6	33
10^{-6}	0	6	0	10	0/10	0
Иммунная сыворотка						
10^{-1}	6	0	11	0	11/11	100
10^{-2}	5	1	5	1	5/6	83
10^{-3}	0	6	0	7	0/7	0
10^{-4}	0	6	0	13	0/13	0
10^{-5}	0	6	0	19	0/19	0

Метод Рида и Менча. ***Нормальная контрольная сыворотка***

Пропорциональный интервал = $\frac{100 - 50}{100 - 33} = \frac{50}{67} = 0{,}8$

[Отрицательный логарифм титра $ЛД_{50}$] = -4,0 + [0,8 Ч (- 1,0)] =
= -4,0+(-0,8) = -4,8.

Титр $ЛД_{50} = 10^{-4,8}$

Метод Рида и Менча. ***Иммунная (испытуемая) сыворотка***

Пропорциональный интервал = $\frac{83 - 50}{83 - 0} = \frac{33}{83} = 0{,}4$

[Отрицательный логарифм титра $ЛД_{50}$] = -5,0 + [0.4 Ч (-1,0)] =
= -2,0+(-0,4) = -2,4.

Титр $ЛД_{50} = 10^{-2,4}$

Индекс нейтрализации = 4,8-2,4 (нейтрализовано 2,4 lg вируса)

Метод Кербера. ***Нормальная контрольная сыворотка***

$$[\text{Отрицательный логарифм титра ЛД}_{50}] = -3 - \left\lfloor \frac{100 + 100 + 33}{100} \right\rfloor \text{ Ч } \lg 10 = -3 - [(2{,}33 - 0{,}5) \text{ Ч } 1] = -4{,}8$$

$$\textit{Титр ЛД}_{50} = 10^{-4{,}8}$$

Метод Кербера. ***Иммунная сыворотка***

$$[\text{Отрицательный логарифм титра ЛД}_{50}] = -3 - \left\lfloor \frac{100 + 83}{100} \right\rfloor - 0{,}5 \text{ Ч } \lg 10 = -3 \text{ Ч } [(1{,}8 - 0{,}5) \text{ Ч } 1] = -2{,}3$$

$$\textit{Титр ЛД}_{50} = 10^{-2{,}3}$$

Индекс нейтрализации = 4,8 - 2,3 (нейтрализовано 2,5 lg вируса)

Эту же величину можно обозначить антилогарифмом: индекс нейтрализации = антилогарифм 2,5 = 320. Индекс нейтрализации менее 10 указывает на отсутствие антител в исследуемой сыворотке. Индекс от 11 до 49 считается сомнительным, а 50 и выше – положительным, свидетельствующим о достоверной вируснейтрализующей активности сыворотки.

Определение 50 % нейтрализующего эффекта сыворотки показано в таблице 9. Вирусную суспензию в разведении, содержащем 100 ЛД вируса, соединяют с равными объемами последовательных двукратных разведений сыворотки и после соответствующей инкубации смесь вводят определенному числу лабораторных животных (таблица 9).

Таблица 9 – Расчет 50 % нейтрализующего действия сыворотки по формуле Рида и Менча

Разведение сыворотки (постоянная вируса)	Умерло	Выжило	Кумулятивные данные			
			умерло	выжило	летальность: отношение числа умерших животных к числу учтенных при данном разведении	%
1:4($10^{-0,6}$)	0	6	0	17	0/17	0
1:16($10^{-1,2}$)	0	6	0	11	0/11	0
1:64($10^{-1,8}$)	2	4	2	5	2/7	29
1:256 ($10^{-2,4}$)	5	1	7	1	7/8	88
1:1024 ($10^{-3,0}$)	6	0	13	0	13/13	100

Число животных для каждого разведения вируса равно 6

Метод Рида и Менча.

[Пропорциональный интервал] =

$$\frac{50\ \%\text{- (}\textit{процент летальности в разведении с эффектом ниже}\ 50\ \%)}{\left[\textit{процент летальности в разведении с эффектом выше}\ 50\ \%\right] - \left[\textit{процент летальности в разведении с эффектом ниже}\ 50\ \%\right]}$$

По данным таблицы пропорциональный интервал = $\frac{50\text{-}29}{88\text{-}29} - \frac{21}{59} = 0{,}35$

Логарифм разведения сыворотки, защищающего 50 % животных, =

- 1,8 + [0,35 Ч (-0,6)] = -1,8 + (- 0,2) = 2,0

Разведение сыворотки, защищающее 50 % животных, = антилогарифм -2,0 = 0,01, т.е. 1:100.

Метод Кербера. ***Логарифм разведения сыворотки, защищающего 50 % животных*** =

$$= -3{,}0 - (0{,}6)\ \text{Ч}\ \frac{33 + 83 + 100}{100} - 0{,}5 = -3{,}0 - [(0{,}6)\ \text{Ч}\ (2{,}2\text{-}0{,}5)] = -3{,}0 + 1{,}0 = 2{,}0$$

Разведение сыворотки, защищающее 50 %.животных, = антилогарифм - 2,0 = 0,01, т.е. 1:100.

Реакция задержки (нейтрализации) бляшкообразования (РЗБО)

Идентифицировать вирус по характеру бляшек очень трудно, поэтому прибегают к постановке РН выделенного вируса заведомо известными вируснейтрализующими сыворотками. С этой целью полученный от больного вирус накапливают в культуре клеток, и различные его разведения смешивают с неразведенной противовирусной сывороткой или, наоборот, постоянную дозу вируса добавляют к различным разведениям иммунной сыворотки. Смеси инкубируют в термостате при температуре 37 °С в течение времени от 1 до 2 ч или при температуре 4 °С в течение 18 ч. После этого смесями вируса и сыворотки заражают культуру клеток и о нейтрализующей силе ее антител судят по отсутствию ЦПД на клетки.

Наиболее чувствительным вариантом РН является подавление вирусного

бляшкообразования под действием вирусспецифической антисыворотки (реакция редукции вирусных бляшек). При постановке этой реакции к вируссодержащему материалу (от 50 БОЕ до 100 БОЕ – бляшкообразующих единиц) добавляют антисыворотку (в разведении, соответствующем титру) и после инкубации в термостате в течение времени от 30 до 60 мин смесь наносят на монослой чувствительных культур клеток. Бляшкообразование выявляют вышеописанными методами (с применением агарового или бентонитового покрытия). Соответствие вируса антителам сыворотки проявляется подавлением бляшкообразования (в сравнении с контролем). РН позволяет определить видовую и типовую (вариантную) принадлежность вируса.

Реакция задержки (нейтрализации) ЦПД в цветной пробе.

Одним из вариантов РН является цветная проба (колориметрическая реакция нейтрализации). При положительном результате противовирусные антитела блокируют размножение вируса в культуре клеток, и под действием кислых метаболитов последних в среде меняется цвет индикатора. В пробирки вносят по 0,25 мл рабочего разведения вируса (от 100 до 1000 $ЦПД_{50}$) и соответствующего разведения сыворотки. Смесь выдерживают при комнатной температуре от 30 до 60 мин, добавляют в каждую пробирку по 0,25 мл клеточной суспензии и закрывают их резиновыми пробками или заливают стерильным вазелиновым маслом. Пробирки помещают в термостат на время от 6 до 8 дней при 37 °С. Результаты реакции учитывают колориметрически: pH 7,4 и выше указывает на репродукцию вируса, 7,2 и ниже – на нейтрализацию вируса антителами.

Реакция торможения (задержки или нейтрализации) гемагглютинации (РТГА).

Являясь группоспецифической, РГА не дает возможности определить видовую принадлежность вирусов. Их идентифицируют с помощью реакции торможения гемагглютинации (РТГА) Для ее постановки используют заведомо известные иммунные противовирусные сыворотки, которые в двукратно снижающихся концентрациях разводят в изотоническом растворе натрия хлорида и разливают по 0,25 мл. К каждому их разведению добавляют равное количество вируссодержащей жидкости, при типировании вируса гриппа, например, в четырехкратном титре, т.е. 4 ге-

магглютинирующие единицы. Контролем является взвесь вируса в изотоническом растворе натрия хлорида. Планшеты со смесью сывороток и вируса выдерживают в термостате 30 мин или при комнатной температуре 2 ч, затем в каждую из них добавляют по 0,5 мл 1 % взвеси эритроцитов. Спустя от 30 до 45 мин определяют титр вируснейтрализующей сыворотки, т.е. максимальное ее разведение, вызвавшее задержку агглютинации эритроцитов.

Используя РТГА в серологической диагностике вирусных болезней, рекомендуется ставить ее с парными сыворотками, одну из которых получают в начале заболевания, а другую – спустя от 1 до 2 нед. и более. Четырехкратное нарастание титра антител во второй сыворотке подтверждает предполагаемый диагноз.

Эта реакция основана на блокировании вирусных гемагглютининов специфическими антителами. Ее можно рассматривать как частный случай реакции нейтрализации. РТГА может быть использована как для серологической диагностики, так и для идентификации гемагглютинирующих вирусов. Феномен РТГА проявляется в образовании компактного осадка эритроцитов вместо «зонтика» гемагглютинации. Реакцию проводят на полистироловых пластинах и оценивают по отсутствию склеивания эритроцитов, добавленных к смеси вируса и специфической сыворотки. Для удаления или разрушения неспецифических ингибиторов гемагглютинации сыворотки, используемые для РТГА, предварительно обрабатывают периодатом калия, каолином, бентонитом, ацетоном или другими веществами. Затем готовят двукратные разведения сыворотки в ИХН и к каждому разведению добавляют равное количество вируссодержащей жидкости с активностью 4 ГЕ. Смесь инкубируют от 30 до 60 мин при необходимой для данного типа вирусов температуре (0 °С, 4 °С, 20 °С, 37 °С), а затем добавляют равный объем 0,5 – 1,0 %-й взвеси эритроцитов. После этого смесь снова инкубируют в течение времени от 30 до 45 мин и учитывают результаты реакции. Титром сыворотки считают ее наибольшее разведение, которое «тормозит» гемагглютинацию. Для РТГА широко применяется также микрометод с использованием микропланшетов и делютеров Такачи (для разведения материала).

Реакция торможения гемадсорбции (РТГАд).

Данная реакция основана на нейтрализации эффекта адсорбции эритроцитов

на поверхности клеток, инфицированных вирусами. РТГадс используется для идентификации гемадсорбиррующих вирусов. По 0,2 мл специфической сыворотки, разведенной 1 : 5, вносят в пробирки и после инкубации в течение от 30 до 60 мин добавляют по 0,2 мл 0,5 %-й взвеси эритроцитов. В контрольные пробирки закапывают нормальную сыворотку (неиммунную сыворотку того же вида животного) и эритроциты. Пробирки инкубируют от 20 до 30 мин при температуре, оптимальной для гемадсорбции выделяемого вируса. О видовой принадлежности вируса судят по отсутствию адсорбции эритроцитов в опыте при типичной гемадсорбции в контрольных пробирках.

10.4 Серологический метод

Серологическая диагностика – определение специфических иммунологических изменений в организме под действием вирусов (чаще всего с помощью диагностикумов выявляют в сыворотке крови противовирусные антитела).

Серологическая диагностика вирусных инфекций основана на выявлении в крови больного противовирусных антител в серологических реакциях с использованием специфических вирусных антигенов – диагностикумов или специфических тест-систем. В основе большинства серологических реакций при вирусных инфекциях лежит реакция взаимодействия вирусных антигенов и гомологичных антител в жидкой среде (РСК, РТГА, РНГА, РОНГА, РТОНГА, РИА), в геле (РПГ, РРГ, РВИЭФ), при фиксации одного из ингредиентов на твердой основе (ИФА, ИЭМ, РГадсТО, РИФ, РГадс, РТГадс).

Для выявления антител асептически берут стерильным сухим шприцем от 15 мл до 20 мл крови, не добавляя антикоагулянтов и консервантов, так как они могут повлиять на результаты серологического исследования. Цельную кровь нельзя замораживать, так как это ведет к гемолизу. Сыворотку хранят при минус 20 °С. Нарастание титра антител определяют путем исследования парных сывороток, взятых в начале и в разгаре болезни или в периоде реконвалесценции. Для постановки ди-

агноза достоверным считается нарастание титра антител в четыре и более раз.

Вируснейтрализующие антитела в сыворотках переболевших людей в отличие от антигемагглютининов или комплементсвязываюших антител сохраняются многие годы, а при некоторых вирусных инфекциях (например, при кори) даже пожизненно. Это позволяет в ряде случаев использовать пул сывороток многих реконвалесцентов в качестве референс-препарата, который после разлива в ампулы и лиофилизации пригоден для диагностической работы в течение длительного времени.

Для повышения чувствительности тестов антигены или антитела адсорбируют на эритроцитах (РНГА, РОНГА, РТОНГА, РГадсТО, РРГ), метят их ферментами (ИФА), радиоактивными изотопами (РИА, РПГ), флюорохромами (РИФ) или же используют принцип лизиса эритроцитов при взаимодействии антигенов и антител в присутствии комплемента (РСК, РРГ).

10.4.1 Реакция связывания комплемента (РСК)

В вирусологии РСК используется для серологической ретроспективной диагностики многих вирусных инфекций, а также для определения вирусспецифических антигенов в различных материалах, полученных от больных.

Особенностями РСК в вирусологии является осуществление связывания комплемента на холоде (в течение ночи при 4 °С), а также включение дополнительного контроля с так называемым нормальным антигеном (антигены из клеток, в которых репродуцировался вирус). Этот антиген используется в том же разведении, что и вирусный. Рабочее разведение комплемента готовят *ex tempore* за 1 ч до использования и хранят при 4 °С. Реакцию можно ставить микрометодом.

10.4.2 Реакция радиального гемолиза (РРГ)

Реакция основана на феномене гемолиза сенсибилизированных антигеном эритроцитов под влиянием вирусспецифических антител в присутствии комплемента в агарозном геле. Метод широко применяется для серологической диагностики

гриппа, ряда других респираторных инфекций, краснухи, паротита, арбовирусных инфекций.

Агарозу (30 мг) расплавляют в 2,5 мл фосфатного буфера (pH 7,2), охлаждают до 42 °С и смешивают с 0,3 мл сенсибилизированных эритроцитов и 0,1 мл комплемента.

Для постановки реакции бараньи эритроциты отмывают фосфатным буфером (pH 7,2) и готовят 0,3 мл 10 %-й суспензии с оптимальным для данного вируса pH (например, для вируса клещевого энцефалита pH от 6,2 до 6,4). К эритроцитам добавляют 0,1 мл неразведенного антигена, тщательно смешивают и оставляют при комнатной температуре на 10 мин. Сенсибилизированные эритроциты осаждают центрифугированием в течение 10 мин при 1000 об/мин, осадок отмывают фосфатным буфером (pH 7,2) и ресуспензируют в 0,3 мл боратно-фосфатного буфера (pH от 6,2 до 6,4).

Добавляют 1 каплю борной кислоты. Смесь осторожно перемешивают и теплой пипеткой емкостью 5 мл разливают в лунки специальных полистироловых панелей (или на предметные стекла). Толщина слоя не должна превышать 2 мм. Через 3 мин после застывания агарозы панель закрывают крышкой, переворачивают и оставляют на 30 мин при комнатной температуре. В застывшей агарозе вырезают отверстия с помощью пробойника и наполняют их исследуемой и контрольной сыворотками. Панель закрывают крышкой и помещают в перевернутом положении во влажную камеру (чашки Петри со смоченным кусочком ваты) при 37 °С на время от 16 до 18 ч.

Результаты реакции учитывают по величине зоны гемолиза вокруг отверстий, заполненных сывороткой. В контроле гемолиза быть не должно.

10.4.3 Методы иммуноблотинга (ИБ)

В практике иммунологической диагностики вирусных инфекций существует иногда необходимость определять антитела к определенным белкам вируса, то есть спектр специфических антител. Если с этой целью использовать метод иммунофер-

ментного анализа, то в таком случае придется предварительно из вирусного патогена выделить и очистить необходимые антигены. Полученные белки наносят отдельно на твердую фазу. В случае использования 96-луночного планшета, в каждую лунку помещают по одному виду антигена. Затем определяют специфические антитела непрямым методом ИФА. По наличию положительной реакции в лунке с тем или иным антигеном можно судить о наличии соответствующих специфических антител. Такого рода иммуноферментные тест-системы предлагаются фирмами-производителями, однако широкое распространение, благодаря большей информативности и простоте исполнения самого исследования, получил метод иммунного блотинга (*Western blot*).

Иммунный блотинг позволяет определять в сыворотке крови антитела одномоментно и в то же время дифференцированно ко всем диагностически значимым белкам вируса. В переводе с английского *Western blot* означает «западный перенос» (дословно – промакивание). История этого необычного термина следующая. E. Southern в 1975 г. впервые предложил метод переноса из геля на мембрану электрофоретически разделенных фрагментов ДНК. По автору метод и был назван *Southern blot*, что в переводе означает «южный перенос». Метод переноса молекул РНК в свою очередь, был специалистами прозван *Northen blot* – «северный перенос». Поначалу в шутку, а затем это название закрепилось и в официальной научной литературе.

В 1979 г. были опубликованы результаты первых опытов по белковому блотингу. В продолжение традиций «географических» наименований методов переноса биологических макромолекул данный метод стал именоваться «западным» переносом – *Western blot*.

На первом этапе этого метода осуществляют электрофоретическое разделение смеси белков патогена в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН). ДСН, являясь поверхностно активным веществом, равномерно обволакивает молекулы белка и придает всем им отрицательный заряд приблизительно равной величины. Поэтому молекулы движутся в электрическом поле в одном направлении, а скорость продвижения зависит только от размеров молекулы (молеку-

лярной массы) белка.

В результате электрофоретической процедуры получают гелевую пластину, в толщине которой в виде отдельных тонких линейных зон располагаются белки. По направлению движения они разделяются в следующем порядке: ближе к старту находятся белки большой молекулярной массы, порядка от 120 кДа до 150 кДа, а к финишу далее всех продвинулись протеины массой от 5 кДа до 10 кДа. На втором этапе гелевую пластину накладывают на лист нитроцеллюлозы, и эту конструкцию помещают между электродами источника постоянного тока. Под действием электрического поля белки перетекают из пористого геля на более плотную мембрану, где достаточно прочно закрепляются (рисунок 50).

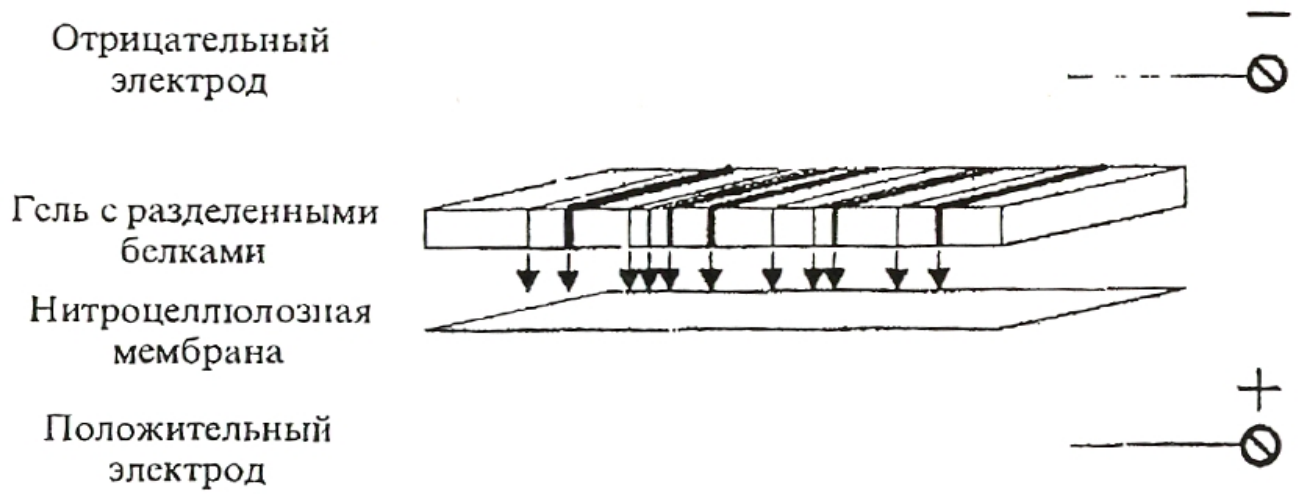


Рисунок 50 – Схема переноса белков из полиакридного геля на нитроцеллюлозную мембрану

Полученный блот обрабатывается блокирующим раствором, содержащим индифферентные в антигенном отношении белки и/или неионные детергенты (Твин 20), молекулы которых блокируют на мембране свободные от антигена места. Затем лист мембраны разрезают на узкие полоски таким образом, чтобы каждая полоска содержала все антигенные фракции. Описанные этапы выполняются фирмой-производителем.

В коммерческих тест-системах для определения антител методом иммунного

блотинга содержатся уже готовые к исследованию блоты (полоски, или стрипы). Пользователь проводит определение всего спектра специфических антител к белкам патогена по схеме непрямого метода. В качестве хромогена для проведения цветной (ферментативной) реакции используют растворимое бесцветное вещество, продукт которого приобретает окраску, становится нерастворимым и оседает (преципитирует) на нитроцеллюлозе.

В результате проведения последовательно иммунных и ферментативной реакций при наличии в исследуемой пробе антител к белкам патогена на блоте появляются темные поперечные полоски, расположение которых находится в зоне определенных белков патогена. Каждая такая полоса свидетельствует о наличии специфических антител к соответствующему антигену. Результат исследования, проведенного методом иммунного блотинга, выдается в виде перечисления антител к конкретным белкам патогена.

Нитроцеллюлозные блоты после проявления могут долго храниться в высушенном виде. Однако интенсивность окраски при этом значительно ослабевает. Для хранения полученной информации в архиве влажные блоты можно фотографировать. С появлением сканеров, позволяющих вводить в память персональных компьютеров графическое изображение блота, задача сохранения результатов упростилась.

11 Выделение и очистка вирусных препаратов

Поскольку все известные вирусы – облигатные внутриклеточные паразиты, выращивание их производится либо в организме интактных хозяев, либо в культурах клеток. Иногда (например, в случае некоторых бактериофагов) размножение вируса приводит к разрушению инфицированных клеток и выходу вируса в среду, но чаще накопление вируса не вызывает деградации клеток. Поэтому в большинстве случаев для очистки вирусов необходимо разрушение инфицированных клеток с целью перевода синтезированного вируса в культуральную среду.

Чтобы обеспечить полное высвобождение вируса, эта операция зачастую применяется даже в тех случаях, когда большая часть клеток лизируется в ходе вирусной инфекции. Разрушают клетки чаще всего различными механическими способами (гомогенизацией, обработкой ультразвуком, растиранием с кварцевым порошком, продавливанием зараженных клеток через пресс и т.д.), которые вызывают дезинтеграцию клеток, но не приводят к разрушению вирусных частиц. Иногда для этой цели используются и химические методы (обработка зараженных клеток хлороформом, лизоцимом и пр.).

В результате разрушения зараженных клеток получают суспензию, содержащую клеточные компоненты и вирусные частицы, причем вирус, как правило, в суспензии оказывается сильно разбавленным. Задача получения вирусного препарата сводится, таким образом, к концентрированию вируса (увеличению числа вирусных частиц в 1 мл суспензии) и к его очистке, т.е. удалению клеточных компонентов. Обычно обе эти задачи решаются параллельно. Ни один из известных в настоящее время методов не позволяет получить достаточно очищенный вирус в один прием. Для очистки и концентрирования вирусов используется ряд операций, так как различные методы очистки освобождают препараты вируса от разных групп примесей.

В настоящее время общее количество процедур, используемых для очистки вирусов, весьма велико.

Первой стадией очистки вирусов, в подавляющем большинстве случаев, является низкоскоростное центрифугирование (от 3000 до 5000 об/мин в течение време-

ни от 10 до 20 мин), позволяющее удалить из суспензии крупные частицы (неразрушенные клетки, ядра, крупные фрагменты оболочки и пр.). Концентрирование вируса на этой стадии не происходит, а наоборот, часть вируса теряется за счет адсорбции на удаляемых частицах, поэтому очень часто осадок подвергают промывке для освобождения хотя бы части адсорбированного на нем вируса. Кроме того, для уменьшения адсорбции (и по ряду других причин) низкоскоростное центрифугирование стараются проводить сразу же после разрушения клеток.

На следующих стадиях очистки применяются разнообразные методы. Поскольку вирусные частицы имеют белковую (или липопротеидную) оболочку, для их очистки и концентрирования можно использовать осаждение в изоэлектрической точке, осаждение сульфатом аммония или полиэтиленгликолем, экстракцию органическими растворителями, ионообменную хроматографию, гельфильтрацию различные методы центрифугирования, обработку ферментами и другие методы.

Осаждение в изоэлектрической точке. Поскольку в состав наружной оболочки вирусов, как правило, входят слабокислые белки, изоэлектрическая точка (ИЭТ) большинства вирусов лежит в области pH от 3,5 до 6,0. Метод осаждения в изоэлектрической точке можно применять в его простом варианте, доводя pH суспензии до нужной величины и отделяя преципитат вируса низкоскоростным центрифугированием. Естественно, при этом вместе с вирусом будут осаждаться и балластные белки, имеющие более высокую ИЭТ, чем вирус. Осаждение в изоэлектрической точке позволяет сконцентрировать вирус (так как последующее ресуспендирование осадка осуществляется в объеме значительно меньшем, чем исходный объем суспензии) и частично очистить его от низкомолекулярных примесей, не осаждаемых при центрифугировании.

Метод осаждения в ИЭТ можно применять и в так называемом «дробном» варианте. Допустим, ИЭТ вируса лежит в области pH 4,0. В этом случае pH суспензии сначала доводят до 5,0 и низкоскоростным центрифугированием удаляют осаждающиеся примеси. Затем подкисляют суспензию до pH 4,0. Вирус при этом агрегирует и осаждается. Не следует, однако, выбирать для первого осаждения значение pH, слишком близкое к изоэлектрической точке вируса, так как это может привести к

большим потерям из-за осаждения частиц вируса на этой стадии очистки.

Основной недостаток этого простого и весьма эффективного метода заключается в том, что многие вирусы чувствительны даже к незначительным изменениям pH среды и такая обработка может привести к потере биологической активности или даже к разрушению вирионов.

Осаждение сульфатом аммония. Процедура очистки и концентрирования вирусов этим методом принципиально не отличается от аналогичного метода фракционирования белков. Метод можно использовать и в «дробном» варианте. Следует, однако, обратить внимание на то обстоятельство, что требуемая для осаждения данного вируса концентрация $(NH_4)_2SO_4$ может быть выражена двумя разными способами. Для этого используют либо объемно-весовые проценты соли (например, 25 %-й раствор $(NH4)_2SO_4$ – 25 г соли в 100 мл раствора), либо процент от насыщения (например, 25 % насыщения $(NH_4)_2SO_4$ – 11 г соли в 100 мл суспензии; насыщенный раствор $(NH_4)_2SO_4$ содержит 430 г соли на 1 л раствора),

По своей эффективности метод «высаливания» почти аналогичен методу осаждения в изоэлектрической точке, но применять его можно далеко не во всех случаях. Основной недостаток этого метода состоит в том, что некоторые вирусы разрушаются в растворах с высокой ионной силой. При выделении вирусов исходные экстракты часто имеют весьма большой объем (литры или даже десятки литров), в связи с чем количество необходимого для очистки сульфата аммония может измеряться килограммами. Одновременное использование при очистке вируса обоих описанных методов не рекомендуется.

Экстракция органическими растворителями. Эта операция сводится к удалению некоторых примесей (например, пигментов), которые лучше растворяются в органических растворителях, чем в воде. Кроме того, при эмульгировании с органическими растворителями удаляется часть клеточных белков, которые денатурируют на границе раздела фаз при образовании эмульсии (явление поверхностной денатурации белков). Для экстракции обычно используют смесь хлороформа с бутанолом, фторуглеродные соединения типа фреона и др. Суспензию вируса встряхивают с органическим растворителем от 5 до 15 мин, смесь разделяют низкоскоростным цен-

трифугированием и отбирают водную фазу, содержащую вирус. В некоторых случаях эту операцию повторяют дважды. Этот метод почти всегда применяют при очистке вирусов растений, так как растительные клетки обычно содержат много пигментов, и иногда – при очистке вирусов животных. Следует, однако, проверить, не вызывает ли такая обработка разрушения вирионов (особенно в случае липидсодержащих вирусов).

Ионообменная хроматография. Этот метод очистки позволяет повысить титр вируса и удалить значительную часть клеточных примесей. Для хроматографии чаще всего используются слабые анионобменники типа производных целлюлозы (ДЭАЭ-, ТЭАЭ-целлюлозы, карбоксиметилцеллюлоза и др.). Ионообменник надо подбирать с таким расчетом, чтобы элюирование с него вируса происходило в условиях, не приводящих к деградации вирусов. Особенно удобными для очистки вирусов являются обменники на волокнистой основе, которые относительно мало уплотняются в ходе хроматографического цикла. Обычно при очистке вирусов через обменники пропускают большие объемы суспензий. В связи с этим уплотнение материала обменника может создать серьезную проблему, так как скорость протекания жидкостей при уплотнении резко падает.

Следует иметь в виду, что метод колоночной хроматографии можно использовать и в тех случаях, когда не удается подобрать обменник, обратимо связывающий вирус. В этом случае хроматография производится при условиях, когда вирус не адсорбируется на обменнике, но часть примесей связывается с материалом колонки. При этом удается добиться лишь очистки, но не концентрирования вируса.

Гельфильтрация. Если при ионообменной хроматографии разделение вируса и примесей происходит за счет различий в химическом связывании с материалом обменника, то в процессе гельфильтрации фракционирование происходит по размеру или по величине молекулярной массы частиц. Свойства большинства известных в настоящее время веществ, используемых в процессе гельфильтрации, таковы, что вирусные частицы проходят через них не задерживаясь. В связи с этим метод гельфильтрации, как правило, применяется для удаления относительно низкомолекулярных примесей, концентрация вируса в суспензии при этом не повышается. Для

гельфильтрации обычно используются колонки с гелями нерастворимого в воде высокогидрофильного декстрана плавучей плотности (например, вирусы гриппа и другие вирусы, в состав которых входят липиды). В связи с этим процесс фракционирования белков, нуклеиновых кислот, а также многих вирусов методом центрифугирования в градиенте концентрации сахарозы принципиально отличается от изопикнического равновесного центрифугирования в солевых растворах высокой плотности.

11.1 Очистка и концентрирование вирусов с помощь полиэтиленгликоля

В последнее время этот простой и эффективный метод концентрирования, применяемый обычно на первых стадиях очистки, получил очень широкое распространение. Сущность его состоит в том, что к исходной вирусной суспензии добавляют полиэтиленгликоль (ПЭГ) (мол. масса – 6000) до концентрации от 2 % до 10 % (в зависимости от типа вируса) и NaCl для создания высокой ионной силы среды (около 0,5 М). В этих условиях вирусные частицы после некоторого периода инкубации на холоде осаждаются даже при низкоскоростном центрифугировании (примерно 5 тыс. об/мин). Осадок вируса ресуспендируют в небольшом объеме раствора низкой ионной силы. Полученный препарат можно использовать непосредственно для равновесного центрифугирования с целью окончательной очистки и удаления ПЭГ.

Использование ферментов. В некоторых случаях для удаления из вирусных суспензий примеси клеточных компонентов проводят обработку препарата ферментами (нуклеазами, протеазами, липазами). Как правило, вирусы не инактивируются при такой обработке, но в каждом конкретном случае это необходимо проверить. При последующем осаждении вируса (например, скоростным центрифугированием) деградированный ферментами материал остается в надосадочной жидкости. Недостатком этого метода является необходимость последующего удаления ферментов, которые частично могут адсорбироваться на вирусных частицах. Если, например, конечная цель работы – получение нативной вирусной РНК, то вряд ли целесообразно применять РНК-азу в процессе очистки вируса.

Перечисленные выше приемы не исчерпывают всего арсенала средств очистки вирусов. Существует целый ряд методов, используемых только для определенных групп вирусов. В частности, при исследовании вирусов животных, обладающих гемагглютинирующей активностью, в качестве одной из первых стадий очистки нередко применяется процедура адсорбции-элюции на эритроцитах. При этом суспензию эритроцитов добавляют к очищаемому вирусу в условиях, способствующих адсорбции на них вируса. Затем эритроциты с адсорбированным на них вирусом осаждают низкоскоростным центрифугированием, и вирус элюируют с эритроцитов, т.е. в данном случае эритроциты используются как специфический сорбент для выделения вируса из исходной суспензии.

11.2 Критерии чистоты вирусных препаратов

В процессе выделения вирусного препарата используются различные способы оценки степени очистки вируса от клеточных компонентов. Например, если в исходной суспензии на 1 мг тотального белка приходился 1 млрд. инфекционных единиц, а в очищенном – 1000 млрд., принимают, что достигнута очистка вируса по белку в 1000 раз. Следует, однако, отметить, что такой критерий очистки очень относителен и свидетельствует о количестве только удаленных примесей, но не учитывает примеси, оставшиеся в препарате. Совершенно недопустимо выражение степени очистки в процентах, как это иногда делается. В нашем случае очистка в 1000 раз будет по такой системе соответствовать очистке на 99,9 %. Несмотря на кажущуюся убедительность, такие цифры являются, по существу, бессмысленными.

Процесс препаративного выделения любого вируса осуществляется при постоянном биологическом контроле. При выделении и очистке вирусного препарата, прежде всего, возникает вопрос: содержит ли очищенный препарат биологически активные вирусные частицы? Этот вопрос решается обычно постановкой теста на инфекционность. Однако в ряде случаев отрицательные результаты этого теста нельзя рассматривать как доказательство невирусной природы очищенного препарата, так как процесс заражения хозяина вирусом может оказаться весьма сложным и

специфичным, а в эксперименте не всегда удается создать все условия, необходимые для эффективного заражения. Известны случаи, когда препараты даже самых, казалось бы, «простых» вирусов неинфекционны, хотя и содержат высокоинфекционную нуклеиновую кислоту.

Таким образом, биологическая инертность препарата не всегда говорит об отсутствии в нем вирусных инфекционных частиц. В таких случаях идентификация вируса осуществляется с привлечением методов электронной микроскопии, а также некоторых методов иммунологии.

Дальнейший этап после установления вирусной природы выделенного препарата – доказательство его чистоты. Для оценки степени чистоты и гомогенности очищенного препарата используются следующие критерии:

1 Наличие одного компонента на седиментационной диаграмме при проведении опытов в аналитической ультрацентрифуге свидетельствует о довольно высокой степени очистки и в некоторых случаях о монодисперсности препарата. Интерпретация такого результата несколько осложняется рядом гидродинамических эффектов, обусловливающих иногда видимость гомогенности даже при значительной полидисперсности вирусных препаратов. При оценке данных аналитического ультрацентрифугирования следует учитывать, что возможность обнаружения примеси балластных компонентов в исследуемом препарате зависит в значительной степени от типа оптической системы, применяемой в опытах. Используемая обычно при седиментационном анализе оптическая система Филпота-Свенссона позволяет обнаружить вещество в растворе при минимальной концентрации порядка 0,05 %, в то время как чувствительность оптической системы, основанной на измерении поглощения ультрафиолетового света исследуемым препаратом в процессе ультрацентрифугирования (абсорбционная оптика), позволяет обнаружить присутствие нуклеиновых кислот в концентрации 0,0005 %.

2 Наличие одного компонента при исследовании препаратов методом аналитического электрофореза свидетельствует об идентичности поверхностного заряда частиц растворенного вещества.

3 Чистый вирусный препарат при электронномикроскопическом исследовании

должен содержать только вирусные частицы при полном отсутствии неспецифических агрегатов балластных веществ. Данные электронной микроскопии позволяют также судить о степени монодисперсности и присутствии агрегатов (или продуктов распада) вирусных частиц в препарате в тех случаях, когда полностью исключена возможность артефактов агрегации или деградации вируса в процессе приготовления электронно-микроскопических препаратов.

4 Исследование вирусного препарата методом центрифугирования в градиенте плотности позволяет обнаружить присутствие примесей, отличающихся по величине плавучей плотности от вирусного нуклеопротеида. Таким образом, было показано, что препараты ряда вирусов негомогенны по плотности (состоят из нескольких компонентов, различающихся по содержанию нуклеиновой кислоты).

5 Одним из наиболее убедительных доказательств, позволяющих уверенно констатировать отсутствие в очищенном препарате нормальных компонентов клетки, является удаление изотопной метки в препарате, полученном при очистке вируса из искусственно приготовленной смеси тотально меченных по фосфору здоровых и немеченых зараженных вирусом растений. Отсутствие метки в очищенном вирусном препарате в этом случае говорит об отсутствии примеси клеточных рибосомных нуклеопротеидов.

6 Перечисленных выше приемов обычно вполне достаточно для доказательства чистоты вирусного препарата, используемого в физико-химических исследованиях, однако иногда вирусологические исследования требуют применения препаратов еще большей, исключительно высокой степени очистки. В этих случаях степень чистоты вирусного препарата контролируют с помощью иммунохимических методов. Для этих целей исследователь может использовать антисыворотку к выделенному вирусу и антисыворотку к антигенам здорового хозяина. При идеальной чистоте препарата антисыворотка к вирусу не будет реагировать с антигенами нормальной клетки, и наоборот, антисыворотка к нормальным антигенам не будет реагировать с вирусным препаратом, так как он не содержит антигенов нормальной клетки.

Следует иметь в виду, что полученный результат в значительной степени за-

висит от методов, используемых при постановке перекрестных иммунологических реакций. Современная иммунология располагает методами, позволяющими обнаружить присутствие в растворе белкового антигена в концентрации 0,001 мкг/мл и ниже. Чувствительность различных иммунологических методов неодинакова, и поэтому результат, полученный, например, в «капельном» перекрестном тесте и свидетельствующий якобы о чистоте вирусного препарата, может не подтвердиться при использовании высокочувствительных методов фиксации комплемента, гемагглютинации и др. Даже самые чистые вирусные препараты содержат незначительное количество нормальных антигенов здоровой клетки, выявляемых иммунологическими методами.

Таким образом, при современном уровне «препаративной» техники очистить полностью препарат вируса от антигенов хозяина не представляется возможным. Тем не менее, та степень очистки, которая доступна, вполне удовлетворяет требованиям, предъявляемым при вирусологических исследованиях. В этой связи встает вопрос о необходимой степени очистки вируса. В каждом конкретном случае необходимо заранее решить, какая степень очистки вируса нужна для работы. Например, биологические исследования обычно требуют более низкой степени очистки, биохимические и физико-химические – более высокой. «Чрезмерная» (для решения данной конкретной задачи) очистка вируса, как правило, сопровождается потерей значительного количества вируса. Кроме того, само удлинение процесса очистки может вызвать инактивацию и другие нежелательные изменения свойств вирусных частиц.

Следует упомянуть о так называемых «многокомпонентных» вирусах. В настоящее время известно уже немало вирусов, которые представлены несколькими типами частиц, отличающихся по константе седиментации, плавучей плотности, размеру или другим параметрам. Кроме того, препараты некоторых вирусов содержат примесь пустых белковых оболочек, лишенных нуклеиновой кислоты. Наличие нескольких компонентов часто затрудняет и усложняет процесс очистки, а также обнаружение примесей в очищенных препаратах. Следует также иметь в виду, что в некоторых случаях разделение препаратов вируса на составляющие компоненты и

отделение пустых белковых оболочек могут оказаться излишними для решения тех или иных экспериментальных задач.

11.3 Определение концентрации вируса в очищенном препарате

Для определения концентрации неочищенных и частично очищенных препаратов могут использоваться электронно-микроскопические (подсчет числа частиц в микрокапле испытуемой жидкости в поле зрения микроскопа), иммунологические (определение титра вирусного антигена) и биологические (титрование по инфекционности или гемагглютинируюшей активности) методы. Метод электронной микроскопии – наиболее прямой метод определения числа вирусных частиц, но чтобы при этом получить достоверный результат, необходимо преодолеть ряд методических трудностей, возникающих при количественном определении вирусных частиц.

Иммунологические методы и тест на инфекционность весьма удобны для относительных измерений (например, для определения изменения количества вируса в ходе его выращивания), но мало надежны при определении абсолютной концентрации вируса в препарате. Связано это с тем, что для многих вирусов животных и для всех вирусов растений инфекционная единица может соответствовать сотням или даже тысячам вирусных частиц. Следует иметь в виду, что соотношение «инфекционность: число вирусных частиц» может резко отличаться даже для разных препаратов одного и того же вируса.

Определение концентрации вируса по сухому весу – весьма точный метод, требующий, однако, наличия высокоочищенных препаратов. Недостаток этого метода – необходимость обессоливания препарата перед высушиванием. Хотя этот метод несложен, он весьма трудоемкий и требует относительно больших количеств вируса. Обычно он применяется не при рутинных измерениях, а в специальных случаях (например, при расчетах коэффициентов поглощения вирусов или определении содержания тех или иных структурных компонентов в вирусных частицах).

При оценке концентрации вирусов чаще всего определяют содержание нуклеиновой кислоты в препарате (по цветным реакциям на рибозу или дезоксирибозу

либо по содержанию фосфора). Этот метод достаточно точен, но требует использования препаратов вирусов, свободных от примеси клеточных нуклеиновых кислот. Применение этого метода возможно лишь по отношению к вирусам, для которых известно содержание нуклеиновой кислоты в вирионах.

Наиболее прост, удобен и широко используется в лабораторной практике спектрофотометрический метод определения концентрации вирусов в очищенных препаратах (определение концентрации по величине поглощения света определенной длины волны с использованием известного коэффициента поглощения данного вируса). Коэффициенты поглощения света разными вирусами определяются в специальных исследованиях и приводятся обычно в виде величины поглощения при 260 нм в кювете длиной 1 см для суспензии вируса с концентрацией 10 мг/мл. Поскольку почти все вирусы обладают заметной светорассеивающей способностью, желательно определять коэффициент поглощения в расчете на истинное, а не на непосредственно измеренное поглощение.

12 Методические рекомендации к лабораторным занятиям

Лабораторная работа № 1 Микроскопический метод исследования

Цель работы: ознакомиться с методами лабораторной диагностики, световой микроскопии, а также техникой приготовления и способами окрашивания мазков, препаратов-отпечатков и гистосрезов для выявления вирионов и внутриклеточных включений.

Оборудование и материалы: микроскопы (соответственно количеству студентов), демонстрационные препараты с вирусами оспы, включениями Бабеша-Негри; предметные стекла, вируссодержащий материал (например, вирус осповакцины), пастеровские пипетки, реактивы для окрашивания по методу Морозова: Реактив №1 (фиксатор – жидкость Руге): 2 мл 40 %-ного формальдегида (продажный формалин), 1 мл ледяной уксусной кислоты, 100 мл дистиллированной воды. Реактив №2 (протравитель): 5 г танина, 2 мл жидкого фенола, 100 мл дистиллированной воды (если появляется осадок, раствор фильтруют). Реактив №3 (краситель): 5 г азотнокислого серебра растворяют в 100 мл дистиллированной воды, затем осторожно по каплям добавляют раствор 25 %-ного аммиака до появления легкой опалесценции. Перед употреблением разводят дистиллированной водой 1 : 10.

По методу Маккиавелло: 0,25 %-ный раствор основного фуксина, 0,5 %-ный раствор лимонной кислоты, 1 %-ный раствор метиленовой сини.

По методу Романовского-Гимзы: Раствор краски Романовского-Гимзы

Методика выполнения работы (окраска по Морозову)

Возбудителей болезни выявляют в препаратах-отпечатках, мазках из чистых суспензий. При исследовании последних на предметное стекло пастеровской пипеткой наносят небольшую каплю материала и распределяют ее тонким слоем, для окрашивания готовят три реактива.

Готовые препараты высушивают на воздухе в течение 3 мин, отмывают дистиллированной водой в вертикальном положении. Затем на них наносят реактив №1, через 1 мин его сливают, мазок промывают и наносят на 1 мин реактив №2, проводя препарат над пламенем спиртовки до появления паров. Далее мазок тщательно про-

мывают дистиллированной водой и на 1 мин наносят реактив №3, прогревая препарат на огне, пока он не станет темно-коричневым. После этого препарат снова тщательно промывают водой, высушивают на воздухе и микроскопируют.

На светло-коричневом фоне препарата вирионы имеют вид темно-коричневых или черных точек, расположенных одиночно, попарно или в виде скоплений. Результат будет положительным только в случае массового обнаружения характерных образований.

Методика выполнения работы (окраска по Маккиавелло)

Высушенные нефиксированные препараты окрашивают 5 мин профильтрованным 0,25 %-ным раствором основного фуксина, краситель сливают, а мазок быстро (1 с) проводят через 0,5 %-ный раствор лимонной кислоты, тщательно промывают водопроводной водой и окрашивают 10 с 1 %-ным раствором метиленовой сини. Затем препарат вновь промывают, высушивают и микроскопируют.

Вирионы окрашиваются в яркий рубиново-красный цвет, цитоплазма клеток – в светло-синий, ядра – в темно-синий.

Методика выполнения работы (окраска по Романовскому-Гимзе)

Препараты фиксируют в метиловом спирте 5 мин, нанося на них раствор краски Романовского-Гимзы (1 мл маточного раствора на 15 мл дистиллированной воды), время окрашивания от 30 до 60 мин, краску сливают и тщательно промывают дистиллированной водой в течение 10 мин. Высушенные препараты лучше провести через абсолютный спирт, толуол и заключить в бальзам. Вирионы при этом способе окрашивания приобретают темно-фиолетовый цвет, фон препарата – голубой.

Лабораторная работа № 2 Люминесцентная микроскопия. Метод флуорохромирования

Цель работы: ознакомиться с устройством люминесцентного микроскопа, правилами работы с ним и методикой флуорохромирования, используемой в вирусологической практике.

Оборудование и материалы: люминесцентный микроскоп любой марки, набор флуорохромов для люминесцентной микроскопии, светофильтры: БС-8 (бесцветное стекло, задерживающее ультрафиолетовые лучи), СЗС-7 или СЗС-14 (сине-зеленое

стекло, пропускающее синие лучи), ФС-1 (фиолетовое стекло, пропускающее фиолетовые лучи) и ЖС-18 (запирающий светофильтр, отсекающий лучи возбуждения и пропускающий лучи, исходящие из препарата), нефлуоресцирующее иммерсионное масло, предметные и покровные стекла, фиксажницы с фиксатором (любым, применяемым в вирусологической практике), культура клеток, зараженная вирусом оспавакцины или вакцинными штаммами вирусов других видов, дистиллированная вода, флаконы из темного стекла, весы.

Методика выполнения работы

Препараты для метода флуорохромирования готовят двумя способами:

1) на свежий препарат-отпечаток из органов, соскобов со слизистых оболочек или суспензии инфицированных клеток наносят 1-2 капли рабочего раствора акридина оранжевого 1 : 10000, накрывают покровным стеклом. Приготовленный таким образом свежий (в течение 20 мин после приготовления) препарат рассматривают в люминесцентном микроскопе;

2) препараты-отпечатки, полученные из патологического материала или инфицированные культуры клеток на покровных стеклах фиксируют 96° этиловым спиртом в течение 30 мин, промывают раствором Хенкса, наносят на препарат 1-2 капли раствора акридина оранжевого (1 : 10000), через 10 мин раствор флуорохрома сливают, препарат промывают и исследуют под микроскопом.

В результате окрашивания ДНК, содержащаяся в ядрах клеток, дает изумрудно-зеленое свечение, а РНК, находящаяся в цитоплазме, светится красным или оранжевым цветем. В препаратах ДНК-содержащихся вирусов, например, аденовируса, вирусный материал в ядре клеток в виде гранул различной величины светится зеленым цветом. При наличии в препарате РНК-содержащего вируса, например, вируса гриппа, вирусный материал обнаруживается в виде ярко-красных гранул в цитоплазме клеток.

Лабораторная работа № 3 Титрование вируса гриппа на эмбрионах кур

Цель работы – количественное определение инфекционности исследуемого препарата.

Оборудование и материалы: штатив для эмбрионов; штатив для пробирок;

термостат на 37 °С с увлажнением; стерилизатор для шприцов; пластина для гемагглютинации; копье; ножницы малые; пинцет; карандаш по стеклу; простой карандаш; восковой карандаш, пробирки – 10 шт.; пипетки на 5 мл – 2 шт., на 1 мл – 12 шт.; шприц (1 мл) с иглой – 1 шт.; пробки – 10 шт.; пастеровские пипетки – 2 пачки (20 шт.); пробки № 24 – 2 шт., питательная среда Игла, модифицированная (МЕМ), 10-дневные эмбрионы кур – 25 шт.; суспензия, содержащая вирус гриппа А; аллантоисная жидкость эмбрионов кур; 1 %-я суспензия эритроцитов кур.

Методика выполнения работы.

1 Приготовление серии десятикратных разведений вируса. Девять пробирок, закрытых пробками, ставят в штатив и подписывают (10^1, 10^2 и т.д. до 10^9). В каждую пробирку наливают по 4,5 мл питательной среды. В первую пробирку вносят 0,5 мл (разведение 10^2) и т.д. Пипетирование и перенос жидкости в следующую пробирку каждый раз осуществляется новой пипеткой. *Повторное использование одной и той же пипетки является грубой ошибкой («ошибка пипетирования») и приводит к завышению титров.*

Для титрования используют 5 последних разведений.

2 Подготовка эмбрионов к заражению. Для заражения используют 11-дневные эмбрионы. Яйца расставляют на штативе тупым концом вверх по 4 штуки в 5 рядов, подписывают эмбрионы простым карандашом (один ряд 10^9, следующий – 10^8 и так далее до 10^5). Затем скорлупу стерилизуют прожиганием. Для этого на пинцет наматывают немного ваты, несильно смачивают спиртом и поджигают в пламени горелки. Затем быстро проводят тампоном по верхним концам яиц и сразу же тушат тампон в банке с водой. Стерильным копьем проделывают точечное отверстие в скорлупе.

3 Заражение эмбрионов в аллантоисную полость. Заражение проводят одним шприцем, начиная с более высокого разведения (10^9). В шприц набирают 0,8 мл жидкости и вводят по 0,2 мл в 4 эмбриона. Иглу вводят на длину приблизительно 2 см под углом от 45° до 60°. После заражения отверстия заплавляют воском и ставят эмбрионы на 48 ч в термостат на 37 °С с увлажнением.

4 Учет результатов титрования. Через 48 ч после заражения эмбрионы пе-

реносят в холодильник (4 °С) на 4 часа. Эта процедура проводится для сужения кровеносных сосудов эмбриона, так как попадание эритроцитов в аллантоисную жидкость может привести к потере вируса, который адсорбируется на эритроцитах. Затем скорлупу прожигают, как описано выше маленькими ножницами, прожженными в пламени горелки, вырезают небольшое (1 см в диаметре) отверстие на тупом конце яйца, не касаясь оболочки, так, чтобы скорлупа не попала внутрь яйца. В пластину для гемагглютинации наливают по 0,4 мл физиологического раствора (4 ряда по 5 лунок). Пастеровской пипеткой (для каждого эмбриона используют новую пипетку) прокалывают хорион-аллантоисную оболочку, из каждого эмбриона отбирают в лунку по 2 капли (около 0,1 мл) аллантоисной жидкости, затем добавляют по 0,5 мл 1 %-й суспензии эритроцитов и через промежуток времени от 20 до 40 мин учитывают результаты реакции, Признаком размножения вируса будет агглютинация эритроцитов с образованием осадка в виде «зонтика». Результаты записывают в таблицу, знаком (+) отмечают наличие агглютинации, знаком (–) – ее отсутствие. Рассчитывают титр вируса.

Лабораторная работа № 4 Заражение, культивирование вирусов в организме лабораторных животных и выделение.

Цель работы: освоить различные методы заражения и методику вскрытия трупов лабораторных животных, отработать технику взятия материала для вирусологического исследования, научиться получать различные компоненты крови.

Оборудование и материалы: лабораторные животные (белые мыши), шприцы и инструменты для заражения животных и взятия крови, вируссодержащий материал, трупы лабораторных животных, пенициллин, стрептомицин, стерильные инструменты для вскрытия, раствор Хенкса, пробки резиновые, пенициллиновые флаконы, стерильные марлевые салфетки, колбы с бусами, пробирки, колбочки на 50 мл, воронка, пробирки центрифужные, физиологический раствор, штативы, центрифуга.

Методика выполнения работы.

Лабораторные животные должны быть получены из хозяйства, благополучного по инфекционным и инвазионным заболеваниям; они должны быть клинически здоровыми и иметь достаточный вес; во внимание обязательно принимают возраст

животных (в некоторых случаях к вирусу наиболее чувствительны новорожденные, в других – можно использовать взрослых).

Животных перед заражением выдерживают в карантине 2 недели. За ними проводят клинические наблюдения и лабораторные исследования для исключения инфекционных и инвазионных болезней. Помещение, где содержатся животные, должно иметь отдельный изолированный вход, достаточно света, хорошую вентиляцию. Животных, зараженных вирусами, необходимо содержать в отдельном помещении.

Метка лабораторных животных. Метка является непременным условием использования животных в эксперименте. На клетке укрепляют бирку с надписью (номер экспертизы, количество зараженных животных, дату заражения и другие сведения).

Существуют и способы индивидуальной метки. Для метки белых мышей и крыс чаще всего применяют нанесение цветных пятен на непигментированную шерсть. Насыщенный раствор пикриновой кислоты лучше других красителей удерживается на шерсти и коже животных. Цветные метки ставят в местах, соответствующих определенному порядковому номеру животного. Так, если его тело разделить условно на три продольные части (левый бок, спина, правый бок), то нанесение цветных меток начинают с левого верхнего угла, т.е. лопатки; это будет соответствовать 1, двигаясь назад, левый бок соответствует 2, левое бедро – 3, далее затылок – 4, спина – 5, область репицы – 6, правое плечо – 7, правый бок – 8, правое бедро – 9. Используя два цвета красителей, можно дать одним из них обозначения единиц, другим – десятков.

Исследуемым материалом рекомендуется заражать сразу нескольких животных разными способами, но с учетом тропизма вируса. Поскольку при первичном заражении животное может не заболеть, через 7 дней здоровых на вид животных убивают, а их органы используют для заражения следующей группы животных. Обычно делают обычно три «слепых» пассажа.

Вируссодержащий материал может быть введен лабораторным животным различными методами. Выбор метода заражения определяется тропизмом вируса. Зная

тропизм, материал вводят в органы, содержащие чувствительные к этому вирусу клетки. Например, вирус гриппа вводят интраназально, вирус бешенства – интрацеребрально.

Применяют следующие методы заражения.

Заражение под кожу: вируссодержащий материал вводят под кожу в область спины. Доза его для крыс – 0,5 мл, морских свинок – 3 мл, белых мышей – 0,2 мл. Если нужно ввести большее количество материала, то жидкость инъецируют в разные места под задний конец спины или в различных направлениях.

Внутримышечное заражение: исследуемый материал вводят в мышцу бедра (у кур – в грудную мышцу). Доза для мышей 0,25 мл, крыс – от 0,5 мл до 1 мл, морских свинок – 2 мл, кроликов – 5 мл, кур – 3 мл.

Внутрикожное заражение: тонкую острую иглу вводят под острым углом в складку кожи, предварительно освобожденную от волос. В результате инъекции должен образоваться пузырек. Доза вируссодержащего материала для всех животных от 0,1 мл до 0,2 мл.

Накожное заражение: на предварительно подготовленной (освобожденной от шерсти) продезинфицированной коже скарификатором делают царапины, затем каплями наносят вируссодержащий материал и втирают стеклянным шпателем, этот метод широко используют при работе с вирусами оспенной группы

Внутрибрюшинное заражение: животное фиксируют в вертикальном положении головой вниз. Для инъекции используют затупленные иглы. Кожу, мышечную стенку и брюшину забирают в складку и прокалывают их иглой под прямым углом до ощущения пустоты – показатель проникновения иглы в брюшную полость. Дозы вируссодержащего материала: мышам – 1 мл, крысам – 2 мл, морским свинкам – до 5 мл, кроликам – до 10 мл, овцам и козам – от 50мл до 100 мл.

Внутривенное заражение: исследуемый материал мышам и крысам вводят в хвостовую вену, кроликам – в ушную, курам – в вену крыла, более крупным животным – в яремную вену, морским свинкам – от 1 мл до 2 мл непосредственно в сердце. У мышей и крыс хвост надо предварительно погрузить на 10 мин в теплую воду (от 48 °С до 50 °С). Иглу вводят под острым углом в боковую вену эадней трети хво-

ста. Дозы материала: для мышей – 1 мл, крыс – 2 мл, кроликов – до 5 мл, для кур – до 10 мл.

Интраназальное заражение: стерильной пипеткой в носовое отверстие вносят каплю исследуемого материала, которую животные при вдохе аспирируют в легкие. Материал не должен содержать высокодисперсных частиц. Наркоз должен быть глубоким, противном случае у животного возникает чихательный рефлекс материалом инфицируется окружающая среда. Дозы: для мышей – от 0,03 мл до 0,05 мл, крыс – от 0,05 мл до 0,1 мл, морских свинок и кроликов – до 2 мл.

Внутримозговое заражение: мышей и крыс заражают под наркозом, так и без него. Введение вируссодержащего материала осуществляют на расстоянии 2 мм от точки пересечения средней линии черепа с линией, соединяющей углы глаз. Место укола дезинфицируют раствором йода или спиртом. Используют туберкулиновый шприц с тонкой иглой, на которую надета резиновая муфта так, чтобы срез иглы был целиком открыт. Мышь фиксируют левой рукой, оттягивая кожу к затылку. Материй вводят постепенно в дозе: для мышей – от 0,025 мл до 0,03 мл, для крыс – от 0,05 мл до 0,1 мл.

После заражения животные должны быть помещены в клетки, на которые навешивают этикетки с указанием вируса или номера экспертизы, количества зараженных животных, даты заражения. В рабочем журнале записывают номер экспертизы исследуемого материала, количество и характеристику зараженных животных, их маркировку, метод введения и дозу вируса. За животными устанавливают наблюдение, обращая внимание на их внешний вид, подвижность, прием пищи и т.п. Следует отметить, что гибель животных в первые дни после заражения может быть связана с травмой или токсическим действием исследуемого материала.

В последующие дни после заражения, ведут ежедневные наблюдения за животными, контролируя их клиническое состояние. Так, при размножении вируса в клетках респираторного тракта наблюдаются кашель, хрипы, одышка, при размножении вируса в клетках мозга – судороги, парезы, параличи и т.д. Однако, клинические признаки большей частью носят неспецифический характер и на этом этапе исследований нет возможности прийти к заключению, какой именно вид вируса вы-

звал заболевание. Для этого необходимо провести идентификацию обнаруженного вируса с помощью серологических реакций.

Вскрытие лабораторных животных. Трупы животных, павших от экспериментальной инфекции, немедленно вскрывают и проводят патологоанатомическое исследование. Если зараженное животное не погибло, его убивают в момент максимального и проявления симптомов болезни или, при их отсутствии, на 3, 8, 10 день после заражения. Убить животное рекомендуется избыточной дозой наркоза, а также путем разрыва спинного мозга. Для вскрытия необходимо применять только стерильные инструменты: скальпели, прямые и изогнутые ножницы, ножницы для костей, пинцеты, пастеровские пипетки. Инструменты подбираются так и в таком количестве, чтобы в процессе вскрытия можно было часто менять. Основной принцип при вскрытии – к трупу животного можно прикасаться только инструментами или защищенными руками. Мелких лабораторных животных (мыши, крысы, морские свинки, цыплята) при этом прикалывают иголками в распростертом виде к доске или кювете с парафином, покрытыми клеенкой. Можно, использовать специальные столики, снабженные соответствующими фиксирующими приспособлениями. Они должны быть прикрыты клеенкой и установлены в больших кюветах.

Перед вскрытием труп животного дезинфицируют: мелких животных погружают в 2,5 %-ный раствор фенола на 15 мин, крупных – опрыскивают дезраствором. Вскрытие проводят со строгими соблюдением асептики и личной профилактики. Разрез кожи делают по белой линии живота. Кожу препарируют и оттягивают в стороны. Коленные складки и подмышечные ямки обнажают для исследования лимфатических узлов. После этого труп животного дезинфицируют повторно, меняют инструменты и вскрывают брюшину и грудную полости. Разрез делают так, чтобы не повредить желудок и кишечник. Затем удаляют мышцы живота и брюшину, обнажая при этом сердце, почки, печень, селезенку и снова меняют инструменты.

В зависимости от заболевания у трупа асептически берут патматериал. Чаще всего это кусочки паренхиматозных органов, кровь, ткани головного и спинного мозга, различные транссудат и экссудаты, моча и др. Материал помещают в стерильную посуду и замораживают. В обязательном порядке проводится посев на са-

харные МПА и МПБ в целях исключения бактериальной флоры.

После вскрытия и взятия материала труп, остатки корма, подстилку подвергают автоклавированию или сжигают.

Лабораторная работа № 5 Выращивание Т-четных бактериофагов

При внесении небольшого количества фага в культуру чувствительных бактерий, активно размножающихся в жидкой питательной среде, частицы бактериофага адсорбируются на бактериальных клетках и после латентного периода лизируют их. Освободившееся в среду потомство частиц бактериофага заражает клетки, не вовлеченные в процесс инфекции, вызывая второй инфекционный цикл. Таким образом, последовательно заражаются все клетки суспензии, и процесс продолжается асинхронно до тех пор, пока не произойдет лизис всех чувствительных бактерий. Теоретически выход фага равен численности популяций бактерий, умноженной на величину среднего выхода фага при лизисе клетки. Действительный выход часто меньше, так как некоторые из освободившихся вирусных частиц утрачиваются в результате повторной адсорбции на инфицированных, но не лизировавшихся бактериях или на обломках бактерий.

Период времени, необходимый для лизиса всех клеток, зависит главным образом от продолжительности латентного периода и числа введенных фаговых частиц. На процесс фаголизиса влияют также температура, степень аэрации, состав питательной среды, реакция среды и физиологическое состояние бактерий. Так, например, заражение бактериальной культуры в стационарной фазе не приводит к появлению фагового потомства.

В конце логарифмической фазы роста концентрация клеток в питательном бульоне составляет около 1×10^9 в 1 мл. Если такую культуру заразить достаточным количеством фага (1×10^9 фаговых частиц в 1 мл), то все бактерии инфицируются почти одновременно и лизис культуры наступит через промежуток времени от 1 до 2 ч. При этом можно ожидать, что 10^9 инфицированных бактерий в 1 мл могут дать 10^{11} фаговых частиц в 1 мл, поскольку средний выход (для Т-четных фагов) составляет от 100 до 200 фаговых частиц.

Для получения высокоочищенных фаговых суспензий применяют синтетиче-

ские среды. С этой целью обычно используют аэрируемые колбы или бутыли, а также всевозможные ферментеры.

Цель работы: получение суспензий фага Т4 при использовании бактерий *E. coli* в качестве хозяина.

Оборудование и материалы: качалка; термостат на 37 °С, флакон на 250 мл – 1 шт.; пробирки – 8 шт.; пипетки на 1 мл – 8 шт., на 5 мл – 2 шт., суточная бульонная культура *E. coli,* фаг с известной концентрацией, хлороформ.

Методика выполнения работы.

В стерильный флакон на 250 мл вносят 30 мл питательного бульона и 3 мл ночной бульонной культуры *E. coli.* Инкубационную смесь ставят на качалку при 37 °С и аэрируют в течение 1,5 ч. После этого берут пробу в количестве 3 мл для определения мутности культуры и установления точной концентрации бактерий по кривой, полученной в предыдущей задаче.

Бактериальную суспензию заражают, внося суспензию фага с известным титром при множественности заражения 0,1 (отношение числа фаговых частиц к числу бактериальных клеток). Аэрацию инфицированных фагом клеток продолжают в течение 2 ч, затем добавляют несколько капель хлороформа для разрушения нелизированных бактериальных клеток и продолжают встряхивание в течение 15 мин.

Полученный лизат центрифугируют при 4000 об/мин в течение 20 минут для удаления обломков клеток и фагоустойчивых бактерий и хранят в холодильнике для дальнейшей работы.

Лабораторная работа № 6 Титрование фага методом агаровых слоев

Активность бактериофага определяют по его способности вызывать лизис бактериальной культуры в жидких или твердых средах и численно выражают степенью максимального разведения, в котором испытуемый фаг проявил свое литическое действие. Весьма точным методом оценки активности бактериофага является определение количества инфекционных активных единиц бактериофага в единице объема (титр бактериофага).

Для этой цели обычно пользуются методом агаровых слоев. Сущность метода состоит в том, что культуру индикаторных бактерий в «мягком» (0,8 %-м) агаре при

48 °С заражают фагом в соответствующем разведении. Эту смесь выливают на поверхность застывшего 1,5 %-го питательного агара, дают застыть верхнему слою агара и ставят на инкубацию в термостат. В течение промежутка времени от 6 до 12 ч бактерии размножаются внутри мягкого слоя агара в виде множества мелких колоний, получая питание из нижнего слоя 1,5 %-го агара, который применяют как основу. Низкая концентрация верхнего слоя агара создает пониженную вязкость, что способствует хорошей диффузии фаговых частиц. В результате фаговые частицы заражают бактериальные клетки, находящиеся в непосредственном соседстве с ними, размножаются и лизируют их. Фаговое потомство инфицирует затем соседние бактерии, которые в свою очередь подвергаются лизису в результате появления второго поколения фага и т.д. В конечном итоге на растущем бактериальном газоне образуются прозрачные зоны отсутствия роста бактерий – негативные колонии, стерильные пятна, или «бляшки». Образование каждого стерильного пятна может быть вызвано единственной частицей бактериофага. Следовательно, число негативных колоний может служить количественным показателем содержания инфекционных фаговых частиц в исследуемом растворе.

Цель работы: определить титр фага (содержание активных фаговых частиц в 1 мл) в лизатах, полученных ранее при выполнении предыдущей задачи.

Оборудование и материалы: ночная бульонная культура *E. coli* – 1 мл., пробирки – 10 шт.; чашки Петри – 2 шт.; пипетки на 1 мл – 15 шт., на 5 мл – 2 шт., физиологический раствор — 100 мл, водяная баня на 48 °С.

Методика выполнения работы

В случае если титр фага предположительно составляет 10^{10} фаговых частиц в 1 мл, необходимо провести восемь десятикратных разведений исходной суспензии в стерильном физиологическом растворе.

Агар для верхнего слоя (0,8 %), предварительно разлитый по 5 мл в пробирки, расплавляют и остужают в водяной бане до 48 °С. В таком состоянии агар может храниться в водяной бане – 20 мин, так как при более продолжительном хранении он приобретает гелеобразную консистенцию. Готовят и маркируют 2 пробирки (№ 1, № 2). В каждую пробирку вносят 0,1 мл ночной бульонной культуры *E. coli*.

В пробирки № 1 и № 2 с мягким агаром и индикаторной культурой добавляют соответственно по 0,1 мл седьмого и восьмого разведений фаговой суспензии, тщательно перемешивают и выливают содержимое на чашку Петри с 1,5 %-м питательным агаром, равномерно распределяя по поверхности агара. После застывания верхнего слоя агара (от 10 до 15 мин) чашки переворачивают вверх дном и оставляют в термостате при 37 °С на ночь.

На следующий день считают количество негативных колоний на каждой чашке и определяют титр фага в исходном препарате с учетом фактора разведения и объема вносимого материала. Например, если при нанесении на чашку 0,1 мл фаговой суспензии при разведении 1×10^7 на этой чашке образовалось 150 стерильных пятен, то титр фаголизата будет равен $(150 \times 10)\ 10^7 = 1{,}5 \times 10^{10}$ частиц в 1 мл.

Лабораторная работа № 7 Одиночный цикл размножения фагов

Процесс размножения бактериофага в популяции бактерий суммарный результат множества отдельных инфекционных процессов, протекающих изолированно друг от друга в бактериальных клетках. Каждый такой элементарный процесс – одиночный цикл размножения (ОЦР) – начинается адсорбцией фаговой частицы на поверхности клетки и заканчивается лизисом клетки с освобождением потомства – частиц фага, способных немедленно адсорбироваться на новых клетках бактерий. Таким образом, инфекционный процесс в бактериальной популяции идет циклически, а каждый одиночный цикл обладает общими для всех циклов чертами.

Методика изучения ОЦР предназначена главным образом для выяснения двух фундаментальных свойств, присущих данной системе «фаг – бактерия»: длины латентного периода и величины выхода фага. *Латентный период внутриклеточного развития* – это минимальный промежуток времени с момента адсорбции фага до лизиса клетки. *Выход (урожай) фага* – это среднее количество фаговых частиц, освобождаемых клеткой в момент лизиса. Методика позволяет выяснить ряд других свойств системы, а также влияние на эти свойства условий проведения опыта ОЦР, вследствие чего опыт входит в число основных методов изучения вирусов бактерий.

Для обеспечения единичного заражения в суспензию бактерий вносится инокулюм, содержащий такое число фаговых частиц, которое может обеспечить зара-

жение только 10 % клеток. Однако в зависимости от опыта могут быть взяты различные величины множественности заражения. После непродолжительного периода, в течение которого адсорбируется не менее 80 % фага, весь неадсорбировавшийся фаг нейтрализуется антифаговой сывороткой. Скорость адсорбции зависит от частоты случаев столкновений вирионов с бактериями. С уменьшением концентрации фага и бактерий скорость адсорбции падает и при определенном разведении становится незначительной. Если разведение сделано в течение латентного периода, то возможность заражения новых бактерий потомством фага, образовавшимся в ОЦР, практически исключается и размножение фага ограничивается рамками одного цикла. Из разведенной инфицированной культуры периодически берутся пробы и высеваются на чашки с чувствительными бактериями. На следующий день на чашках производится подсчет пятен для определения числа инфекционных единиц в культуре в различные моменты ОЦР.

Латентный период характеризуется постоянством числа негативных колоний во всех пробах. Стерильные пятна, образовавшиеся на чашках, засеянных в течение латентного периода, возникли не из свободных фаговых частиц (к тому времени неадсорбировавшиеся частицы фага уже связаны антифаговой сывороткой), а из зараженных клеток бактерий, в которых ОЦР завершился уже после высева пробы на чашку. Хотя при лизисе из клетки может выйти значительное число фага, в плотной агаровой среде на чашке все эти частицы останутся в одном месте и положат начало образованию одной «бляшки».

В пробах, взятых после завершения латентного периода, число негативных колоний начинает нарастать. В это время в связи с интенсивно идущим лизисом клеток в жидкую среду начинает выходить многочисленное потомство фага. Будучи высеяна на чашку, каждая фаговая частица теперь сможет образовать самостоятельный инфекционный центр. Окончание периода лизиса связано с выходом всего фагового потомства из клеток и установлением в окружающей среде нового (конечного) титра фага. При этом рост числа стерильных пятен в пробах также остановится на определенном уровне, который будет тем выше, чем выше выход фага из одной зараженной клетки. Таким образом, средняя величина выхода фага в опыте может

быть вычислена как отношение конечного числа стерильных пятен в пробах к числу зараженных фагом клеток (начальное число стерильных пятен).

Цель работы: определить одиночный цикл размножения фагов

Оборудование и материалы: пробирки – 18 шт.; чашки Петри – 11 шт.; пипетки на 5 мл и 10 мл – 5 шт., на 1 мл – 20 шт., питательный бульон – 50 мл., бактериальная культура *E. coli* в логарифмической фазе роста с титром 1×10^8; препарат фага с титром 1×10^8; антифаговая сыворотка.

Методика выполнения работы

Готовят пробирки: № 1 – с 0,9 мл бактерий *E. coli* с титром 1×10^8 клеток в 1 мл; № 2 – с 0,9 мл антифаговой сыворотки, № 3, 4, 5 — с 0,9, 3,9 и 9,9 мл бульона соответственно. Помещают их в водяную баню на 37 °С на 10 мин.

Для адсорбции фага вносят в пробирку № 1 с бактериями 0,1 мл препарата фага и перемешивают. С этого момента начинают отсчет времени опыта.

На 5-й минуте с начала опыта переносят 0,1 мл из пробирки № 1 в пробирку № 2 с сывороткой и перемешивают.

На 10-й минуте опыта переносят 0,1 мл из пробирки № 2 в пробирку № 3, из пробирки № 3 – 0,1 мл в пробирку № 4, из пробирки № 4 – 0,1 мл в пробирку № 5. Все переносы делаются отдельными пипетками, после каждого разведения содержимое пробирки интенсивно перемешивается.

Пробы по 0,1 мл высеваются методом агаровых слоев. Из пробирки № 4 пробы берут на 15-й, 18-й, 21-й и 24-й мин, а из пробирки № 5 – с интервалом в 4 мин, начиная с 20-й и кончая 40-й минутой опыта. Чашки должны быть заранее надписаны и поставлены в последовательности, соответствующей порядку взятия проб. Подсчитывают стерильные пятна на чашках с пробами на следующий день после инкубации при 37 °С. Подсчитав количество «бляшек» на каждой чашке, определяют латентный период и урожай фага в данных условиях. Результаты опыта изображают графически, откладывая по оси ординат число негативных колоний в 3 мл, а по оси абсцисс – время в мин.

13 Основы таксономии вирусов

Первая попытка на международном уровне внести некоторый порядок в огромнейшее многообразие вирусов была предпринята на Международном конгрессе по микробиологии в Москве в 1966 году. Был создан комитет, названный позднее Международным комитетом по таксономии вирусов, который получил задачу создать единую универсальную таксономическую схему для всех вирусов, инфицирующих животных, растения, грибы и бактерии. С 1971 года МКТВ, действующим под эгидой Международного общества вирусологов, было выпушено шесть Докладов, определявших состояние таксономии вирусов.

Седьмой Доклад МКТВ включает в себя предшествующие таксономические конструкции и новые данные, полученные с 1995 г, включающие решения, достигнутые на Десятом Международном конгрессе по вирусологии, проходившем в Иерусалиме в 1996 году и промежуточных сессиях в 1997 и 1998 гг. Работа в данном направлении проводится при поддержке более чем 500 вирусологов из разных стран, входящих в 50 рабочих групп, подкомитеты и исполнительный комитет МКТВ.

В Седьмом Докладе МКТВ список охарактеризованных и классифицированных вирусных видов был еще более расширен, а демаркационные критерии, используемые для подразделения между отдельными видами вирусов разных родов, расширены на сколько это было возможно. В основе представления семейств и родов вирусов помимо основных морфологических характеристик использовались такие критерии, как:

а) природа вирусного генома;

б) тип цепей генома вирусов;

в) возможность обратной транскрипции, характерной для некоторых вирусов;

г) полярность вирусного генома.

Их использование позволило подразделить все известные вирусы на 7 основных кластеров, включающих 3 порядка, 56 семейств, 9 подсемейств, 233 рода и 1550 видов вирусов, имеющих официальный таксономический статус.

Значительные изменения внесены в системе классификации вирусов позвоночных. Выделены новые семейства *(Artenviridae, Asfaviridae, Bomaviridae, Polyomaviridae, Papillomavlridae)* и «свободные» роды вирусов *(Dehavirus,* «Hepatitis E-Hke» viruses). Внесены изменения в названиях и структуре родов вирусов, входящих в некоторые семейства, а также поправки подразделения на виды. Расширен спектр материалов, касающихся структуры генома и особенностей репликации вируса. Значительный объем информации представлен в сравнительном аспекте.

В разделах, касающихся описания видов вирусов, названия официальных видов написаны с прописной буквы и выделены курсивом. Названия предполагаемых видов, альтернативные названия, названия штаммов и серотипов также написаны с прописной буквы, но не выделены курсивом. Роды вирусов, не имеющие принадлежности к определенному семейству («свободные» роды), подчеркнуты одной чертой.

Вместе с этим приведена утвержденная аббревиатура видов вирусов и номера сиквенсов вирусных геномов, официально зарегистрированных в генбанке (NCBI).

13.1 Концентрация вида в таксономии вирусов

Биологическая классификация является концептуальной конструкцией основанной на иерархической структуре, включающей виды, роды, семейства, отряды (порядки) и типы, которые не соответствуют группам реальных организмов, локализованных в пространстве и времени. Все члены вида, как таксономической категории, подвергаются бесконечным во времени изменениям в плане развития и эволюции, и, поэтому, всегда имеют присущую им вариабельность. Поэтому, целесообразнее рассматривать виды не как универсальные категории в классическом смысле, а как политетические исторические классы, члены которых существуют в определенное время в истории и разделяют только определенное число характерных атрибутов, которые могут изменяться со временем. Члены политетического класса не обязательно должны иметь общий для всех отдельный определенный характерный признак, как это необходимо для членов класса в традиционном понимании.

Потребовались многие годы, прежде чем было принято международное соглашение об определении понятия вирусного вида, применимого для всех вирусов, и ставшего общепринятым и ратифицированным МКТВ. В 1981 г было предложено следующее определение вида вируса: «вирусный вид это понятие, представляющее группу штаммов из разных источников, или популяцию штаммов из одного источника, имеющих, в целом, ряд коррелирующих стабильных признаков, отделяющих данную группу от других групп штаммов». Однако это определение не объясняет понятие штамма и предполагает группирование вирусов непосредственно на основе фенотипических признаков без учета факторов в ряду «предшественник-потомок». В 1989 г было предложено другое определение вирусного вида, в котором принималось во внимание, что вид представляет собой политетический класс, члены которого объединены на основе относительных (родственных) свойств родословной и по занимаемой экологической нише. В 1991 г МКТВ утвердил следующее определение: *«вид вируса это политетический класс вирусов, составляющих реплицирующуюся линию и занимающих определенную экологическую нишу».*

Политетический класс представляет собой некую таксономическую категорию, члены которой всегда имеют ряд общих признаков, хотя нет единого, общего для всех атрибута. В результате ни один из отдельных признаков не может быть использован в качестве определяющего, что обусловлено неотъемлемой вариабельностью членов вида.

Использование понятия реплицирующейся линии допускает, что вид вируса образуется членами, представляющими эволюционирующую линию (родословную), т.е. имеющими общее происхождение и представляющими потомство от общего предшественника. Виды претерпевают во времени бесконечные вариации, и, при достижении определенного уровня генотипических и фенотипических различий, происходит образование новых видов.

Экологическая ниша является одной из биотических характеристик членов вирусного вида, таких как спектр хозяев, тканевой тропизм, вирулентность, патогенез, ответ со стороны хозяина, переносчики (векторы) и естественная среда обитания (распространения). Экологическая ниша является не характеристикой окру-

жающей среды, а признаком, свойственным вирусу, связанным с его биотической средой обитания. При отсутствии вируса, его экологическая ниша, как характерный признак, так же отсутствует.

Идентификация вирусного изолята – это, основанный на ряде различных характеристик, сравнительный процесс, который показывает степень родства изолята с членами конкретного вида. Так как вид политетичен, сравнение должно проводиться по ряду характерных признаков, а не по наличию или отсутствию отдельного ключевого признака. Для подразделения на виды внутри одного рода могут быть использованы следующие характеристики:

а) родство геномных сиквенсов;

б) спектр естественных хозяев;

в) клеточный и тканевый тропизм;

г) патогенность и цитопатология;

д) пути передачи;

е) физико-химические свойства вириона;

ж) антигенные свойства.

Относительная важность данных характеристик для демаркации видов варьирует в отношении разных родов.

13.2 Международный код классификации и номенклатуры вирусов

1 Законодательная база Международного комитета по таксономии вирусов (МКТВ). МКТВ является комитетом Отдела вирусологии Международного союза микробиологических обществ (International Union of Microbiologica Societies). Деятельность МКТВ определяется уставом, согласованным с Отделом Вирусологии. Устав определяет цели и задачи МКТВ:

I создание международной таксономии вирусов;

II согласование международных названий таксонов вирусов, включая виды и субвирусные агенты;

III сообщение таксономической информации международным обществам ви-

русологов;

IV поддержание Индексов вирусных названий.

Устав определяет, что классификация и номенклатура должны быть основаны на Правилах Международного кода.

2 Принципы номенклатуры.

2.1 Основные принципы номенклатуры:

I достижение стабильности;

II избегание путаницы или ошибок;

III избегание принятия названий там, где в этом нет необходимости.

2.2 Номенклатура вирусов и субвирусных агентов является независимой от других биологических номенклатур. В рамках Международного кода биономенклатуры *(BioCode)* номенклатура вирусов и вирусных таксонов имеет статус исключения.

2.3 Основной целью наименования таксонов является создание системы ссылок (рекомендательного характера) на данный таксон, вместо определения особенностей или истории таксона.

2.4 Использование названий таксонов определено детально и полно посредством типов номенклатуры.

2.5 Названия таксонов не имеют статуса до момента их утверждения МКТВ.

3 Правила классификации и номенклатуры.

Общие правила. Универсальная схема.

3.1 Классификация и номенклатура вирусов должна быть международной и универсально подходящей для всех вирусов.

3.2 В системе универсальной классификации вирусов могут быть использованы следующие иерархические уровни: Порядок, Семейство, Подсемейство, Род и Вид.

Комментарий. Использование всех уровней таксономической иерархии необязательно. Основной является классификация вида вируса. Большинство видов отнесены в состав родов, и большинство родов включены в состав семейств. Виды, не отнесенные к роду, считаются «неклассифицированными внутри семейства», ро-

ды, не отнесенные к семейству, считаются неклассифицированными или «свободными». Некоторые семейства классифицируются вместе в порядок. Подразделение семейств на подсемейства проводится только для решения сложных иерархических проблем (см. пункт 3.29).

Примеры полной классификации вирусов:

1) вид *Mumps virus,* род *Rubulavirus,* подсемейство *Paramyxovirinae,* семейство *Paramyxoviridae,* порядок *Mononegavirales;*

2) вид *Hepatitis delta virus,* род *Deltavirus.*

3.3 МКТВ не несет ответственности за классификацию и номенклатуру вирусных таксонов ниже уровня вида. Классификация и названия серотипов, генотипов, штаммов, вариантов и изолятов вирусных видов является предметом деятельности международных групп специалистов.

Комментарий. Конкретные изоляты вирусов могут считаться штаммами, вариантами, кластерами и т.п. в составе вида. Классификация таких изолятов не относится к деятельности МКТВ, но является предметом деятельности международных групп специалистов. Исследовательские группы МКТВ принимают решение об отнесении того или иного изолята или группы изолятов в отдельный вид.

Решение о названии серотипов, генотипов, штаммов, вариантов и изолятов видов вирусов не относится к деятельности МКТВ. Однако рекомендуется, чтобы новые названия не повторяли или не напоминали уже существующие (см. п. 3.14). Если вирусный изолят предлагается выделить в отдельный вид, решение, касающееся названия вида, пригодного для формальной таксономии, принимает МКТВ. Исследовательские группы МКТВ подбирают название, согласно правилам Кода. Таксономические и номенклатурные изменения должны максимально отражать точку зрения большинства соответствующих вирусологических инстанций.

3.4 Искусственно созданные вирусы и лабораторные гибридные вирусы не имеют таксономической значимости. Их классификация является предметом деятельности международных групп специалистов.

Комментарий. Естественно возникающие изоляты, имеющие геном, образованный частями геномов разных штаммов вируса, или при рекомбинации, могут

быть классифицированы как виды или как подвидовые сущности. Правила Кода не распространяются на искусственно созданные варианты (образованные путем рекомбинации или реассортации) и мутантные вирусы.

Ограничения

3.5 Таксоны могут быть созданы только при условии, что вирусы, их представляющие, достаточно хорошо охарактеризованы и описаны в опубликованной литературе, что будет обеспечивать их недвусмысленную идентификацию и возможность различения от сходных таксонов.

3.6 Если нет четких предпосылок отнесения вида в тот или иной род, но принадлежность к семейству очевидна, вид получает статус неклассифицированного в составе семейства.

Комментарий. Вид может получить статус неклассифицированного члена семейства, если не выделено соответствующего рода. Например, *Bimbo virus* является рабдовирусом позвоночных, но не относится ни к одному из существующих на данный момент родов семейства *Rhabdoviridae;* данный вид имеет статус неклассифицированного вида внутри семейства.

3.7 Названия могут быть приняты только если они привязаны к таксону в соответствии с иерархическими уровнями, описанными в п. 3.2, и одобрены МКТВ.

Комментарий. Таксон надвидового уровня должен быть одобрен до того, как будет подобрано название. Предложение о создании таксона должно сопровождаться предложением названия. Таким образом, решение о создании таксона должно предшествовать решению о его названии. Виды должны утверждаться одновременно с их названиями.

Правила названия таксонов. Статус названий.

3.8 Название, предлагаемое для таксона, имеет значимость или официальный статус (valid name), если соответствует Правилам Кода и подходит таксону. Значимое название считается «принятым» (accepted name), если оно утверждено в качестве международного названия в Шестом Докладе МКТВ, или становится «принятым» при его одобрении (утверждении) МКТВ.

Комментарий. Значимым является название, опубликованное в привязке с

описаниями, и соответствующее Правилам Кода. Принятое название должно быть включено в Индекс МКТВ.

3.9 Существующие названия таксонов и вирусов должны сохраняться, где это возможно.

Комментарий. Стабильность номенклатуры является одним из принципов таксономии, поэтому, изменение названия может быть принято только в исключительных случаях, и только при сильном расхождении с Правилами.

3.10 Правило приоритета в названиях таксонов и вирусов не должно рассматриваться.

Комментарий. Более ранние варианты названий таксонов могут быть выбраны, как более удобные для вирусологов, но Правила должны гарантировать, что используемые названия не могут быть отменены, с приоритетом для более старых названий.

3.11 При создании названия для нового таксона нельзя использовать имена людей.

Комментарий. Названия для новых таксонов не могут быть созданы с использованием имен людей, путем прибавления формального имени человека или использования части его имени в качестве основы названия таксона. Если уже существующие названия видов включают имена людей, то в соответствии с п. 2.3 и 3.9, они продолжают использоваться без изменения.

3.12 Названия таксонов должны быть легко употребимыми и запоминаемыми.

Комментарий. Желательно использовать короткие названия с минимальным количеством букв (слов).

3.13 Нижние и верхние подписи (индексы), дефисы, кавычки и греческие буквы не могут быть использованы при создании новых названий.

Комментарий. Правила подразумевают создание названий, лишенных двусмысленности, пригодных для простого использования, легко произносимых, в соответствии с п. 3.12 Существующие названия некоторых видов не соответствуют этому правилу (например, колифаг X).

3.14 Новые названия не должны повторять уже принятые (утвержденные) на-

звания. Новые названия должны выбираться таким образом, чтобы они не были похожи на уже имеющиеся или употреблявшиеся в недалеком прошлом.

Комментарий. Название, подобранное для нового таксона, не должно звучать неотличимо от названия любого другого таксона. Например, существование рода *IrU dovims* подразумевает, что создание новых названий, таких как «*irodovirus*» или «*iridivirus*», неприемлемо, так как легко могут внести путаницу. Путаница может быть между названиями видов и родов, которые заканчиваются словом «*virus*». Например, название рода, подобранное для вида «*Omega virus*», не может иметь вид «*Omegavirus*».

3.15 Сложные слова могут быть приняты в качестве названий таксонов, с учетом того, что они имеют некоторую значимость для вирусологов, и предложены Исследовательскими группами.

Комментарий. Сложные названия образуются путем соединения букв и/или их комбинаций, взятых из отдельных слов. Название рода *Reovirus* образовано от начальных букв следующих слов: «R» от «Respiratory», «e» от «Enteric» и «o» от «orphan».

Принятие решений.

3.16 Если предлагается несколько вариантов названий, то соответствующий Подкомитет должен дать рекомендацию Исполнительному комитету МКТВ, который примет решение о наиболее подходящем названии и предложит его МКТВ для утверждения.

Комментарий. Если для одного таксона предлагается несколько вариантов названий, то решение о выборе названия, должно базироваться на правилах Кода, и, если это необходимо, на согласии большинства вирусологов.

3.17 Если для таксона нет подходящего названия, таксон может быть принят без определенного названия, с последующим выбором и утверждением названия МКТВ.

Комментарий. Если род не получил названия он обозначается кавычками. Например, вид *Gallid herpesvirus 2* (Marelcs disease virus type 1) является членом рода «Marek's disease-like viruses». Такое обозначение считается временным.

3.18 Новые названия должны выбираться таким образом, чтобы они (или их части) не выражали значения таксона, которое 1) кажется неподходящим для вирусов, не имеющих характеристик, упомянутых в названии, но являющихся членами данного таксона; 2) кажется неподходящим для вирусов, недостаточно охарактеризованных на данный момент, но, которые могут относиться к данному таксону; 3) будет подразумевать включение в таксон вирусов, уже входящих в другие таксоны.

3.19 Новые названия должны выбираться соотносительно с национальными или местными условиями. Если вирусологами универсально используются названия, известные по опубликованным работам, то они или их производные должны быть взяты за основу при создании новых названий, без учета национальных особенностей.

Процедура принятия названия таксона.

3.20 Предложение нового названия, изменения названия, создания таксона и определение его таксономического положения должно быть принято Исполнительным комитетом МКТВ в форме таксономического предложения. Перед принятием решения все соответствующие Подкомитеты и Исследовательские группы МКТВ должны быть проконсультированы.

Комментарий. Например, таксономическое предложение относительно семейства *Parlitivindae* должно быть рассмотрено Подкомитетом по вирусам грибов и одной из его Исследовательских групп, но так как некоторые роды данного семейства включают вирусы растений, предложение так же должно быть рассмотрено Подкомитетом вирусов растений.

Определение вида вируса.

3.21 Вид вируса – это политетический класс вирусов, составляющих реплицирующуюся линию и занимающих определенную экологическую нишу.

Определение статуса «предполагаемого» вида.

3.22 Если Подкомитет МКТВ не имеет определенности в отношении таксономического статуса нового вида вируса или в отношении включения нового вида в состав уже имеющихся родов, то данный вид обозначается как предполагаемый вид (tentative species) соответствующего рода или семейства. Названия предполагаемых

видов, как таксонов (п. 3.14), не должны дублировать уже утвержденные названия и выбираются таким образом, чтобы они не были похожими на названия, уже использующиеся или использовавшиеся в недалеком прошлом.

Комментарий. Виды, имеющие статус предполагаемых, могут, впоследствии, рассматриваться соответствующими Исследовательскими группами и получить официальный статус вида.

Формирование названия.

3.23 Название вида должно состоять из минимального количества слов, но, в то же время, не должно состоять только из названия хозяина и слова «вирус».

Комментарий. При выборе названия вида вируса могут быть использованы разные стили и подходы, которые определяются традициями, сложившимися в отдельных областях вирусологии. Например, названия видов вирусов растений образуются по схеме хозяин + симптом + «вирус», тогда как многие арбовирусы, как, например, вирусы семейства *Bunyaviridae,* обычно, получают название по месту, где они были выделены + «вирус» (*Bunyamwera virus*).

3.24 Название вида вируса должно обеспечивать соответствующую однозначную идентификацию вида.

3.25 Цифры (номера), буквы или их комбинации могут быть использованы как видовые эпитеты, там, где такие номера и буквы уже широко используются. Однако вновь даваемые серийные номера, буквы или их комбинации не могут быть приняты одни, как видовые эпитеты. Если номера и буквы составляют серию, это может быть продолжено.

Правила, касающиеся рода.

3.26 Род – это группа видов, имеющих определенные общие признаки.

3.27 Название рода обозначается одним словом, оканчивающимся на - *virus*.

3.28 Утверждение нового рода должно сопровождаться утверждением типового вида.

Правила, касающиеся подсемейства.

3.29 Подсемейство – это группа родов, имеющих определенные общие признаки. Данный таксон может быть использован только при необходимости разреше-

ния сложных иерархических проблем.

3.30 Название подсемейства обозначается одним словом, оканчивающимся на – *virin*

Правила, касающиеся семейства.

3.31 Семейство – это группа родов (вне зависимости от того, входят они в состав подсемейств или нет), имеющих определенные общие признаки.

3.32 Название семейства обозначается одним словом, оканчивающимся на -*viridae.*

Правила, касающиеся порядка.

3.33 Порядок – это группа семейств, имеющих определенные общие признаки.

3.34 Название порядка обозначается одним словом, оканчивающимся на – *virales.*

Правила, касающиеся субвирусных агентов.

Вироиды.

3.35 Правила, касающиеся классификации вирусов могут быть использованы для классификации вироидов.

3.36 Формальным окончанием названий таксонов вироидов является слово «*viroid*» – относительно названия вида, суффикс «-*viroid*» – относительно названия рода, суффикс «-*viroinae*» – относительно названия подсемейства (если данный таксон необходим), и «-*viroidae*» – относительно названия семейства.

Комментарий. Например, вид *Potato spindle tuber viroid* классифицирован в род *Pospiviroid* и семейство *Pospiviroidae.*

Другие субвирусные агенты.

3.37 Ретротрапспозоны по классификации и номенклатуре считаются вирусами.

3.38 Сателлиты и прионы не классифицированы как вирусы, но имеют условную классификацию, удобную для работников соответствующих сфер деятельности.

Правила орфографии.

3.39 В формальной таксономии все названия таксонов (порядков, семейств, подсемейств и родов), имеющие официальный статус, пишутся курсивом с пропис-

ной буквы.

Комментарий. Определение утвержденного названия см. в п. 3.8.

3.40 Названия видов, пишутся курсивом; с прописной буквы пишется только первое слово, если остальные не являются именами собственными или их частью.

Комментарий. В качестве примера правильного обозначения вида, как некоторой формальной таксономической единицы, можно привести название вида *Murray River encephalitis virus* (пишется курсивом, первое слово и второе, как имя собственное, пишутся с прописной буквы).

Таксоны являются абстракциями, поэтому, там где их названия носят формальный характер, они пишутся курсивом и с прописной буквы. Если в название вкладывается другой смысл, например, прилагательного (например, полимераза вируса желтой лихорадки), или речь идет неких физических сущностях (например, вирионах при электронной микроскопии), то нет необходимости написания названия вида курсивом и с прописной буквы.

Это Правило было введено в 1998 г и отличается от Правил Кода, опубликованных в Шестом Докладе МКТВ.

3.41 При формальном использовании название типа таксона должно предшествовать названию таксономической единицы.

Комментарий. Например, формальное упоминание различных таксонов должно выглядеть следующим образом: семейство *Herpesviridae;* род *Morbillivirus;* и т.п.

14 Таксономический каталог вирусов и субвирусных агентов позвоночных

14.1 ДНК-содержащие вирусы

14.1.1 Семейство: *Poxviridae*

Подсемейство: *Chordopoxvirinae*

Род: *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Yatapoxvirus*

Подсемейство: *Entomopoxvirinae*

Род: *Entomopoxvirus A*, *Entomopoxvirus B*, *Entomopoxvirus C*

Характеристика вириона. Вирион плеоморфный, чаще формы параллелепипеда: от 220 нм до 450 нм (длина) × от 140 нм до 260 нм (ширина) × от 140 нм до 260 нм (толщина). Липопротеидная поверхностная мембрана с тубулярными или глобулярными субъединицами (от 10 нм до 40 нм). Так же возможна овоидная форма вириона (от 250 нм до 300 нм (длина) × от 160 нм до 190 нм (диаметр)), мембрана которого содержит спиральные филаменты (от 10 нм до 20 нм в диаметре). Поверхностная мембрана скрывает двояковогнутое или цилиндрическое ядро, состоящее из ДНК и белков (нуклеопротеиновый комплекс). Между поверхностной и коровой мембранами в вогнутостях присутствуют 1-2 латеральных тела. Зрелые внутриклеточные вирионы окружены мембраной, имеющей происхождение от аппарата Гольджи, и включающей вирусспецифические белки. Некоторые вирусы позвоночных (например, вирус оспы коров *Cowpox virus)* могут быть сконцентрированы в виде телец-включений, тогда как другие (энтомопоксвирусы) могут быть локализованы разрозненно.

Вирионы могут агрегироваться в высокосолевых растворах. В большинстве случаев вирионы чувствительны к воздействию обычных детергентов, формальдегида, окислителей и температуре выше 40 °C. Некоторые представители устойчивы

к воздействию эфира и сохраняют инфекционность после обработки трипсином. Поверхностная мембрана может быть удалена неионными детергентами и сульфгидрильными реагентами. В высушенном состоянии вирионы устойчивы длительное время при комнатной температуре. Лиофилизация не приводит к заметной потере инфекционности.

Геном. ДНК. Одна линейная молекула. Ковалентно закрытая, двуспиральная. Длина от 130 kbp до 375 kbp. Составляет около 3 % веса частицы.

Протеины. Протеины составляют около 90 % веса частицы. Геном кодирует от 150 до 300 белков, около 100 из которых входят в состав вириона. Липопротеидная оболочка вириона содержит вирусспецифические полипептиды. Энтомопоксвирусы могут быть окружены вирусспецифическим мажерным структурным протеином – сфероидином. Ортопоксвирусы также могут быть внутри телец-включений, образованных одним протеином.

Липиды. Составляют около 4 % веса частицы. Оболочка вирионов содержит гликолипиды, которые могут быть модифицированными липидами клетки.

Углеводы. Составляют около 3 % веса частицы. Некоторые вирусные протеины содержат N- и С-ассоциированные гликаны.

Организация генома и репликация. Геном поксвирусов представлен молекулой линейной двуспиральной ДНК, имеющей ковалентно закрытые концы. Концевые шпильки включают две изомерных, неполностью спаренных, так называемых флип-флоп формы ДНК, образованных инвертированными комплементарными сиквенсами. В близи концов могут быть тандемные повторы разного размера.

Репликация происходит, как правило, в цитоплазме. Проникновение в клетку внутриклеточного вируса и внеклеточного оболочечного вируса происходит разными путями. После адсорбции вириона проникновение в клетку зрелого внутриклеточного вируса происходит путем слияния плазматической мембраны и последующего высвобождения кора в цитоплазму, после чего продолжаются последующие этапы раздевания. Внеклеточные оболочечные вирионы, в отличие от внутриклеточных, для высвобождения кора должны обязательно пройти этап слияния с эндосомальными мембранами.

Полиаденилированные, кэпированные первичные мРНК транскрипты, представляющие около 50 % генома, первоначально синтезируются с обоих цепей ДНК за счет ферментов кора, включая вирускодируемую мультисубъединичную РНК полимеразу. Для последующей трансляции клеточными рибосомами происходит освобождение транскриптов из кора. Во время синтеза ранних протеинов ингибируется синтез макромолекул клетки. Репродукция вируса в цитоплазме клеток сопровождается образованием базофильных (тип В) включений, называемых вироплазмами.

Геном содержит близко расположенные ORb's, без интронов, некоторые из которых могут частично перекрывать предыдущую за счет вирусспецифических промоторов, которые регулируют транскрипцию трех классов генов. Первый класс генов (ранние гены) экспрессируется с частично раздетого вириона до репликации ДНК (они кодируют многие неструктурные протеины, включая энзимы, участвующие в репликации генома и модификации ДНК, РНК и в подавлении ответа хозяина). Ранние гены кодируют также промежуточные транскрипционные факторы. Промежуточные гены (кодирующие поздние транскрипционные факторы) экспрессируются во время периода репликации ДНК и необходимы для последующей поздней транскрипции генов. Поздние гены экспрессируются во время пост-репликативной фазы (они, в основном, кодируют вирусные структурные протеины, но могут также кодировать и ранние транскрипционные факторы). Несмотря на то, что репликация происходит в цитоплазме, есть свидетельства о необходимости участия ядерных протеинов в пост-репликативной транскрипции.

мРНК кэпированы, полиаденилированы по 3'-концу, но не сплайсированы. Многие промежуточные, поздние и некоторые ранние мРНК имеют поли(А)-тракт, который предшествует кодируемой мРНК. Ранний синтез протеинов обычно снижается во время экспрессии поздних генов, но некоторые гены экспрессируются с промоторов как ранней, так и поздней активности. Определенные протеины проходят пост-трансляционную модификацию (протеолитическое разрезание, фосфорилирование, гликозилирование, рибозилирование, сульфатирование, ацилирование, пальмитилирование и миристилирование). Протеолитическое разрезание поздних протеинов необходимо для морфогенеза вириона.

Репликация геномной ДНК происходит, главным образом, за счет вирусных энзимов. Репликация ДНК проходит по механизму самопраймированного унинаправленного смещения цепи, при котором образуются конкатомерные репликативные промежуточные формы, освобождающиеся путем специфического разрезания до одинаковых по размеру ДНК, которые, затем, ковалентно закрываются. Показана возможность генетической рекомбинации внутри рода, которая может происходить между дочерними молекулами во время репликации. Негенетическая реактивация генома, приводящая к появлению инфекционного вируса, была показана на внутри- и межродовом уровне в подсемействе *Chordopoxvirinae.*

Морфогенез вируса начинается вслед за репликацией ДНК и экспрессией ранних, промежуточных и поздних генов. Сборка частиц инициируется образованием серповидных мембранных структур. Реплицированные конкатамерные ДНК, представляющие геномную единицу, упаковываются в незрелую вирусную частицу, которая затем претерпевает процесс созревания с образованием зрелой внутриклеточной вирусной частицы, обладающей (при условии выхода из клетки) инфекционностью. Часть зрелых внутриклеточных вирионов получают оболочку, представляющую собой модифицированную мембрану аппарата Гольджи, транспортируется на периферию клетки, где слияние оболочечного вириона с плазматической мембраной приводит к высвобождению внеклеточных оболочечных вирионов. Таким образом, оболочечные вирионы приобретают клеточные липиды и дополнительные вирус-специфические протеины, включая гемагглютинирующий протеин. Оболочка расположена близко к поверхностной мембране. Так как инфекционностью обладают как внеклеточные оболочечные, так и внутриклеточные вирионы, внешние антигены таких вирусов различны, что определяет прикрепление таких вируса к разным клеточным рецепторам и разные механизмы раздевания.

Вирусная ДНК и несколько протеинов организуются у всех инфекционных вирионов в нуклеопротеиновый комплекс кора. Внутриклеточные зрелые вирионы имеют окружающую поверхностную мембрану, латеральные тела и нуклеопротеиновый коровый комплекс. Кор вируса вакцины *(Vaccinia virus)* покрыт мембраной толщиной 9 нм с регулярной субъединичной структурой, и имеет двояковогнутую

форму, что связано, вероятно, с наличием латеральных тел (или артефактами подготовки пробы). Поверхностная липопротеиновая мембрана, покрывающая кор вируса вакцины и латеральные тела, имеет толщину около 12 нм и содержит неодинаковые поверхностные трубочки, сформированные мелкими глобулярными субъединицами. Во время естественной инфекции распространение вируса происходит, в основном, за счет вирусных частиц, высвобождающихся из клеток (внеклеточные оболочечные вирионы).

Антигенные свойства. Внутри каждого рода подсемейства *Chordopoxvirinae* отмечается значительная перекрестная реактивность. Нейтрализующие антитела родоспецифичны. Антитела к нуклеопротеину (получаемому при обработке вируссодержащей суспензии 0,04 М NaOH при 56 °С) имеют широкую перекрестную реактивность. Ортопоксвирусы имеют гемагглютинирующие антигены, которые в других родах встречаются редко.

Биологические особенности. Пути распространения инфекции (для подсемейства *Chordopoxvirinae):* аэрозольно, контактно, переносчиками (механически). Представители подсемейства *Entomopoxvirinae* распространяются членистоногими (механически). В природе спектр патогенности узок, хотя в лабораторных условиях число восприимчивых биологических систем значительно выше. Многие поксвирусы позвоночных вызывают макуло-папуллезную, везикулярную сыпь после системной или локальной инфекции. Резервуарами в природе поксвирусов, инфицирующих людей, являются различные виды позвоночных, кроме вируса контагиозного моллюска и ортопоксвируса *Variola virus*. Вирусы данного семейства могут быть подразделены на основе способности к образованию внутриклеточных включений: *Chordopoxvirinae* - ацидофильные (тип А) тельца-включения; *Entomopoxvirinae* - включения или сфероиды. Включения могут защищать таких поксвирусов при неблагоприятных условиях.

Нейтрализующие антитела и клеточно-опосредованный иммунитет играет решающую роль в борьбе с поксвирусными инфекциями. Реинфицирование случается редко, и, обычно, легко протекает. Контагиозный моллюск может возникать вновь после заражения других областей кожи вирусом из первичных очагов.

14.1.1.1 Подсемейство: *Chordopoxvirinae*

Включает поксвирусы позвоночных, имеющих форму параллелепипеда или овоида, с низким содержанием G + C (от 30 % до 40 %), за исключением парапоксвирусов (64 %) и вируса контагиозного моллюска (63 %). В пределах рода наблюдаются широкие перекрестные реакции и перекрестная защита. Эта особенность менее заметна среди авипоксвирусов. Некоторые вирусы образуют оспины на хорион-аллантоисной оболочке (ХАО) куриных эмбрионов.

Род: *Orthopoxvirus*

Типовой вид: *Vaccinia virus* (VACV) (вирус вакцины).

Характерные особенности. Вирион имеет форму параллелепипеда, 200 × 200 × 250 нм. Устойчив к воздействию эфира. Наблюдается широкая перекрестная реактивность между вирусами. Инфицированные клетки синтезируют гемагглютинин, который обладает гемадсорбирующей и гемагглютинирующей активностью в отношении эритроцитов некоторых видов птиц и разрушению оболочки внеклеточных оболочечных вирусов. Сайты нейтрализации внеклеточных вирионов отличаются от таковых внутриклеточных вирионов. В природе спектр патогенности узок, хотя в лабораторных условиях число восприимчивых биологических систем (животных и культурах клеток) значительно выше.

Размер ДНК от 170 kbp до 250 kbp, G + C состав 36 %. Наблюдается широкая перекрестная гибридизация на внутри- и межродовом уровне.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Полиморфизм генов, кодирующих гемагглютинин и белок-включение типа А; морфологические особенности оспин; максимальная температура, поддерживающая культивирование на куриных эмбрионах. В ряде случаев важен учет экологических ниш и спектра естественных хозяев. Дополнительно имеет значение анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP) концевых участков вирусной ДНК за пределами общих генов. В настоящее время официально зарегистрировано 9 основных и 2 предполагаемых вида вирусов данного рода.

Род: *Parapoxvirus*

Типовой вид: *Orf virus* (ORFV) (вирус Orf, вирус контагиозного пустулезного дерматита, вирус контагиозной эктимы).

Характерные особенности. Вирион: овоидный, от 200 нм до 300 нм × от 140 нм до 170 нм, поверхностные филаменты упорядоченно пересекаются и имеют вид накрученной нити. Размер ДНК от 130 kbp до 150 kbp, G + C состав 64 %. Большинство видов перекрестно реагируют между собой в ДНК-гибридизации и серологических реакциях. Перекрестная гибридизация и карта ДНК свидетельствует о широкой дивергенции сиквенсов разных членов рода, более высокой, чем у членов рода ортопоксвирусов. Как правило, все вирусы были выделены от копытных (чаще одомашненных). Имеют узкий спектр восприимчивых культур клеток.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Наиболее пригодным критерием при видовой идентификации является определение вида животного-хозяина. Вместе с этим, предлагается использовать результаты анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP) и перекрестной гибридизации (особенно по концевым участкам генома). В настоящее время официально зарегистрировано 5 основных и 3 предполагаемых вида.

Род: *Avipoxvirus*

Типовой вид: *Fowlpox virus* (FWPV) (вирус оспы кур).

Характерные особенности. Вирион кирпичеобразный (330 × 280 × 200 нм). ДНК 300 kbp. При обработке эфиром инфекционность не снижается. В состав рода входят вирусы птиц, способствующие возникновению пролиферативных кожных поражений (кожная форма) и/или поражений желудочно-кишечного и респираторного (верхние дыхательные пути) трактов (дифтеритическая форма). Перекрестная защита различна. Распространение вирусов происходит с участием членистоногих (механический перенос), при непосредственном контакте или аэрозольно. В серологических тестах просматривается значительная перекрестная активность. Вирусы продуцируют тельца-включения А-типа, со значительным количеством липидов. Продуктивная инфекция вирусов наблюдается в культурах клеток птиц. У млекопитающих и в культурах клеток млекопитающих инфекция, вызванная вирусами дан-

ного рода протекает абортивно. Вирусы распространены повсеместно.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Для видовой идентификации используют такие критерии, как характеристика болезни, хозяин и экологическая ниша, ростовые характеристики при культивировании на хорион-аллантоисной мембране, спектр восприимчивых культур клеток. Предлагается использовать результаты анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP) и перекрестной гибридизации (особенно по концевым участкам генома). В настоящее время официально зарегистрировано 10 основных и 3 предполагаемых вида.

Род: *Capripoxvirus*

Типовой вид: *Sheeppox virus* (SPPV) (вирус оспы овец).

Характерные особенности. Вирион имеет форму параллелепипеда, 300 × 270 × 200 нм. Вирус чувствителен к воздействию эфира и хлороформа. Размер ДНК 154 kbp. Род включает вирусы овец, коз и КРС. Вирус распространяется членистоногими (механически) и контактно. Наблюдается значительная перекрестная защита и реактивность на антигенном и генетическом (ДНК-гибридизация) уровнях.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Только по результатам анализа RFLP. В настоящее время официально зарегистрировано 3 вида.

Род: *Leporipoxvirus*

Типовой вид: *Myxoma virus* (MYXV) (вирус миксомы).

Характерные особенности. Вирион имеет форму параллелепипеда, 300 × 250 × 200 нм. Вирус чувствителен к воздействию эфира. Размер ДНК 160 kbp, G + C состав 40 %. Вирус распространяется контактно и членистоногими (механически). Вирусы миксомы и фибромы вызывают у хозяев образование локальных доброкачественных опухолей. Вирус миксомы вызывает тяжело протекающую болезнь у Европейских кроликов. Перекрестное родство (антигенное и генетическое) и защита хорошо выражены.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Результаты РН (ингибирование образования бляшек), результаты анализа перекрестной защиты на животных, РДП. Учитываются экологические ниши, спектр восприимчивых животных, проявление болезни, характеристики образуемых бляшек, спектр восприимчивых клеточ-

ных культур и, как дополнение, RFLP. В настоящее время официально зарегистрировано 4 вида.

Род: *Suipoxvirus*

Типовой вид: *Swinepox virus* (SWPV) (вирус оспы свиней).

Характерные особенности. Вирион имеет форму параллелепипеда, 300 × 250 × 200 нм. ДНК (175 kbp) с инвертированными концевыми последовательностями в 5 kbp. Вирус образует бляшки в культуре клеток почки или тестикул свиньи (один пассаж в течение 3 дней при 37 °C). Вирус вызывает бессимптомную генерализованную болезнь кожи у свиней, локализующуюся в эпителии и региональных лимфоузлах. Обычно вируснейтрализующие антитела не обнаруживаются. Вирусы распространены повсеместно. Предполагается возможность механического переноса членистоногими (вши). В настоящее время официально зарегистрирован 1 вид.

Род: *Molluscipoxvirus*

Типовой вид: *Molluscum contagiosum virus* (MOCV) (вирус контагиозного моллюска).

Характерные особенности. Вирион имеет форму параллелепипеда, 300 × 250 × 200 нм. Размер ДНК 188 kbp. G + C состав 60 %. Отмечена сильная перекрестная ДНК-гибридизация. В первичных культурах клеток (из тканей органов человека или животных) накапливается плохо. Вирус распространяется контактно среди детей и подростков, чаще половым путем. Часто инфекция возникает как оппортунистическая у людей, больных СПИДом или с экземой. Инфицированные клетки увеличены, с цитоплазматическими включениями. Инфекция может рецидивировать, а проявление изменяться при бактериальном инфицировании.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Вид только один, но данные RFLP, свидетельствуют о существовании двух основных вариантов. В настоящее время официально зарегистрирован 1 вид.

Род: *Yatapoxvirus*

Типовой вид: *Yaba monkey tumor virus* (YMTV).

Характерные особенности. Вирион кирпичеобразный, 300 × 250 × 200 нм. Размер ДНК 146 kbp, G + C состав 33 %. *Yaba monkey tumor virus* вызывает у приматов развитие гистиоцитом и опухолеподобных масс мононуклеарных клеток. Вирусы выделялись от содержащихся в неволе обезьян и экспериментально инфицированных кроликов. Сообщалось о лабораторном заражении людей. Несмотря на широкую перекрестную ДНК-гибридизацию, на основе рестрикционных карт предполагаются значительные различия сиквенсов между *Tanapox virus* и *Yaba monkey tumor virus. Tanapox virus* вызывает у приматов локализованные изменения, являющиеся следствием механического переноса вируса насекомыми в период сезона дождей в африканских лесах. Поражения обычно содержат вирионы с двухслойной оболочкой, окружающей вирусную мембрану.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Вид только один, но данные RELP, свидетельствуют о существовании двух основных вариантов. В настоящее время официально зарегистрировано 2 вида.

14.1.1.2 Подсемейство: *Entomopoxvirinae*

Характерные особенности. Вирусы насекомых. Вирионы имеют различные морфологические формы. Размер от 70 нм до 250 нм × 300 нм. Вирионы содержат от 1 до 2 латеральных тел, G + C состав вирусной ДНК 20 %. Вирион включает не менее 4-х ферментов, аналогичных вирусу вакцины. Вирионы некоторых типов имеют на поверхности глобулярные выступы. Общая колинеарность по коровым генам отличается от таковой представителей *Chordopoxvirinae,* и является главным характерным признаком подсемейства. Серологического родства с хордопоксвирусами нет. Реплицируются в цитоплазме клеток насекомых (гемоцитах, и культуре клеток жировой ткани). Зрелые вирионы обычно формируют сфероиды, включающие белок сфероидин. Подразделение на роды основано на морфологии вириона, спектре хозяев, размере генома.

Род: *Entomopoxvirus A* (7 видов)

Типовой вид: Melolonta melolonta entomopoxvirus (MMEV) [509284, 987084].

Род: *Entomopoxvirus B* (14 видов).

Типовой вид; Amsacta moorei entomopoxvirus (AMEV) [M80924, M77182].

Род: *Entomopoxvirus* C (6 видов).

Типовой вид: Chironomus luridus entomopoxvirus (CLEV).

Неклассифицированные вирусы семейства (15 видов).

14.1.2 Семейство: *Asfaviridae*

Род: *Asfavirus*

Типовой вид: *African swine fever virus* (ASFV) (вирус африканской чумы свиней)

Характеристика вириона. Вирион состоит из нуклеопротеиновой коровой структуры, от 70 нм до 100 нм в диаметре, окруженной внутренним липидным слоем, икосаэдральным капсидом, от 172 нм до 191 нм в диаметре, и внешней липидосодержащей оболочкой. Икосаэдральный капсид (T = от 189 до 217) состоит из от 1892 до 2172 капсомеров, каждый из которых (13 нм в диаметре) имеет форму гексагональной призмы с центральным отверстием. Расстояние между капсомерами от 7,4 нм до 8,1 нм. Внеклеточные оболочечные вирионы имеют диаметр от 175 нм до 215 нм.

Плавучая плотность в Перколле 1,095 г/см^3, в CsCl от 1,19 г/см^3 до 1,24 г/см^3.

Вирион чувствителен к хлороформу, эфиру, дезоксихолату, облучению, инактивируется при 60 °C в течение 30 минут, при 20 °C или 4 °C сохраняется в течение нескольких лет. Инфекционность сохраняется при спектре pH от 4 до 13. Инактивируется дезинфектантами (1 %-ным формальдегидом – за 6 суток, 2 %-ным NaOH – за 1 сутки), очень эффективны парафенилфенольные соединения.

Геном. ДНК от 170 kbp до 190 kbp. Одна молекула, двуспиральная, линейная, с ковалентно закрытыми концами.

Концевые последовательности инвертированы, комплементарны друг другу, имеют идентичные тандемные повторы длиной 2,1 kbp. Геном кодирует 150 ORFs.

Другие компоненты вириона. Вирион содержит более 50 протеинов, в том

числе ферменты (РНК полимеразу, поли(А)-полимеразу, гуанилтрансферазу и протеинкиназу). Мажерные структурные вирусные протеины: p72, p30; структурные протеина p150, p37, p14 и p34 предшественником которых является протеин с Mr 220×10^3; p35 и p15, предшественником которых является протеин с Mr 62×10^3. Кроме этого, вирион содержит два ДНК-связывающих протеина p10 и p14,5; семь протеинов, содержащих трансмембранные регионы (p12, p17, p22, p54 или J13L, J18L, J5R и EP402R). Остальные протеины являются неструктурными и их количество и вид варьирует в зависимости от изолятов.

Оболочечные вирионы содержат липиды (гликолипиды). Углеводные соединения входят в состав протеина (EP402R) и гликолипидов. Вирус кодирует несколько трансмембранных протеинов, предположительно содержащих сайты N-гликозилирования.

Организация генома и репликация. Определено 150 открытых рамок считывания расположенных на обеих цепях ДНК. Межгенные участки имеют размер не более 200 kbp, и могут содержать повторяющиеся последовательности.

Репликация вириона происходит, в основном, в макрофагах свиней *in vivo* и *in vitro,* хотя некоторые изоляты были адаптированы к культурам клеток. Вирус проникает в клетку путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, после чего в цитоплазме сразу начинается ранний синтез мРНК с использованием ферментов и кофакторов, входящих в состав вирусного кора. Репликация вирусной ДНК и сборка происходят в перинуклеарных областях. Пик репликации ДНК приходится на 8-й час после заражения. Для продуктивной инфекции требуется ядро клетки.

Транскрипты полиаденилированы по 3'-концам и кэпированы по 5'-концам. Экспрессия генов происходит по определенному каскадному типу. Ранние гены экспрессируются до репликации ДНК, после начала которой начинается экспрессия поздних. Некоторые структурные протеины экспрессируются как полипротеины с последующим разрезанием по сайтам GlyGlyX, остальные модифицируются фосфорилированием (p10, p32) и N-гликозилированием.

Морфогенез вирионов происходит в определенных участках, богатых фибриллярным и мембранным материалом. Два слоя мембран имеют происхождение от эн-

доплазматического ретикулума и инкорпорируются как внутренние липидные мембраны, на которых, предположительно, происходит образование вирусного икосаэдрального капсида. Геном вируса и энзимы упаковываются внутрь нуклеопротеинового кора. Внеклеточный вирус имеет не плотно прилегающую липидную мембрану, образующуюся при почковании через плазматическую мембрану.

Антигенные свойства. Инфицирование свиней слабовирулентными штаммами способствует появлению антител. Антитела могут нейтрализовать штаммы вируса, характеризующиеся низким уровнем пассажей в культуре клеток, но не эффективны против вирусов, прошедших много таких пассажей. Эти различия могут быть связаны с изменениями фосфолипидов вируса. Антитела против p72, p12, p30 и p54 нейтрализуют вирус, антитела против p30 ингибируют проникновение вируса. Анализ с использованием моноклональных антител показал, что протеины p150, p14 и p12 разных изолятов различаются. Некоторые протеины (например, p54 или J13L и B602L или 9RL) содержат тандемные повторы, количество и сиквенс которых также различаются.

Биологические особенности. Вируса африканской чумы свиней вызывает инфекцию у домашних свиней *(Suis scrofa domesticus* и *S. s. ferus*), бородавочников *(Phacochoerus aethiopicus)* и кустарниковых свиней *(Potamochoerusporcus).* Так же инфицируются мягкие клещи рода *Ornithodoros* (*O. moubata* – на юге Сахары в Африке, *O. erraticus* – в Португалии и Испании). Вирус передается среди клещей трансстадийно, трансовариально и половым путем. Свиньи инфицируются при укусах инфицированными клещами. Болезнь проявляется у домашних и диких Европейских свиней. Среди бородавочников не наблюдается ни горизонтальной, ни вертикальной передачи вируса. Однако среди домашних животных наблюдается передача вируса при прямом контакте, косвенно через зараженный корм (инфицированное мясо) или механически при укусах мухами. Бородавочники, кустарниковые свиньи и домашние свиньи, так же как и клещи, являются резервуаром вируса в природе. Болезнь эндемична во многих африканских странах и в Сардинии. В Европу была занесена в 1957 г (в Португалию), после чего стала эндемичной на Иберийском полуострове вплоть до 1995 г. Спорадические вспышки с последующим искоренением происхо-

дили в Бельгии, Бразилии, Кубе, Доминиканской Республике, Франции, Гаити, Голландии и Мальте. Наблюдается различная вирулентность штаммов вируса. Высоковирулентные изоляты характеризуются 100 % смертностью в течение промежутка времени от 7 до 10 дней. Менее вирулентные изоляты приводят к длительному вирусоносительству. Вирус реплицируется в мононуклеарных фагоцитах и клетках ретикуло-эндотелиальной системы лимфоидных тканей и органов домашних свиней. Широко распространенный некроз лимфоидной ткани и нарушение эндотелиальных клеток в артериолах и капиллярах приводят к поражениям, видимым при острой форме течения болезни. В настоящее время официально зарегистрирован 1 вид.

14.1.3 Семейство: *Iridoviridae*

Род: *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Ranavirus*, *Lymphocystivirus*

Характеристика вириона. Вирион икосаэдральной симметрии. Диаметр вириона от 120 нм до 200 нм, но может достигать 350 нм. Кор сильно гидратирован, включает длинный скрученный нуклеопротеиновый филамент и окружен липидной мембраной, сквозь которую проходят трансмембранные частицы. Капсид состоит из идентичных капсомеров (от 6 нм до 7 нм в диаметре и от 7 нм до 13 нм в длину), количество которых зависит от размера частицы. От капсида отходят фиберы или короткие филаменты. Вирусы животных и, культивируемые в культуре клеток, вирусы беспозвоночных имеют внешнюю оболочку.

Мг вириона от 1050×10^6 до 2000×10^6, плавучая плотность от 1,35 г/см^3 до 1,6 г/см^3.

Вирионы стабильны в воде при 4 °С длительное время. Чувствительность к pH и эфиру различна. Все вирусы инактивируются при 55 °С в течение от 15 до 30 мин.

Геном. ДНК молекула, линейная, двуспиральная. Размер от 140 kbp до 303 kbp. *Invertebrate iridiscent virus 1* имеет дополнительный геномный компонент 10,8 kbp, существующий в виде трех молекул в структуре кора. ДНК составляет от 12 % до 16 % массы вириона. G + C состав от 28 % до 54 %. ДНК некоторых вирусов позвоночных сильно метилирована.

Другие компоненты вириона. Вирион включает до 36 полипептидов с Mr от 10×10^3 до 250×10^3. 40 % вирусного белка представлено мажерным капсидным протеином (Mr от 48×10^3 до 55×10^3). Сразу же после инфицирования клетки, вирусные белки выключают синтез клеточных макромолекул.

Безоболочечные частицы содержат от 5 % до 17 % липидов (фосфолипидов), образуемых *de nova.* Вирусные частицы, вышедшие за пределы клетки, могут иметь внешнюю оболочку клеточного происхождения, не оказывающую влияния на инфекционность. Углеводов в составе вирионов не обнаружено.

Организация генома и репликация. Проникновение вируса в клетку происходит по типу пиноцитоза с последующим раздеванием в фагоцитарных вакуолях. Стратегия репликаций иридовирусов отличается от таковой других ДНК-содержащих вирусов. Геном вируса служит матрицей для ранней репликации ДНК. Вновь образованные копии ДНК могут так же служить матрицами для копирования или транспортироваться в цитоплазму, в которой образуют крупные скопления. Транскрипция происходит в ядре и цитоплазме и контролируется вирусными полипептидами. ДНК из цитоплазматических скоплений переходит в зрелое состояние при включении в состав вириона. Сборка вириона происходит в тесной ассоциации с вирогенной стромой цитоплазмы.

Антигенные свойства. Антигенного родства между родами не обнаружено. Некоторые изоляты, выделенные от рыб, имеют серологическое родство с ранавирусом, выделенным от лягушек (FV-3). Специфические антитела часто не обладают нейтрализующей активностью.

Биологические особенности. Иридовирусы выделены только от пойкилотермных животных, обитающих в воде или влажных местах. Виды иридовирусов широко варьируют по спектру естественных хозяев и вирулентности. Все вирусы чувствительны к высушиванию и воздействию повышенных температур. Механизмы передачи слабо изучены, данных о векторной передаче нет.

Род: *Iridovirus*

Типовой вид: *Invertebrate iridescent virus 6* (IIV-6).

Выделены от многих видов членистоногих, обитающих в воде или сырых мес-

тах. В настоящее время официально зарегистрировано 2 официальных и 11 предполагаемых видов от беспозвоночных.

Род: *Cloriridovirus*

Типовой вид: *Invertebrate iridescent virus 3* (IIV-3).

Выделены от более чем 20 видов хозяев (в основном москитов), встречаются повсеместно. В настоящее время официально зарегистрирован 1 вид.

Род: *Ranavirus*

Типовой вид: *Frog virus 3* (FV-3).

Характерные особенности. Инфекция может быть вызвана при оральном или интраперитопеальном введении вируса. Патогенность зависит от вида хозяина и жизненного цикла. Вирус FV-3 накапливается во многих культурах клеток. Вирус *Epizootic haematopoietic necrosis virus* (EHNV) вызывает эпизоотии гемопоэтического некроза у 13 видов морских и пресноводных рыб. ДНК EHNV сильно метилирована по сайту CpG. Bohle virus обладает высокой вирулентностью по отношению к земноводным *Lymnodynastes ornatus* в Австралии, вызывая некрозы печени, ночек и легких, может передаваться рыбам. *Bohle virus* отличается от EHNV по размеру частиц, протеинам, антигенным и геномным характеристикам. Ряд предполагаемых видов данного рода вызывают гипертрофию клеток печени, васкулярного эпителия. Не нужно путать EHNV с *Erythrocytic necrosis virus* рыб и рептилий, который, вероятно, так же является иридовирусом, но который еще не был выделен и охарактеризован. В настоящее время официально зарегистрировано 1 основной и 5 предполагаемых видов.

Род: *Lymphocystivirus*

Типовой вид: *Lymphocystivirus disease virus 1* (LCDV-1).

Характерные особенности. LCDV-1 инфицирует камбалу, а предполагаемый вид LCDV-2 инфицирует лиманд. Инфекция сопровождается образованием общих хронических несильных повреждений в виде гипертрофии клеток кожи и плавников. Продолжительность роста инфицированных клеток очень различается (от 5 суток до 9 месяцев, в зависимости от температуры), и заканчивается их быстрой дегенерацией и высвобождением вирусных частиц. Распространение вируса происходит кон-

тактно, через внешние покровы и, особенно, жабры. Инцидентность болезни возрастает при наличии определенных эктопаразитов рыб. Как LCDV-1, так и LCDV-2 трудно культивируемы *in vitro,* хотя ограниченное накопление с образованием бляшек наблюдалось при использовании некоторых линий клеток рыб. В популяциях рыб были обнаружены и некоторые другие предположительно относящиеся к данной группе, но пока мало изученные, иридовирусы, часто являвшиеся причиной их заболевания и гибели. В настоящее время официально зарегистрировано 1 основной и 1 предполагаемый вид.

Неклассифицированный вирусы семейства (1 вид) *Goldfish virus 1* (GFV-1).

Сходство с другими таксонами. Некоторые представители семейства *Iridoviridae* имеют сходный аминокислотный сиквенс с представителями семейств *Asfaviridae* и *Phycodnaviridae,* Однако их генетическая организация отличается от таковой, характерной для иридовирусов.

14.1.4 Семейство: *Herpesviridae*

Подсемейство: *Alphaherpesvirinae,*

Род: *Simplexvirus, Varicellovirus,* «Marek's disease-like viruses», «Infectious laryngotracheitis-like viruses»

Подсемейство: *Betaherpesvirinae*

Род: *Cytomegalovirus Muromegalovirus Roseolovirus*

Подсемейство: *Gammaherpesvirinae*

Род: *Lymphocryptovirus, Rhadinovirus,* «Ictalurid herpes-like viruses»

Характеристика вириона. Вирион содержит симметрические и несимметрические компоненты. Сферический вирион включает ядро (кор), капсид, тегумент и оболочку. Кор включает геном вируса, упакованный в капсид. Матриксный капсид представляет собой икосаэдрон (T = 16), размер от 100 нм до 110 нм в диаметре, состоит из 162 капсомеров, из которых 150 – гексамеры, а 12 – пентамеры.

HHV-1 имеет протеиновую оболочку толщиной 16 нм и внешним диаметром 125 нм. Сборка капсида начинается вокруг вспомогательного протеина, с образова-

нием прокапсида, субъединицы которого имеют слабые связи между собой. Протеолитическое разрезание вспомогательного белка приводит к реорганизации белковой оболочки в характерную капсидную форму. Структура тегумента слабо изучена и не имеет симметрии. Он включает многие протеины, из которых не вес требуются для формирования вириона. Некоторые из его отдельных протеинов могут значительно различаться по количеству. Тегумент с поверхностной оболочкой, не содержащий капсид, может покидать клетку вместе с полноценными вирионами. Оболочка представляет собой липидный бислой, связанный своей внутренней поверхностью с внешней поверхностью тегумента. Она содержит несколько различных вирусных гликопротеинов (не менее 10 у HHV-1).

Вирион чувствителен к высушиванию, жирорастворителям, низким значениям pH, детергентам.

Геном. ДНК двуспиральная, линейная; размер от 125 kbp до 240 kbp. G + C состав от 32 % до 75 %. ДНК составляет 10 % от массы вириона

Другие компоненты вириона. HHV-1 имеет более 30 полипептидов. Зрелый капсид состоит из 6 протеинов, тогда как тегумент включает не менее 15. Оболочка вириона содержит не менее 10 (в некоторых случаях много больше) интегрированных мембранных протеинов, играющих роль в адсорбции и проникновении в клетку. Внешняя липопротеидная оболочка чаще имеет происхождение от мембран аппарата Гольджи. Многие оболочечные протеины содержат N- или O-связанные гликаны.

Организация генома и репликация. Количество открытых рамок считывания (ORFs) у герпесвирусов варьирует от 70 до более 200. У герпесвирусов млекопитающих и птиц около 40 консервативных генов, организованных в 7 блоков. Блоки генов у представителей разных подсемейств могут иметь различное расположение и ориентацию, но внутри блоков гены располагаются в определенном порядке с определенной полярностью. Герпесвирусы рыб и амфибий отнесены в данное семейство только по морфологии, так как не имеют сиквенсов, родственных герпесвирусами млекопитающих и птиц.

Стратегия репликации хорошо описана пока только для HHV-1. В адсорбции и

проникновении задействованы оболочечные протеины вириона и рецепторы клеточной мембраны. Проникновение в клетку происходит путем слияния мембран оболочки вируса и мембраны клетки. Нуклеокапсид транспортируется в ядро, а тегумент, предположительно, изменяет метаболизм клетки (протеин UL41 ингибирует синтез клеточных протеинов, а протеин UL48 проникает в ядро и активирует ранние вирусные гены). После проникновения генома вируса в ядро клетки начинается транскрипционный каскад. Ранние гены (альфа) регулируют последующую экспрессию генов транскрипционными и пост-транскрипционными механизмами. Ранние гены (бета) кодируют ДНК-репликационный комплекс и различные протеины, изменяющие клеточный метаболизм. Структурные протеины вируса кодируются ранними генами (гамма). Транскрипция направляется РНК полимеразой II клетки.

Синтез вирусной ДНК начинается с одного или более участков начала репликации. Вновь синтезированная ДНК упаковывается внутри ядра из конкатамера в незрелый капсид, содержащий кор из вспомогательных протеинов, которые разрушаются при протеолитическом воздействии во время созревания. Нуклеокапсид отпочковывается через внутреннюю ядерную мембрану в перинуклеарное пространство, а образующийся таким образом оболочечный вирион транспортируется к клеточной поверхности (рисунок 51).

Антигенные свойства. Герпесвирусная инфекция сопровождается образованием антител на многие структурные и неструктурные протеины вируса. Многие оболочечные протеины обладают иммуногенностью и являются мишенями для вируснейтрализующих антител. Перекрестная нейтрализация наблюдается только между близкородственными вирусами внутри рода.

Биологические особенности. Отмечен широкий спектр естественных хозяев. Вероятно, практически все позвоночные могут быть носителями множества видов герпесвирусов. Герпесвирусы выделены и от моллюсков.

Как правило, для конкретных видов вирусов наблюдается определенный спектр восприимчивых хозяев, но может быть и передача вирусов от одного вида хозяина другому.

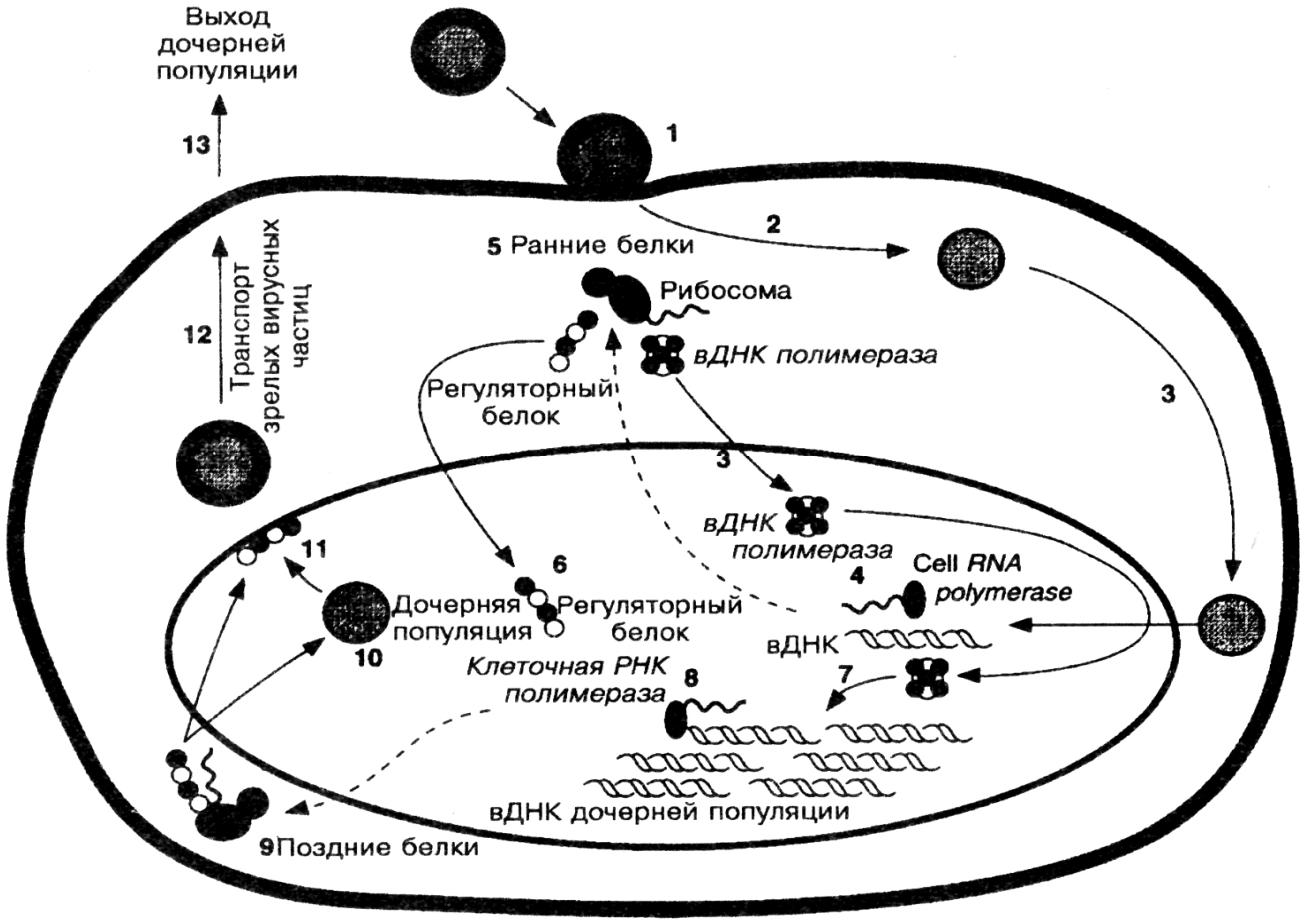


Рисунок 51 – Репликативный цикл ДНК-содержащих вирусов на примере репродукции вируса герпеса

После адсорбции (1) вирус проникает в клетку путём слияния с мембраной (2), нуклеокапсид транспортируется к ядерной оболочке (3), и вирусная ДНК (вДНК) попадает в ядро, где начинается её транскрипция (4). В результате трансляции «ранней порции» вирусного генома синтезируются ранние белки (5),. включая регуляторные протеины, вирусные полимеразы и матричные белки. Вирусная полимераза проникает в геном клетки (6), где запускает синтез молекул ДНК дочерних популяций (7). Часть вирусной ДНК транскрибируется клеточной РНК-полимеразой (8), что индуцирует синтез поздних белков (9), необходимых для сборки дочерних популяций (10); последние покидают ядро, отпочковываясь от его мембраны (11) и включая её фрагменты в состав своей оболочки. Зрелые вирионы транспортируются через цитоплазму и покидают клетку через комплекс Голъджи либо посредством рециклизации.

Экспериментально показано, что некоторые представители подсемейства *Alphaherpesvirinae* могут инфицировать широкий спектр видов животных, тогда как представители подсемейств *Beiaherpesvirlnae* и *Gammaherpesvirinae* проявляют очень ограниченную специфичность в отношении хозяев. Такая же закономерность отмечена и при изучении спектра восприимчивых культур клеток.

В естественных условиях передача вирусов может происходить аэрозольно (HHV-3), контактно (алиментарно, HHV-4) или половым путем (HHV-2). Векторной передачи не отмечалось.

В связи с хорошей адаптацией герпесвирусов к естественным хозяевам, тяжело протекающие инфекции встречаются, в основном, у молодых или иммуносупрессированных организмов, плодов (внутриутробное поражение) и при инфицировании других хозяев. Большинство герпесвирусов вызывают системные инфекции, сопровождающиеся на начальном этапе клеточно-ассоциированной виремией. Однако инфекции, обусловленные некоторыми членами рода *Simplexvirus* ограничиваются эпителиальными тканями и афферентными нервными волокнами по месту инокуляции. Отличительным признаком герпесвирусов, определяющим их сохранение, является их способность к длительной латенции. По немногочисленным данным представители подсемейства *Alphaherpesvirinae* латентно сохраняются в нейронах, подсемейства *Betaherpesvirinae* – в клетках моноцитарного ряда, а подсемейства *Gammaherpesvirinae* – в клетках лимфоцитарного ряда.

Критерии подразделения на виды внутри семейства. Родственные герпесвирусы относят к определенному виду по следующим признакам:

1) нуклеотидный сиквенс можно легко отличить от других данного рода;

2) занимают другие экологические ниши, имеют определенные эпидемиологические характеристики, определенных естественных хозяев и характеризуются соответствующим патогенезом.

14.1.4.1 Подсемейство: *Alphaherpesvirinae*

Нуклеотидный и аминокислотный сиквенсы отличаются от таковых других представителей семейства. Характерными для данного подсемейства являются участок генома, включающий уникальную короткую последовательность (Us), и фланкирующие инвертированные повторы (IRs и TRs), содержащие гены, гомологичные HHV-1. Вирусы продуктивно инфицируют фибробластоподобные клетки в культуре и эпителиальные клетки *in vivo*. Многие представители вызывают у естественных хозяев везикулярные поражения эпителия.

Род: *Simplexvirus*

Типовой вид: *Human herpesvirus I* (HHV-1) (герпесвирус человека 1).

Нуклеотидный и аминокислотный сиквенсы отличаются от таковых Других представителей подсемейства. Вирусы имеют широкий спектр чувствительных культур клеток, репродуктивный цикл в которых сопровождается быстрым цитолизом. Латентная инфекция наблюдается в нейронах. Многие члены рода инфицируют человека или приматов. Могут проявлять перекрестную реактивность в серологических реакциях с вирусами других родов подсемейства. В настоящее время официально зарегистрировано 2 вида.

Род: *Varicelloviruses*

Типовой вид: *Human herpesvirus 3* (HHV-3) (герпесвирус человека 3).

Нуклеотидный и аминокислотный сиквенсы отличаются от таковых других представителей подсемейства, Представители рода обнаружены у широкого спектра млекопитающих. Латентная инфекция наблюдается в сенсорной нервной системе, реже в других местах. Некоторые представители могут проявлять перекрестную реактивность в серологических реакциях с вирусами данного рода. В настоящее время официально зарегистрировано 16 основных и 2 предполагаемых вида *Equid herpesvirus 3* (EHV-3) (Equine coital exantema virus) и *Equid herpesvirus 6* (EHV-6) (Asinine herpesvirus 3).

Род: «Marek's disease-like viruses»

Типовой вид: *Gallid herpesvirus 2* (GaHV-2) (герпесвирус куриных 2).

Нуклеотидный и аминокислотный сиквенсы отличаются от таковых других представителей подсемейства. Вирусы данного рода были выделены только от птиц. Вызывают образование опухолей. Продукция инфекционных внеклеточных вирусных частиц ограничена эпителием перьевых фолликулов. Все представители проявляют перекрестную реактивность в серологических реакциях с вирусами данного рода. В настоящее время официально зарегистрировано 3 вида.

Род: «Infectious laryngotracheitis-like viruses»

Типовой вид: *Gallid herpesvirus 1* (GaHV-1) (герпесвирус куриных 1).

Аминокислотный сиквенс единственного представителя данного рода показал его особое положение внутри подсемейства. В настоящее время официально зарегистрирован 1 вид.

Неклассифицированные вирусы подсемейства (3 вида).

14.1.4.2 Подсемейство: *Betaherpesvirinae*

Нуклеотидный и аминокислотный сиквенсы представителей родов имеют различия. Гены, соответствующие гену US22 HHV-5, являются характерными для членов подсемейства. Вирусы имеют строгую специфичность виду-хозяину и типу культур клеток. Цикл репродукции медленный, вирус, как правило, клеточно-ассоциированный. У иммунокомпетентных хозяев инфекция обычно протекает инаппарантно. Латентная инфекция чаще связана с клетками моноцитарного ряда.

Род: *Cytomegalovirus*

Типовой вид: *Human herpesvirus 5* (HHV-5) (герпесвирус человека 5).

Нуклеотидный и аминокислотный сиквенсы отличаются от таковых других представителей подсемейства. Геном цитомегаловирусов превышает 200 kbp. Инфицированные клетки увеличиваются (цитомегалия). В настоящее время официально зарегистрировано 3 основных и 2 предполагаемых вида.

Род: *Muromegalovirus*

Типовой вид: *Murid herpesvirus I* (MuHV-1) (герпесвирус мышиных 1).

Нуклеотидный и аминокислотный сиквенсы отличаются от таковых других

представителей подсемейства. Размер генома муромегаловирусов превышает 200 kbp. Инфицированные клетки увеличиваются (цитомегалия). В настоящее время официально зарегистрировано 2 вида.

Род: *Roseolovirus*

Типовой вид: *Human herpesvirus 6* (HHV-6) (герпесвирус человека 6).

Нуклеотидный и аминокислотный сиквенсы отличаются от таковых других представителей подсемейства. Геном розеоловирусов меньше, чем у других представителей подсемейства (менее 200 kbp). Вызывают продуктивную инфекцию Т-лимфоцитов. Выражено серологическое родство. В настоящее время официально зарегистрировано 2 вида.

14.1.4.3 Подсемейство: *Gammaherpesvirinae*

Нуклеотидный и аминокислотный сиквенсы генов BNRF-1, BTRF-1 и BRLF-1 HHV-5 (соответствующие ORFs вируса *Saimiriine herpesvirus 2* – ORFs 3, 23 и 50) отличают представителей данного таксона других представителей семейства. Многие члены подсемейства способны инфицировать *in vitro* лимфоциты, и образовывать латентно инфицированные культуры с небольшим числом клеток, инфицированных продуктивно. Латентная инфекция *in vivo* наблюдается в лимфоцитах и тканях лимфоидных органов. Острые инфекции часто ассоциируются с лимфопролиферативными нарушениями. Многие представители подсемейства ассоциируются с опухолями лимфоидного и нелимфоидного происхождения.

Род: *Lymphocryptovims*

Типовой вид: *Human herpesvirus 4* (HHV-4) (герпесвирус человека 4).

Нуклеотидный и аминокислотный сиквенсы отличаются от таковых других представителей подсемейства. Характерными для данного рода является ген EBNA вируса HHV-4 и его гомологи других вирусов. Вирусы инфицируют В-лимфоциты в культуре, но, как правило, непродуктивно, приводя к иммортализации. В-клетки или их предшественники являются местом латенции вируса *in vivo.* Члены данного рода обнаружены только у людей и нечеловекообразных приматов. Выражено серологи-

ческое родство. В настоящее время официально зарегистрировано 7 видов.

Род: *Rhadinovirus*

Типовой вид: *Saimiriine herpesvirus 2* (SaHV-2).

Нуклеотидный и аминокислотный сиквенсы отличаются от таковых других представителей подсемейства. Многие виды продуктивно инфицируют *in vitro* фибробласты, часто многих видов. Выделены от многих видов млекопитающих. Латентная инфекция наблюдается в Т- или В-лимфоцитах. В настоящее время официально зарегистрировано 12 основных и 4 предполагаемых видов.

Неклассифицированный род семейства: «Ictalurid herpes-like viruses»

Типовой вид: *Ictalurid herpesvirus 1* (Channel catfish virus), (IcHV-1), [M75136].

Нуклеотидный и аминокислотный сиквенсы единственного члена данного рода отдаленно напоминают таковые других герпесвирусов, и поэтому, он был выделен а отдельную группу.

Неклассифицированные вирусы семейства (52 вида).

Филогенетическое родство внутри семейства. Семейство *Herpesviridae* составляют представители, отличающиеся широким разнообразием, но которые, в то же время, имеют сходную морфологию. Данные анализов, основанных на серологических исследованиях или гибридизации нуклеиновых кислот, редко имеют решающее значение при определении родства между вирусами. Возрастающее значение данных по сиквенсам способствовало широкому использованию сравнительного анализа сиквенсов с целью распределения герпесвирусов по таксонам и молекулярно-филогенетического анализа семейства. Понятие отдельной генетической группы определялось по двум критериям:

1) сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей консервативных генов герпесвирусов;

2) идентификация отдельных уникальных генов.

Тем не менее, некоторые вирусы были отнесены к определенным таксонам на основе серологического родства.

14.1.5 Семейство: *Adenoviridae.*

Род: *Mastadenovirus, Aviadenovirus*

Характеристика вириона. Вирион безоболочечный, икосаэдральной симметрии, диаметром от 70 нм до 90 нм. 240 капсомеров-гексонов диаметром от 8 нм до 10 нм и 12 капсомеров-пентонов с 1-2 фиберами, длиной от 9 нм до 77,5 нм, проходящими через поверхность вириона. Гексоны формируются при взаимодействии трех идентичных полипептидов (называемых II) и состоят из двух частей: треугольной вершины и псевдогексагонального основания с центральной полостью. Примыкающие друг к другу основания гексонов образуют белковую оболочку (белковый чехол) вириона. Расположение гексонов (II), оснований пентонов (III), фиберов (IV) и протеина (IX) (который отсутствует у авиаденовирусов и всех неклассифицированных вирусов) хорошо изучено. 12 копий полипептида IX находится между 9 гексонами в центре каждой грани. Позиции протеинов III, VI и VIII точно не определены. Два мономера белка III проходят через капсид, по ребрам граней. 12 оснований пентонов формируются взаимодействием 5-и полипептидов (III) и тесно связаны с 1-2 фиберами, каждый из которых состоит из трех полипептидов (IV), формирующих стержень с дистальным утолщением. 12 пентонов (III и IV) менее плотно связаны с прилегающими гексонами. Полипептид VIII определяет внутреннюю поверхность гексонного капсида. Другие полипептиды (Ша, тримеры IX и мультимеры VI) находятся в контакте с гексонами, формируя непрерывный протеиновый чехол (оболочку).

Полипептиды VI и VIII участвуют в ассоциации капсида и вирусного кора. Кор включает геномную ДНК в комплексе с четырьмя полипептидами (V, VII, X и терминальным).

Mr (вириона) от 150×10^6 до 180×10^6, плавучая плотность в CsCl от 1,30 г/см^3 до 1,37 г/см^3.

Вирусы стабильны в замороженном состоянии. в средах с невысокой кислотностью. Чувствительны к жирорастворителям. Инактивация вируса происходит при 56 °С в течение не менее 10 минут.

Геном. ДНК: 1 молекула, линейная, двуспиральная; размер от 26 kbp до 45 kbp. Вирусный терминальный протеин ковалентно связан с 5'-областями обоих цепей. Состав G + C от 34 % до 60 %. У всех анализированных вирусов найден инвертированный концевой повтор (ITR) длиной от 43 kbp до 369 kbp.

Другие компоненты вириона. Продуктами генома являются около 40 полипептидов, проходящие через сложный механизм сплайсинга. Ранние продукты трансляции модулируют транскрипционные механизмы клетки (E1 и E4), составляют ДНК-репликативный комплекс (E2) и обеспечивают нарушение защитных механизмов хозяина (E3). Более поздние продукты генов (L1-L5) участвуют в сборке и созревании вириона. Липиды не обнаружены. Фиберные и некоторые неструктурные протеины гликозилированы.

Организация генома и репликация. Проникновение вируса в клетку происходит через взаимодействие фиберных утолщений с различными рецепторами восприимчивых клеток с последующей интернализацией путем взаимодействия основания пентона и клеточных интегринов. После раздевания вирусный кор доставляется в ядро, где происходит транскрипция мРНК, репликация вирусной ДНК и сборка. Вирусная инфекция приводит к прекращению синтеза клеточной ДНК, а позднее РНК и белков. В транскрипцию, посредством клеточной РНК полимеразы II, вовлечены обе цепи ДНК с использванием пяти ранних (E1A, E1B, E2, E3 и E4), двух средних и одного позднего мажерного (L) промоторов. Все первичные транскрипты кэпированы и полиаденилированы. Сложный процесс сплайсинга предшествует появлению разновидностей мРНК. У аденовирусов приматов и мартышек обычно 1-2 гена VA РНК, которые транскрибируются клеточной РНК полимеразой III, и кодируют РНК-продукты, облегчающие трансляцию поздних мРНК. Такие VA РНК гены не обнаруживаются у большинства аденовирусов животных. У некоторых аденовирусов птиц описано наличие одного негомологичного VA РНК гена, локализованного по различным позициям генома.

Наряду со структурными синтезируется много неструктурных протеинов. Многие полипептиды модифицируются фосфорилированием или гликозилированием. Для созревания вириона необходим протеолизис некоторых структурных поли-

пептидов вирусными протеазами. Репликация ДНК со смещением цепи происходит посредством праймирующего протеинового механизма (терминальный протеин), вирусной ДНК полимеразы, ДНК-связывающего протеина и клеточных факторов. Иногда вирионы или вирусные протеины формируют в ядре паракристаллические структуры. Высвобождение вируса происходит при разрушении клетки-хозяина.

Антигенные свойства. Подразделение аденовирусов на серотипы основано па результатах реакции нейтрализации. Серотипом считается группа вирусов, не дающая перекрестных реакций с другими или имеющая значение соотношения титров гомологичный/гетерологичный более, чем 16 (в обоих направлениях). Для значений соотношения титров гомологичный/гетерологичный от 8 до 16, идентификация серотипа проходит, если вирусные гемагглютинины неродственны (нет перекреста в реакции подавления гемагглютинации) или, если существуют значимые биофизические или биохимические различия. Поверхностные антигены, в основном, типоспецифические. Гексоны участвуют в нейтрализации, фиберы – в нейтрализации и ингибиции гемагглютинации. Растворимые антигены ассоциируются с инфекционным процессом, когда накапливается избыток неассемблированных капсидных протеинов. Анализ с использованием моноклональных антител показал наличие у гексонов и растворимых антигенов эпитопов, имеющих родовую, типовую и групповую специфичность. Родоспецифические антигенные детерминанты гексонов локализованы на их базальной поверхности, тогда как серотипспецифические – в области их вершин.

Биологические особенности. Естественные хозяева вирусов представлены, в основном, одним или несколькими близкородственными видами животных, что так же характерно и в отношении культур клеток. Некоторые аденовирусы человека вызывают, но с низкой эффективностью, продуктивную инфекцию в клетках грызунов. Ряд вирусов вызывает образование опухолей у гетерологичных хозяев в неонатальный период. Субклиническая инфекция часто встречается в разных системах вирус-хозяин. Распространение вирусов происходит контактно. Аденовирусные инфекции человека обычно протекают бессимптомно, но иногда сопровождаются поражением дыхательной и пищеварительной систем, а также, зрительного аппарата. Аденови-

русы человека 1-3 и 5-7 типов вызывают респираторные инфекции у детей. В основном в каждом серотипе доминируют вирусы, поражающие желудочно-кишечный тракт. Аденовирус человека 41 и 42 типов являются вторыми основными агентами, после ротавирусов, вызывающими острую форму гастроэнтеритов у детей младшего возраста. Аденовирус человека 11 типа ассоциируется с геморрагическим циститом. Аденовирусы собак вызывают развитие гепатитов и респираторных расстройств и обусловливают эпизоотии у лис, медведей, волков, койотов и скунсов. Аденовирусы птиц ассоциируются с такими болезнями как синдром снижения яйценоскости, болезнь «мраморной селезенки», а также с разнообразной патологией, характеризующейся признаками геморрагического энтерита, поражением дыхательных путей и легких, отеками. В культуре восприимчивых клеток аденовирусы вызывают их округление, агрегацию и лизис хроматина, что приводит к характерным базофильным или эозинофильным ядерным включениям.

Род: *Mastadenovirus*

Типовой вид: *Human adenovirus C* (HAdV-C) (аденовирус человека С).

Мастаденовирусы отличаются от других членов семейства по организации генома, серологическим характеристикам. Инфицируют только млекопитающих

Критерии подразделения на виды внутри рода. Серологически различающиеся серотипы (синоним типов, обозначаемых арабскими цифрами) были сгруппированы в виды. Название вида соответствует виду хозяина, а буквенное дополнение используется, если у данного хозяина обнаруживаются несколько видов вирусов.

Распознавание вида зависит, как минимум, от двух следующих характеристик:

- расчет филогенетической дистанции (основана, в первую очередь, на сравнительном дистанционном матриксном анализе аминокислотных сиквенсов протеазы, pVIII, гексонов и ДНК полимеразы);
- ДНК-гибридизация;
- рестрикционный анализ;
- процент G + C в геноме, онкогенность для грызунов;
- ростовые характеристики, спектр восприимчивых хозяев, перекрестная

нейтрализация;

- способность к рекомбинации;
- количество генов VA РНК;
- гемагглютинация;
- генетическая организация региона E3.

Отсутствие перекрестной нейтрализации в сочетании с филогенетической дистанцией, превышающей 10 %, дают основание для разделения двух серотипов в разные виды. Если филогенетическая дистанция меньше 5 %, то все другие упомянутые выше критерии могут быть использованы для классифицирования данного серотипа как отдельного серотипа внутри рода, если даже он был выделен от другого вида хозяина. В настоящее время официально зарегистрировано 19 основных и 5 предполагаемых видов.

Род: ***Aviadenovirus***

Типовой вид: *Fowl adenovirus* A (FadV-A) (аденовирус кур A).

Авиаденовирусы отличаются серологически от мастаденовирусов. Отмечены отличия и в организации генома: отсутствуют гены, кодирующие протеины V и IX, гомологичные участкам ранних генов E1 и E2, тогда как ген E4 смещен.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Серологически различающиеся типы аденовирусов птиц могут быть классифицированы по тести отдельным видам, названия которых соответствуют виду хозяина, а буквенное дополнение используется, если у данного хозяина обнаруживаются несколько видов вирусов. Распознавание вида зависит, как минимум, от двух следующих характеристик:

- расчет филогенетической дистанции (основана, в первую очередь, на сравнительном дистанционном матриксном анализе аминокислотных сиквенсов протеазы, pVIII, гексонов и ДНК полимеразы);
- рестрикционный анализ;
- спектр восприимчивых хозяев;
- патогенность;
- перекрестная нейтрализация;

- способность к рекомбинации.

Например, серотипы аденовирусов кур могут быть сгруппированы в пять видов на основе рестрикционного анализа и результатам перекрестной нейтрализации. В настоящее время официально зарегистрировано 6 основных и 3 предполагаемых вида.

Неклассифицированные вирусы семейства (7 видов).

Филогенетическое родство внутри семейства. Филогенетический анализ на основе матриксной дистанции или parsimony analysis белков или ДНК подходящих генов подтверждают, что среди аденовирусов существуют не менее трех отдельных генетических групп (lineage – линий): мастаденовирусы, авиаденовирусы и, предположительно, атаденовирусы. Эволюционные дистанции между вирусами соответствуют различиям по виду хозяина. Однако есть исключения, когда один вид является хозяином вирусов, не имеющих близкого родства. Например, типы аденовирусов, выделенные от КРС были отнесены в разные подгруппы кластера вирусов (BAdV-10 по сравнению с BAdV-1 или BAdV-3) или в совершенно отдельные кластеры (BAdV-4, б и 7).

Сходство с другими таксонами. Фиберы HAdV-2 и HAdV-5 взаимодействуют для прикрепления с тем же клеточным рецептором (CAR), что и вирусы коксаки B. Аденовирусы могут встречаться вместе с зависимыми парвовирусами, для которых они могут обеспечивать функции помощника.

14.1.6 Семейство: *Polyomaviridae*

Род: *Polyomavirus*

Типовой вид: *Simian virus 40* (SV-40).

Характеристика вириона. Вирион безоболочечный; диаметр 40 нм. Икосаэдральный капсид состоит из 72 капсомеров (T = 7). Филаментозные и тубулярные формы являются результатом неправильной сборки. Вирион устойчив к воздействию эфира, кислых сред, и тепловой обработке (50 °C – 1 час, но в присутствии MgCh нестабилен),

Mr (вирион) 25×10^3, плавучая плотность в CsCl от 1,34 г/см^3 до 1,35 г/см^3, в сахарозе 1,20 г/см^3.

Геном. ДНК: 1 молекула, циркулярная, двуспиральная; размер 5 kbp; составляет от 10 % до 13 % от массы вириона; G + C состав от 40 % до 50 %.

В зрелом вирионе ДНК образует хроматиноподобный комплекс с гистоновыми протеинами клеточного происхождения H2a, H2b, H3 и H4.

Другие компоненты вириона. Геном вируса кодирует 8 протеинов с Mr, варьирующей от 3×10^3 до 88×10^3. Три структурных протеина VP1 (мажерный), VP2 и VP3 формируют капсид вириона. Четвертый протеин (агнопротеин, LP1) участвует в процессе сборки, но не является структурным компонентом зрелого вируса.

Липидов и углеводов не идентифицировано.

Организация генома и репликация. После взаимодействия с клеточными рецепторами вирион поглощается клеткой и транспортируется в ядро. Во время продуктивной инфекции различают раннюю и позднюю стадии транскрипции вирусного генома, каждая из которых контролируется отдельным промотором и происходит с разных цепей ДНК.

Предшественники мРНК проходят посттрансляционный процессинг (кэпирование и полиаденилирование 5'- и 3'-концов, соответственно, сплайсинг). Сплайсинг и перекрывающиеся ORFs обеспечивают эффективное использование информации. Продуктами ранних мРНК являются регуляторные протеины, проявляющие трансактиваторные свойства, и протеины, необходимые для репликации вирусной ДНК. Их экспрессия приводит к реактивации некоторых клеточных энзимов и стимуляции синтеза клеточной ДНК. Перед началом поздней стадии в ядре происходит репликация вирусной ДНК. Наиболее поздними продуктами трансляции являются структурные протеины, формирующие капсид вириона. Посттрансляционные модификации некоторых вирусных протеинов включают фосфорилирование, N-ацетилирование, ацилирование жирными кислотами, ADP-рибозилирование, метиламинирование, аденилирование, гликозилирование и сульфирование. Некоторые вирусные протеины содержат сиквенсы, называемые сигналами ядерной локализации (NLS), которые облегчают транспорт протеинов в ядро клетки, где происходит

сборка вириона. Вирионы высвобождаются путем лизиса инфицированных клеток.

Неструктурные протеины, обозначаемые «Т», ассоциируются с туморогенностью и трансформационной способностью и играют ключевую роль в регуляции транскрипции и репликации ДНК. Репликация вирусного генома инициируется специфическим связыванием Т-антигена в уникальном регионе репликации и взаимодействием с клеточной ДНК полимеразой. Репликация проходит в двух направлениях через пирамидальные структуры и терминируется при 180° от места репликации. На поздней стадии репликации обнаруживаются молекулы типа rolling circle-type. Вирусные протеины, вовлеченные в инициацию, могут также инициировать элонгацию за счет хеликазной и АТР-азной активности.

Антигенные свойства. Антитела, полученные на разрушенные вирионы перекрестно реагируют с антигенами всех членов рода. Представители данного рода могут быть идентифицированы серологически в реакции нейтрализации, ингибиции гемагглютинации и методом иммуноэлектронной микроскопии. С использованием поли- и моноклинальных антител была показана перекрестная реактивность между Т-протеинами полиомавирусов приматов.

Биологические особенности. Каждый вирус имеет четкую специфичность относительно вида животного-хозяина, хотя клетки в культуре, не поддерживающие репликацию вируса могут быть трансформированы под воздействием продуктов ранних генов.

Вирус распространяется через реактивацию персистентной инфекции матери во время беременности, с выделением вируса в небольших количествах с мочой, реже с трансплантацией тканей (среди людей). Возможна контактная и воздушно-капельная передача инфекции. Векторной передачи не отмечено. Полиомавирусы распространены повсеместно и, как правило, чаще вызывают персистентную инфекцию в ранний период жизни хозяина.

Полиомавирусы проявляют определенный тропизм к тканям. Инфицирование людей сопровождается поражением мочевыводящих путей, особенно у иммунодефицитных хозяев. Полиомавирус человека JCPyV приводит к разрушению олигодендроцитов в ЦНС, с последующим развитием фатальной демиелинизации. Это за-

болевание обозначается как прогрессивная многоочаговая энцефалопатия. Вирус SV-40 вызывает подобную болезнь у макак резус.

Большинство полиомавирусов имеют туморогенную потенцию для грызунов. Вирус JCPyV вызывает образование опухолей у естественных хозяев. Трансформация и онкогенность являются результатом экспрессии ранних вирусных протеинов и их взаимодействия с клеточными генами супрессоров опухолей (p53, pRB и др.). В трансформированных и опухолевых клетках геном полиомавирусов обычно интегрируется в ДНК клетки хозяина. В настоящее время официально зарегистрировано 12 видов.

14.1.7 Семейство: *Papillomaviridae*

Род: *Papillomavirus*

Типовой вид: *Cottontail rabbit papillomavirus* (CRPV) (папилломавирус американских кроликов).

Характеристика вириона. Вирион безоболочечный, диаметром 55 нм. Икосаэдральный капсид состоит из 72 капсомеров. Филаментозные и тубулярные формы являются результатом неправильной сборки. Вирион устойчив к воздействию эфира, кислой среды, и тепловой обработке (50 °C – 1 час).

Плавучая плотность в CsCl от 1,34 г/см^3 до 1,35 г/см^3.

Геном. ДНК: 1 молекула, циркулярная, двуспиральная; размер от 6800 kbp до 8400 kbp, от 10 % до 13 % от массы вириона; G + C состав от 40 % до 60 %.

В зрелом вирионе ДНК образует хроматиноподобный комплекс с гистоновыми протеинами клеточного происхождения H2a, H2b, H3 и H4.

Другие компоненты вириона. Геном вируса кодирует от 8 до 10 протеинов с Mr, варьирующей от 7×10^3 до 73×10^3. Протеины L1 и L2 формируют капсид вириона. Протеины E1 и E2 участвуют в репликации и интрагеномной регуляции (E2). Протеины E5, E6 и E7 индуцируют репликацию клеточной ДНК. Протеин E4 может быть позднее функциональным и связываться с цитоскелетной структурой. Липидов и углеводов не идентифицировано.

Организация генома и репликация. Предшественники мРНК проходят посттрансляционный процессинг (кэпирование и полиаденилирование 5'- и 3'-концов, соответственно, сплайсинг). Сплайсинг и перекрывающиеся ORFs обеспечивают эффективное использование информации. Продуктами ранних мРНК являются регуляторные протеины, проявляющие трансактиваторные свойства, и протеины, необходимые для репликации вирусной ДНК. Их экспрессия приводят к реактивации некоторых клеточных энзимов и стимуляции синтеза клеточной ДНК. Перед началом поздней стадии в ядре происходит репликация вирусной ДНК. Наиболее поздними продуктами трансляции являются структурные протеины, участвующие в сборке вириона. Посттрансляционные модификации некоторых вирусных протеинов включают фосфорилирование, N-ацетилирование, ADP-рибозилирование и другие процессы. Некоторые вирусные протеины содержат сиквенсы, называемые сигналами ядерной локализации (NLS), которые облегчают транспорт протеинов в ядро клетки, где происходит сборка вириона. Вирионы высвобождаются путем лизиса инфицированных клеток.

Геном большинства членов данного рода (которые были секвенированы) содержат от 9 до 10 ORFs, обозначаемых E1-E8 и L1-L2. У некоторых представителей рамок E3 и E8 нет. Протеины с рамок считывания типа E, возможно, за исключением E4, представляют неструктурные полипептиды, участвующие в транскрипции, репликации ДНК и трансформации, тогда как продуктами рамок L1 и L2 являются структурные белки. Репликация вирусного генома инициируется в двух направлениях со специфическим связыванием протеинов E1 и E2 с уникальными сайтами начала репликации.

Антигенные свойства. На данный момент информации по серологическим характеристикам папилломавирусов недостаточно. Протеин L1 несет типоспецифические домены, тогда как протеин L2 содержит группоспецифические эпитопы. Возможность использования папилломавирусоподобных частиц, являющихся результатом экспрессии протеина L1 или протеинов L1 и L2 в системе бакуловирусов. вируса вакцины и дрожжей, позволит глубже проанализировать антигенные характеристики.

Биологические особенности. Папилломавирусы имеют четкую специфичность по виду хозяина. Все изученные представители группы *Human Papillomavirus* (HPV) требуют окончательной дифференциации в отношении репликации и продукции вирионов. В основном, инфицирование происходит через микроповреждения пролиферативного базального слоя клеток. Вирусы группы HPV не культивируются в культурах клеток, за исключением малоэффективной репликации в культурах кератиноцитов человека или более эффективной в коже человека.

Распространение вируса происходит через поверхность бородавок и папилломных изменений, которые содержат большое количество вирусных частиц внутри их поверхностных дифференцированных слоев. Реактивация вируса часто происходит при иммуносупрессии.

Папилломавирусы распространены повсеместно. Передача вируса происходит при тесном контакте. Вызывают образование доброкачественных опухолей (бородавки, папилломы) у естественны хозяев (реже гетерологичных видов). Часто инфекция сопровождается появлением микроизменений, которые, зачастую, не различимы без помощи оптических приборов. Папилломы могут возникать на коже и слизистых, часто в определенных местах тела. Некоторые папилломы, вызываемые определенными вирусами, могут иметь тенденцию к злокачественному прогрессированию. Специфические виды рака человека (например, карцинома шейки матки, рак вульвы или пениса, специфическая карцинома сквамозного эпителия кожи) ассоциируются с определенными типами инфекций, вызванных вирусами группы HPV (HPV-16 и HPV-18, HPV-5 и HPV-8и др.). Часто, но не всегда, вирусная ДНК представлена в интегрированной форме, особенно при раке шейки матки, тогда как при кожной карциноме вирусный геном находится в эписомальном состоянии.

Ассоциированные с раком аногенитальные типы HPV эффективно иммортализуют широкий спектр клеток человека *in vitro.* Иммортализация происходит в результате кооперативной функции генов E6 и E7, хотя и каждый в отдельности обладает таким свойством, но менее эффективно. E6 связывается и разрушает клеточный протеин p53, тогда как E7 взаимодействует с клеточным протеином pRB и др. Взаимодействие вирусных онкопротеинов с клеточными циклинзависимыми киназными

ингибиторами (p16, p21**,** p27) так же является важным событием в процессе иммортализации.

В настоящее время официально зарегистировано 7 видов.

14.1.8 Семейство: *Circoviridae*

Род: *Circovirus*

Характеристика вириона. Вирион икосаэдральной симметрии, без оболочки. Диаметр вириона составляет от 19,1 нм до 26,5 нм *(Chicken anemia virus,* CAV), от 17,0 нм до 20,7 нм *(Porcine circovirus,* PCV), от 12,0 нм до 20,7 нм *(Beak and Jeather disease virus,* BFDV). Диаметр вируса примерно на 20 % больше при негативном контрастировании с использованием урацил ацетата, чем при использовании обычной обработки фосфорно-вольфрамовой кислотой. Капсид состоит из 32 полых субъединиц (T = 3). Плавучая плотность в CsCl от 1,33 г/см^3 до 1,37 г/см^3.

CAV и PCV устойчивы при pH 3 и инкубировании при 70 °C в течение 15 минут. CAV устойчив к обработке эфиром и хлороформом. Влияние pH, растворителей и детергентов на инфекционность BFDV не известно, из-за отсутствия систем культивирования *in vitro.*

Геном. ДНК: односпиральная, циркулярная.

Размер генома CAV и PCV составляет 2298 kbp и 1759 kbp, соответственно. Геном CAV имеет негативную полярность, данных по полярности ДНК других видов нет. Геном PCV содержит нонануклеотидный мотив (TAGTATTAC), который обнаружен на вершине потенциальной петлевидной структуры и идентичен или очень похож таковым, обнаруженным у вирусов бактерий и растений с циркулярным односпиральным ДНК геномом *(Microviridae, Nanovirus и Getniniviridae).*

Другие компоненты вириона. Вирионы CAV и PCV содержат один протеин Mr 50 × 10^3 и 36 × 10^3, соответственно. CAV имеет два неструктурных протеина Mr 24 × 10^3 (VP2) и Mr 13,6 × 10^3 (VP3), меньший из которых вызывает апоптоз *in vitro.* Неструктурные протеины PCV неохарактеризованы. N-концевая область капсидного протеина CAV имеет гомологию с гистоновыми протеинами и играет роль в ассемб-

лировании ДНК внутрь вириона. Протеин Mr 35,7 × 10^3, кодируемый самой большой ORF PCV, имеет аминокислотную гомологию с репликативно-ассоциированными протеинами вирусов растений с циркулярной односпиральной геномной ДНК.

Липидов и углеводов не обнаружено.

Организация генома и репликация. Репликация ДНК CAV и PCV происходит с использованием циркулярной двуспиральной репликативной формы (RF) ДНК. Нуклеиновые кислоты и вирусные протеины PCV, гомологичные вирусам растений семейства *Geminiviridae,* обеспечивают репликацию ДНК по принципу кругового цикла (rolling-circuie mechanism). Сайт начала репликации ДНК PCV картирован. Только одна цепь RF CAV транскрибируется с образованием полицистронной мРНК (2,1 kb), содержащей три частично перекрывающиеся ORFs, кодирующие протеины Mr 52 × 10^3 (VP1, CP), 24 × 10^3 (VP2) и 13,6 × 10^3 (VP3). Все три протеина были детектированы в тельцах внутри ядер клеток культуры, инфицированных вирусом. Частицы CAV не были обнаружены непосредственно в инфицированных клетках. Сиквенс RF PCV имеет шесть ORFs, более чем 200 нуклеотидов которых имеют ориентацию позитивной и негативной полярности. При цитогистологическом анализе перьевых включений у птиц с «болезнью клюва и перьев» в ядре перьевых эпителиоцитов и цитоплазме макрофагов, были обнаружены включения, образованные вирусными частицами.

Антигенные свойства. Для CAV, PCV и BFDV общих антигенов не найдено. Антигены BFDV обладают гемагглютинирующей активностью.

Биологические особенности. Вирусы имеют четкую специфичность в отношении вида животного-хозяина. Данных о путях передачи и существовании векторов передачи нет. Вирусы распространены повсеместно. CAV вызывает кратковременную анемию и иммуносупрессию у цыплят раннего возраста. BFDV вызывает хроническую, обычно фатальную, болезнь у попугаев. PCV-подобные вирусы ассоциированы с недавно описанным состоянием свиней, известным под названием «мультисистемного изнуряющего синдрома поросят послеподсосного периода». CAV и BFDV инфицируют клетки гематопоэтической системы.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Для подразделения на виды используется три основных критерия: 1) различия нуклеотидных и аминокислотных сиквенсов, 2) различия по спектру восприимчивых хозяев и 3) различия по антигенным свойствам. Вирусы трех видов данного рода инфицируют различных хозяев, не имеют перекрестного антигенного родства и не имеют сходства по нуклеотидному сиквенсу. Низкий уровень перекрестной гибридизации наблюдался между BFDV и цирковирусами голубей (последний определен как предполагаемый вид).

На данный момент все три вида были классифицированы как представители одного рода. Однако различия в размере вириона, размере и организации генома дают основания для отнесения видов в разные роды. В настоящее время официально зарегистрировано 3 основных и 1 предполагаемый вид *Pigeon circovirus* (PCV) (цирковирус голубей).

Сходство с другими таксонами. PCV имеет сходство с представителями семейств *Geminiviridae Microviridae,* которое проявляется в гомологии нуклеиновых кислот и белков, участвующих в репликации по принципу кругового цикла (rollmg-circule replication). Цирковирусы животных сходны с нановирусами растений, которые так же являются безоболочечными, с икосаэдральным капсидом (диаметром от 18 нм до 20 нм), содержат циркулярный геном, представленный односпиральной ДНК (размер от 0,85 kb до 1,3 kb). Данные вирусы растений прежде входили в состав цирковирусов, как неклассифицированные вирусы семейства, а на данный момент классифицированы как представители свободного рода *Nanovirus.*

14.1.9 Семейство: *Parvoviridae*

Подсемейство: *Parvovirinae*

Род: *Parvovirus, Erythrovirus, Dependovirus*

Подсемейство: *Densovirinae*

Род: *Densovirus, Iteravirus, Brevidensovirus*

Характеристика вириона. Вирион безоболочечный, икосаэдральной симметрии; диаметр от 18 нм до 26 нм. Частицы состоят из 60 копий капсидного протеина.

Основными являются протеины VP2 и VP3, хотя в состав вириона может входить 12 копий VP1.

Мг (вирион) от $5{,}5 \times 10^6$ до $6{,}2 \times 10^6$, плавучая плотность в CsCl от 1,39 г/см^3 до 1,42 г/см^3.

Инфекционные частицы с плавучей плотностью более 1,45 г/см^3 являются конформационными вариантами или предшественниками зрелых частиц. Зрелый вирион стабилен в присутствии жирорастворителей, при pH от 3 до 9, прогревании при 56 °C в течение 60 минут. Инактивируется при обработке формалином, гидроксиламином или окислителями.

Геном. ДНК: 1 молекула, линейная, односпиральная; размер от 4 kbp до 6 kbp; составляет 20 % массы вириона. Mr от $1{,}5 \times 10^6$ до $2{,}0 \times 10^6$, G + C состав от 41 % до 53 %.

Некоторые виды вирусов (например, *Mice minute viruses,* MMV) содержат преимущественно геном негативной полярности, тогда как другие могут иметь в своем составе геномную ДНК любой полярности в одинаковых *(Adenoassociated virus,* AAV) или в различных соотношениях *(Bovine parvovirus,* BPV). Процент частиц с ДНК позитивной полярности варьирует от 1 % до 50 % и может зависеть от клетки-хозяина, в которой происходит репродукция вируса (например, *LU11I virus.* LUIIIV).

Другие компоненты вириона.

В основном, вирусы содержат от 2 до 4-х видов вирусных протеинов (VP1-4). В зависимости от вида вируса Mr VP1 от 80×10^3 до 96×10^3, VP2 от 64×10^3 до 85×10^3, VP3 от 60×10^3 до 75×10^3, VP4 от 49×10^3 до 52×10^3. Вирусные протеины представляют собой различные формы одного генетического продукта.

Липидов и углеводов не обнаружено.

Организация генома и репликация. Парвовирусы обладают двумя мажерными генами: REP (или NS) ORF кодирует продукты с функциями, необходимыми для транскрипции и репликации ДНК, CP (или CAP, или S) ORF кодирует капсидные протеины. Оба гена представлены на одной и той же цепи ДНК (парвовирусы позвоночных и некоторые денсовирусы). В случае, касающегося рода *Densovirus,* дан-

ные гены представлены на комплементарных цепях. У некоторых вирусов были выявлены другие минорные ORFs, для некоторых из которых были идентифицированы белковые продукты. REP ORF MMV продуцирует два мажерных неструктурных протеина: NS1 и NS2.

Для некоторых вирусов описан синтез разных продуктов REP ORF за счет альтернативного сплайсинга. Продуктами CP ORF MMV являются три протеина. MMV VP3 включает интактный капсид при протеолитическом разрезании VP2. VP1 и VP2 идентичны, за исключением их аминных концов. Синтез VP1 происходит со спланированной мРНК, которая несет небольшую ORF с основным аминокислотным мотивом для 5'-конца VP2. Парвовирусы используют альтернативного сплайсингового донора, тогда как депендовирусы используют альтернативные сплайсинговые акцепторы. За счет особого расположения в структуре капсида протеин VP1 может облегчать связывание ДНК. Мутанты по RHP или CP могут быть комплементарны. Палиндромные последовательности по обоим концам необходимы для обеспечения репликации ДНК.

Процессы адсорбция и раздевания вириона изучены слабо. Репликация вируса происходит в ядре клетки, находящейся в S-фазе, что говорит о тесной связи с процессами репликации клетки-хозяина и вируса, вероятно с использованием клеточных полимераз. Считается, что перед синтезом мРНК вирусный геном переходит в двуспиральную структуру. Синтез ДНК начинается с запуска механизма автопраймирования при наличии палиндромных последовательностей. Репликативная форма представляет собой линейную дуплексную молекулу, ковалентно связанную с одного конца со шпилечным праймером. Ковалентная связь разрушается протеинами REP, после чего шпилька трансформируется в дочернюю цепь. Образующийся разрыв по 3'-концу материнской цепи репарируется с использованием трансферной последовательности в качестве матрицы. Зрелый односпиральный геномный эквивалент ДНК удаляется из репликативного комплекса но механизму, вероятно, зависимому от доступности некоторых видов протеина NS и сборки пустого капсида.

В зависимости от вида, вирусы могут иметь более благоприятные условия при коинфекциях с другими вирусами, такими как аденовирусами или герпесвирусами,

или при химических или других воздействиях на хозяина. Вирусные протеины аккумулируются в ядре в форме пустых капсидов. Зрелые инфекционные вирионы так же накапливаются в ядре.

Антигенные свойства. Многие вирусы в пределах рода могут быть родственными по эпитопам NS-протеина.

Биологические особенности. Для репродукции автономных парвовирусов необходимо, чтобы клетки хозяина находились в S-фазе. Определенные парвовирусы эффективно реплицируются в присутствии вирусов-помощников (например, аденовирусов, герпесвирусов), при этом вирусы-помощники предоставляют продукты ранних генов и трансактивируют репликацию парвовирусов. Функция помощников определяется предоставлением продуктов ранних генов и трансактивацией репликации парвовирусов.

Связь парвовирусов с опухолевыми клеточными линиями больше определяется увеличением репликации ДНК и/или состоянием дифференциации таких клеток, чем непосредственным вовлечением в качестве этиологического агента онкогенеза. Коинфекция с вовлечением определенных парвовирусов и отдельных онкогенных аденовирусов (или других вирусов) может снизить онкогенный эффект этих вирусов, возможно за счет гибели клеток.

В определенных условиях парвовирусная ДНК может интегрироваться в геном хозяина, из которого она может быть активирована последующей инфекцией хелперного вируса. Сайт интеграции может быть специфичным для определенных хозяев (например, q плечо хромосомы человека 19 для AAV-2).

14.1.9.1 Подсемейство: *Parvovirinae*

Вирусы этого подсемейства инфицируют позвоночных и культуры их клеток часто в ассоциации с другими вирусами.

Род: *Parvovirus*

Типовой вид: *Mice minute virus* (MMV) (микроскопический вирус мышей).

Для некоторых членов рода характерно содержание в составе зрелых вирио-

нов негативной цепи ДНК в 5 kb. Для других членов присуще наличие позитивной цепи ДНК (от 1 % до 50 %). Линейная молекула односпиральной ДНК имеет шпилечную структуру на обоих концах (на 3'-конце длиной от 115 до 116 нуклеотидов, на 5'-конце длиной от 200 до 242 нуклеотидов). Два промотора для мРНК, один сайт полиаденилирования на 3'-конце. В культуре клеток вызывают характерный ЦПЭ. Многие виды проявляют гемагглютинирующую активность с эритроцитами одного или нескольких видов животных. В экспериментальных условиях спектр хозяев может быть значительно расширен (например, вирусы грызунов и LUIIIV репродуцируются в сирийских хомяках). Для ряда видов характерна трансплацентарная передача. Парвовирусы гусей могут передаваться трансовариально.

Подразделение на виды основано на различиях по спектру естественных хозяев, и антигенности структурных белков. В настоящее время официально зарегистрирован 21 основной и 1 предполагаемый вид.

Род: *Erythrovirus*

Типовой вид: *B19 virus* (B19V).

Популяция зрелых вирионов содержит эквивалентное количество односпиральных ДНК с позитивной и негативной полярностью, размером 5 kb. Молекулы ДНК содержат инвертированные концевые повторы по 383 нуклеотида, первые 365 которых формируют палиндромные последовательности. При экстракции комплементарные цепи ДНК обычно формируют двуспиральные ДНК. Идентифицирован 1 промотор мРНК, 2 сигнала полиаденилирования (один – ближе к центру генома, другой в области 3'-конца). Активная репликация вирусов происходит в первичных предшественниках эритроцитов. Продуктивная инфекция отмечается в первичной культуре эритроцитов пупочного канатика и перевиваемой линии мегакариобластоидных клеток. В настоящее время официально зарегистрирован 1 основной и 2 предполагаемых вида.

Род: *Dependovirus*

Типовой вид: *Adeno-associated virus 2* (AAV-2).

Популяция зрелых вирионов содержит эквивалентное количество односпиральных ДНК с позитивной и негативной полярностью, размером 4,7 kb. Молекулы

ДНК содержат инвертированные концевые повторы по 145 нуклеотидов, первые 125 которых формируют палиндромные последовательности. При экстракции комплементарные цепи ДНК обычно формируют двуспиральные ДНК. Идентифицировано 3 промотора мРНК. Эффективная репликация вирусов зависит от вирусов помощников (адено- или герпесвирусов). В определенных условиях (присутствие мутагенов, синхронизация репликации клеток с гидроксиурией) может наблюдаться репликация вирусов при отсутствии вирусов-помощников. Все изоляты аденоассоциированных вирусов имеют общий антиген, выявляемый в РИФ. Трансплацентарная передача наблюдалась в отношении AAV-1.

Подразделение на виды основано на различиях по спектру естественных хозяев, и антигенности структурных белков. В настоящее время официально зарегистрировано 11 видов

14.1.9.2 Подсемейство: *Densovirinae*

Вирусы этого подсемейства инфицируют членистоногих. Односпиральная ДНК может иметь как негативную, так и позитивную полярность. При экстракции комплементарные цепи ДНК обычно формируют двуспиральные ДНК. Определено 4 структурных протеина. Вирусы реплицируются эффективно в большинстве тканей личинок, нимф и взрослых видов членистоногих без вовлечения вирусов-помощников. Клеточные изменения характеризуются гипертрофией ядра со скоплением вирионов внутри него, формирующих массивные плотные внутриядерные массы. Естественными хозяевами могут быть представители Dictyoptera, Diptera, Lepidoptera, Odonata и Orthoptera.

Род: *Densovirus.*

Типовой вид: *Junonia coenia densovirus* (JcDNV), выделено 2 вида.

Род: *Iteravirus*

Типовой вид: *Bomhyx mori densovirus* (BmDNV), выделен 1 вид.

Род: *Brevidensovirus*

Типовой вид: *Aedes aegypti densovirus* (AaDNV), выделено 2 вида и 13 предпо-

лагаемых видов.

Предполагаемые виды подсемейства (2 вида).

14.1.10 Семейство: *Hepadnaviridae*

Род: *Orthohepadnavirus, Avihepadnavirus.*

Характеристика вириона. Вирион имеет сферический, реже плеоморфный, без явных поверхностных выступов (диаметр от 40 нм до 48 нм). Внешняя оболочка толщиной 7 нм, чувствительная к детергентам, содержащая поверхностные антигены, окружает нуклеокапсидное ядро икосаэдральной симметрии, состоящее из одного мажерного протеина (корового протеина) и включающего в свой состав геном вируса, вирусную полимеразу и ассоциированные клеточные протеины..

В случае *Hepatitis B virus* (вируса гепатита В) максимальный нуклеокапсидный кор имеет диаметр около 34 нм, и содержит 240 субъединиц корового протеина (T = 4), тогда как наиболее мелкий – 30 нм в диаметре и состоит только из 180 субъединиц корового протеина (T = 3). Гепаднавирусная инфекция сопровождается чрезмерным накоплением поверхностных протеинов, которые секретируются как плеоморфные липопротеиновые частицы вместе с вирусом в кровь. В случае HBV они образуют сферические частицы (от 17 нм до 22 нм) и филаментозные структуры. Mr (вирион) от $1,6 \times 10^6$ до $1,8 \times 10^6$; плавучая плотность в CsCl 1,25 г/см^3 (вирион), от 1,18 г/см^3 до 1,20 г/см^3 (частицы без кора), 1,30 г/см^3 (кор, выделенный из вириона).

Геном. ДНК: 1 молекула, не закрытая ковалентно, циркулярная, частично односпиральная; размер от 3,0 kbp до 3,3 kbp; G + C состав 48 %.

Цепь с негативной полярностью – полноразмерная, размер другой может варьировать. У ортогепаднавирусов полноразмерная цепь ДНК с негативной полярностью имеет ник с конечным избытком в 8-9 оснований в уникальном сайте в позиции 242 (по нуклеотидам) от 5'-конца цепи с позитивной полярностью. У альфагепаднавирусов ник в цепи с негативной полярностью примерно в 50 nts от 5'-конца цепи с позитивной полярностью. 5'-конец цепи ДНК с негативной полярностью имеет ковалентно-сцепленный терминальный протеин, а 5'-конец цепи ДНК с позитив-

ной полярностью имеет ковалентно-сцепленный, кэпированный по 5'-концу, олиго-рибонуклеотидный праймер, длиной 19 нуклеотидов. 3'-конец цепи с позитивной полярностью заканчивается в разных позициях других молекул, образуя одноцепочечные разрывы, включающие до 60 % размера генома (HBV), но обычно очень короткие у альфагепаднавирусов. Таким образом, циркулярная конфигурация поддерживается спариванием оснований перекрывая связующие 5'-концы каждой цепи.

Протеины.

1 Вирионы и пустые субвирусные частицы могут содержать от 2 до 3-х оболочечных протеина с общим С- и разными N-концами, что обусловлено разными сайтами инициации трансляции. Обычно вирион содержит малый трансмембранный протеин (S), протеин среднего размера (M) и крупный протеин (L), который миристилирован по N-концу. Во многих случаях встречается более чем одна форма каждого из упомянутых протеинов, что связано с разным профилем гликозилирования. Вирионы и филаментозные структуры HBV обогащены протеином L, пустые частицы состоят в основном из протеина S, тогда как у *Duck hepatitis B virus* (DHBV) (вирус гепатита В уток) протеины L и S распределены равномерно между типами частиц.

2 Коровый протеин имеет большой N-концевой домен и небольшой РНК-связывающий домен по С-концу. При накоплении корового протеина выше порогового уровня приводит к самосборке через димеры до полных нуклеокапсидов при отсутствии других вирусных компонентов.

3 Полимеразный протеин состоит из N-концевого домена (TP) с функцией ДНК-праймера, спейсерного участка разного размера, обратной транскриптазы и домена RNaseH. TP-домен ковалентно связан с 5' -концом минус-цепи вирусной ДНК через тирозинфосфодиэфирную связь.

4 Большинство членов семейства содержат четвертую ORF (ген «X»), расположенную ниже гена S и частично перекрывающуюся со связующим 5'-концом. Она кодирует неструктурный протеин, который может функционировать как случайный транскрипционный активатор.

5 Клеточные протеины, входящие в состав вириона, включают протеинкиназу,

которая фосфорилирует РНК-связывающий домен корового протеина, протеина теплового шока 70 (heat shock protein, Hsc70) и протеина теплового шока 90 (heat shock protein, Hsc90), который, хотя бы в отношении DHBV, является частью мультикомпонентного шаперонового комплекса, участвующего в репликации и сборке нуклеокапсида.

6 Коровый протеин так же может существовать в виде растворимой формы (е-антиген), если транслируется с добавочного стартового кодона, расположенного выше корового стартового кодона.

Липиды, углеводы.

Липиды составляют от 30 % до 40 % вирусной оболочки или пустой частицы. Они заимствуются из клеточной мембраны при взаимодействии эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, и включают фосфолипиды, холестерол, сложные холестероловые эфиры и триглицериды. У ортогепаднавирусов идентифицированы N- и О-связанные гликаны сложного типа.

Организация генома и репликация. Геном гепаднавирусов содержит следующие мажерные ORFs: прекор/кор (preC/C), полимераза (P), env или поверхностный (preS/S) и, у ортогепаднавирусов – ген X.

ORF preC / C кодирует два разных продукта: коровый протеин, образующий протеиновый чехол нуклеокапсида, и прекоровый протеин, который нацелен на клеточные секреторные механизмы, процессирующийся с двух концов и обнаруживающийся в сыворотке инфицированных организмов как е-антиген. Оба продукта, транслируются с геномных избыточных от 3 kb до 5 kb транскриптов, с немного различающимися 5'-концами. P-ORFs покрывают до 80 % генома и кодируют вирусный репликативный энзим P, который является необходимым компонентом для процесса сборки. Протеин P транслируется с той же геномной РНК, что и направляет прямой синтез корового протеина при внутренней инициации. Ген env или поверхностный состоит из трех in-phase ORFs, обозначаемых в направлении 5'-3' preSl, preS2 и S. S может экспрессироваться отдельно давая малый или S протеин; котрансляция preS2 / S, приводит к образованию среднего протеина (M), а трансляция preSl / preS2 / S приводит к образованию большого протеина. Таким образом,

домен S является общим для всех трех форм поверхностного протеина. Что касается ORFs preC / C, то это достигается генерированием мРНК с разными 5'-концами, в которых инициаторные кодоны участков preSl, preS2 и S изначально взаимодействуют с рибосомами. Протеин L транслируется из мРНК 2,4 kb, а M и S – из транскриптов размером 2,1 kb. Все вирусные транскрипты колинеарны по 3'-концу, заканчиваются после локализации уникального сигнала полиаденилирования в гене C. Ген X кодирует плейотропный трансактиватор, необходимый для возникновения инфекции, вызываемой WHV *(Woodchuck hepatitis B virus,* WHV), и участвующий в процессе канцерогенеза.

Репликация проходит в две стадии, в которых вирусный геном либо проникает в ядро и конвертируется в ковалентно закрытую суперскрученную ДНК **(**cccDNA**),** либо РНК-транскрипты cccDNA обратно транскрибируются в цитоплазме, а образовавшаяся геномная ДНК инкапсидируется и секретируется. Инфекционные вирионы, содержащие ДНК прикрепляются к клетке-мишени путем взаимодействия протеина L с клеточными рецепторами. Нуклеокапсид доставляется в цитоплазму, после чего определенные механизмы доставляют геном вируса в ядро. Клеточные полимеразы и другие энзимы репарируют одноцепочечные разрывы, удаляют терминальный протеин и олигорибонуклеотид с негативных и позитивных цепей ДНК, соответственно, после чего происходит суперскручивание и ДНК-лигирование, и вирусный геном переходит в ковалентно закрытую циркулярную (суперскрученную) форму ДНК (cccDNA). CccDNA в форме гистонассоциированной минихромосомы является стабильной матрицей для транскрипции.

Геномные и субгеномные РНК транскрибируются клеточными РНК полимеразами II в ряд классов РНК (по размеру), некоторые из которых проявляют микрогетерогенность по 5'-концу, но все оканчиваются общим 3'-сайтом полиаденилирования. Самый крупный транскрипт транслируется в прекоровый протеин. Несколько более короткий транслируется в коровый протеин и (за счет внутренней инициации) полимеразу, а так же служит в качестве РНК-матрицы («прегеном») для обратной транскрипции. Полимеразный протеин ассоциируется со специфическим сигналом инкапсидации (e) прегеномной РНК, и такой предсборочный комплекс запускает

сборку димеров корового протеина в цельный нуклеокапсид.

Другие классы субгеномной РНК транслируются в разные продукты поверхностного гена (L, M и S), которые димеризуются в ER, олигомеризуются и отпочковываются в участок постER / преГольджи, образуя пустые частицы, обратная транскрипция прегеномной РНК происходит внутри цитоплазматических незрелых коров (cores). В этом процессе используется терминальньй протеиновый домен полимеразы в качестве праймера для синтеза первой цепи, и короткий неразрезанный олигорибонуклеотид, образованный с матрицы РНК как праймер второй цепи, и, что характерно для ретровирусов, синтез первой цепи происходит бесконечно с транслокацией короткого сегмента вновь синтезированной (-) ДНК от 5'-конца к 3'-концу матрицы РНК. Переключение второй матрицы во время синтеза (+) ДНК приводит к формированию открытых циркулярных геномов, имеющих длину чуть меньшую, чем полная (+) цепь, поддерживаемая перекрыванием сцепленных концов. Нуклеокапсиды, содержащие частично обратнотранскрибированную ДНК, могут либо ассоциироваться с локализованными в цитоплазме npe-S доменами протеина L, и затем отпочковываться в эндоплазматический ретикулум как созревающие вирионы, либо могут возвратиться обратно в ядро, увеличивая, таким образом, пул cccDNA. Так как интеграция вирусной ДНК в геном клетки не является необходимым процессом в репликации и происходит обычно как случайное событие, интегрированная вирусная ДНК содержит делеции, инверсии и редупликации, что показано при анализе клеток гепатоцеллюлярной карциномы (HCC), культивируемых *in vitro,* или взятых от пациентов.

Антигенные свойства. Идентифицировано 3 принципиальных антигена: HBsAg, HBcAg и HBeAg – для HBV, DHBsAg, DHBcAg и DHBeAg – для DHBV и т.д. Антитела к данным антигенам получили соответствующие названия: анти-HBs, анти-HBc и анти-Hbe и т.д. HBsAg участвует в нейтрализации. Он дает незначительные перекрестные реакции с аналогичными антигенами WHV и GSHV, но не с DHBsAg. Антигены npe-S могут нести специфические детерминанты нейтрализации. Протеины S достаточны для обеспечения протективного иммунитета.

Протеины HBeAg и HBcAg имеют общие сиквенсы и эпитопы, но также име-

ют эпитопы, позволяющие дифференцировать эти белки между собой. Протеин HBsAg (Mr 16 × 10^3) является дериватом протеина HBcAg и HBeAg. Он обнаруживается в сыворотке крови пациентов как растворимый протеин. Обнаружена более сильная перекрестная активность HBcAg с коровым антигеном WHV, чем с поверхностными антигенами. В большинстве ранней литературы термин поверхностный антиген или HBsAg использовался случайно для обозначения антигенной специфичности различных белковых продуктов генов npe-Sl / npe-S2 / S или пустых (от 17 нм до 22 нм) частиц, экспрессирующих HBsAg. Термин «антиген» не может быть использован если подразумевается «протеин» или «частица». То же относится и для используемого понятия «коровый антиген».

Биологические особенности. Все гепаднавирусы проявляют узкую специфичность в отношении видов-хозяев. Репродукция многих вирусов *in vitro* была показана только после трансфекции культуры клеток клонированной ДНК, что приводило к продукции инфекционного вируса. Удавалось добиться репродукции некоторых гепаднавирусов путем инокуляции первичной культуры гепатоцитов сывороткой крови, содержащей вирус.

Гепаднавирусная инфекция *in vivo* характеризуется следующими признаками:

1 Проявляется четкая гепатотропность, хотя вирусные антигены и репликативные формы нуклеиновых кислот могут быть обнаружены и в других местах (поджелудочная железа, селезенка, почки, лейкоциты и др.), для авигепаднавирусов печень остается основным местом репродукции.

2 Инфекция может быть кратковременной или персистентной, исход которых зависит от таких факторов как возраст хозяина и доза заражения. Персистентные инфекции обычно длительны и могут сопровождаться высоким уровнем циркулирующих в кровяном русле вирионов и субвирусных частиц.

3 Пустые вирусоподобные частицы, сформированные избытком оболочечных компонентов вируса представлены в значительно большем количестве, чем полноценные вирионы, у большинства индивидов на любой стадии инфекции.

4 Считается, что репродукция вируса не приводит к развитию цитопатического эффекта, а поражение печени у разных индивидов обусловлено воздействием им-

мунной системы на инфицированные гепатоциты.

5 При ортогепаднавирусной инфекции, но не при авигепаднавирусной инфекции, персистентная вирусная инфекция обусловливает значительно чаще развитие гепатоцеллюлярной карциномы.

Род: *Orthohepadnavirus*

Типовой вид: *Hepatitis B virus* (HBV) (вирус гепатита B).

Характерные особенности. Вирусы инфицируют млекопитающих; характеризуются узким спектром восприимчивых животных. В природе единственный хозяин вируса гепатита B – человек, хотя экспериментально удавалось инфицировать шимпанзе и африканских зеленых мартышек, макак резус и шерстистых обезьян (woolly monkey). Вирионы HBV имеют диаметр от 40 нм до 45 нм с внутренним нуклеокапсидом от 32 нм до 36 нм, пустые оболочечные частицы HBV обычно сферические (от 16 нм до 25 нм) и филаментозные (20 нм в диаметре и различной длины). Геном HBV составляет 3,2 kb со сцепленными перекрытиями в 240 kbp. Вирус имеет мажерный оболочечный протеин S размером в 226 аминокислот, несущественный протеин M (271 аминокислота) и протеин L (400 аминокислот).

Протеины частично гликозилированы, образуют дуплексы при электрофорезе в геле (например, для HBV: H24 / GP27 – для S, P39 / GP42 – для L, GP33 / GP36 – для M) благодаря дополнительному гликозилированию по N-концу.

Для HBsAg показано наличие не менее 5-и антигенных детерминант. Детерминанты группы (a) встречаются у всех HBsAg. Мутации в этом участке обнаружены у иммунизированных индивидов, которые впоследствии стали инфицированными, у HBV-носителей и инфицированных индивидов, подвергавшихся иммунотерапии. Две пары субтиповых детерминант (d,y и w,r) обычно взаимно исключающие (наподобие аллелей). Антигенная гетерогенность детерминанты w и дополнительных детерминант, таких как q, x или g также была описана. Таким образом, обнаруживается восемь серологических субтипов (ayw, ayw_2, ayw3, ayw_4, ayr, ad \ V2, adw_3, adw_4 и adr), имеющие разное географическое распространение. Анализ сиквенсов поверхностного гена также был использован для подразделения на генотипы A-F, различающиеся между собой на нуклеотидном уровне на от 8 % до 14 %. Разные ге-

нотипы также имеют разное географическое распространение. Между подразделением на генотипы и серотипы отмечено сходство, но не полное. Разные изоляты имеют нуклеотидную вариабельность не более 3,5 %. Вирус арктических белок (Arctic squirrel hepatitis vims, ASHV) отличается от WHV и *Ground squirrel hepatitis B virus* (GSHV) почти в равной степени (15 % замен оснований) как и два последних вируса различаются между собой.

Биологические особенности. H8V может вызывать острые и хронические гепатиты, циррозы, гепатоцеллюлярные карциномы, болезни иммунных комплексов и апластическую анемию. Состояние бессимптомного носительства с высоким уровнем виремии может развиваться особенно после перинатальной инфекции или при иммуносупрессии.

Горизонтальная передача HBV обычно происходит по следующим путям: 1) чрез кожу при контакте с инфицированной кровью или другой жидкостью (например, использование инфицированной крови или кровяных продуктов при гемотрансфузии); 2) половой контакт; 3) перинатальная трансмиссия от инфицированной матери; 4) «инаппарантная горизонтальная» передача, особенно между детьми в обществах с низким уровнем социально-экономического развития, связанная, вероятно, с неотмечаемым инфицированием через кожу и слизистые. В обществах с высоким уровнем превалентности инфекции доминируют 3 и 4 пути, а в обществах с низкой превалентностыо инфекция болезнь встречается у индивидов на более поздних этапах жизни, и распространяется чаще по 1 и 2 пути.

Гепатит встречается у сурков (woodchuck) и белок, инфицированных соответствующим вирусом. Хроническая инфекция, обусловленная данными вирусами, имеет больший риск возникновения гепатоцеллюлярной карциномы, чем у хронических носителей HBV. В случае WHV гепатоцеллюлярная карцинома чаще встречается в течение 2 лет инфекции.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Для подразделения на виды используется следующие критерии:

- различия по нуклеотидному составу; WHV/HBV 40 %; GHSV/WHV 15 %;
- различия по спектру восприимчивых хозяев: HBV-инфекция ограничивает-

ся приматами; GSHV-инфекции экспериментально воспроизводилась у бурундуков и сурков, но не у нескольких видов, близких наземным белкам; WHV также имеет узкий спектр хозяев, не инфицируют наземных белок и других видов грызунов. Онкогенность: все три вида ассоциированы с первичным раком печени у инфицированных хозяев. Однако предполагаемые механизмы различны в каждом случае, а инцидентность и временные рамки так же различны, будучи наивысшими, в отношении WHV, самыми низкими в отношении HBV. В настоящее время официально зарегистрировано 3 основных и 1 предполагаемый вид Arctic squirrel hepatitis virus (ASHV).

Род: *Avihepadnavirus*

Типовой вид: *Duck hepatitis B virus* (DHBV) (вирус гепатита В уток).

Характерные особенности. Вирион сферический, от 46 нм до 48 нм в диаметре, нуклеокапсид 35 нм в диаметре. Пустые оболочечные частицы HBV чаще плеоморфные 60 нм в диаметре. Одноцепочечные участки вирусной ДНК обычно короткие (8 оснований). У DHBV не выявлено гена X, содержащего обычный инициирующий кодон. Вирусные частицы имеют в своем составе только самый крупный (Mr 36×10^3) и самый мелкий (Mr 17×10^3) S протеины.

Heron hepatitis B virus (HHBV) отличается от DHBV тем, что наиболее консервативная ORF расположена выше C в позиции, аналогичной гену X ортогепаднавирусов, и тем, что потенциальные сайты меристилирования имеет протеин S, но не протеин L.

Основной путь передачи – вертикальный.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Для подразделения на виды используется три основных критерия:

- различия по нуклеотидному сиквенсу: HHBV/DHBV 21,6 %;
- присутствие у HHBV, но не у DHBV высоко консервативной ORF, расположенной выше C в позиции, аналогичной таковой у ортогепаднавирусов;
- потенциальные сайты меристилирования присутствуют в гене протеина S (HHBV) или гене npeS (DHBV).

Некоторые другие, менее изученные вирусы, выделенные от гусей и уток, на основе анализа сиквенсов, более близки к DHBV, чем к HHBV. В настоящее время официально зарегистрировано 3 вида.

Неклассифицированные вирусы семейства (1 вид): Ross' goose hepatitis B virus (RGHBV)

Филогенетическое родство внутри семейства. Между представителями двух родов гепаднавирусов определены следующие отличия:

- низкая идентичность по нуклеотидному сиквенсу;
- различия по размеру генома (3,2 kb у ортогепаднавирусов и 3,0 kb у авигепаднавирусов);
- спектр восприимчивых хозяев ограничен млекопитающими или птицами, соответственно.

Сходство с другими таксонами. Этап обратной транскрипции является общей чертой, характерной гепаднавирусам, ретровирусам и каулимовирусам. Гепаднавирусы и ретровирусы также содержат три мажерных гена с одинаковыми функциями и в одинаковом расположении (то есть, кор-полимераза-npeS/S и *gag-pol-env,* соответственно). Главное отличие для гепаднавирусов – форма генома у внеклеточных вирионов – ДНК, и обратная транскрипция происходит во время эфферентного или выходящего пути репликативного цикла (outgoing arm of replication cycle), тогда как для ретровирусов характерно обратное.

14.1.11 Семейство: *Retroviridae*

Род: *Aipharetrovirus, Betaretrovirus, Gammaretrovirus, Deltaretrovirus, Epsilonretrovirus, Lentivirus, Spumavirus*

Характеристика вириона. Вирион сферический (диаметр от 80 нм до 100 нм) оболочечный, с гликопротеиновыми поверхностными выступами (8 нм в длину). Внутреннее ядро включает сферический нуклеокапсид (нуклеоид), расположенный эксцентрично у представителей рода *Betaretrovirus,* по центру у *Aipharetrovirus, Gammaretrovirus, Deltaretrovirus* и *Spumavirus,* и в виде стержня или усеченного ко-

нуса у представителей рода *Lentivirus*.

Существует два пути морфогенеза. Исторически номенклатура, основанная на электронной микроскопии классифицировала членов родов *Aipharetrovirus* и *Gammaretrovirus,* у которых сборка незрелого капсида происходят на плазматической мембране, как вирусы типа С. По отношению к членам рода *Betaretrovirus* считалось, что сборка их частиц типа А (незрелых капсидов) происходит в цитоплазме с последующим почкованием по морфологическому типу В (MMTV) или D (Mason-Pfizer monkey virus, M-PMV).

Вирионы чувствительны к нагреванию, детергентам и формальдегиду. Поверхностные гликопротеины могут быть частично удалены протеолитическими ферментами. Относительно устойчивы к УФ облучению.

Плавучая плотность от 1,16 г/см^3 до 1,18 г/см^3.

Геном. Геном представлен димером молекул РНК (мономер РНК: односпиральная, линейная с позитивной полярностью, размер от 7 kb до 11 kb), составляющих 2 % сухого веса вириона. Мономеры связаны друг с другом водородными связями. Каждый мономер полиаденилирован и кэпирован по 3'- и 5'-концу, соответственно. Очищенная вирусная РНК не инфекционна. Каждый мономер комплементарно ассоциирован со специфической молекулой тРНК, в области (называемой сайтом связывания с праймером – primer binding site), расположенной ближе к 5'-концу РНК, и около 18 оснований по 3'-концу тРНК. РНК и фрагменты ДНК, клеточного происхождения могут случайно оказаться в составе вириона.

Другие компоненты вириона.

Протеины составляют около 60 % сухой массы вириона. Два оболочечных протеина: SU (surface – поверхностный) и TM (transmembrane – трансмембранный), кодируются вирусным геном *env.* Внутренние негликозилированные от 3 до 6 структурных протеинов кодируются геном *gag.* Расположение от N-конца: (I) MA (matrix – матрикс), (2) протеин, обнаруженный у некоторых вирусов, с неопределенной функцией, (3) CA (capsid protein – капсидный протеин), (4) NC (nucleocapsid – нуклеокапсид). Протеин MA часто ацилирован, с миристиловой частью, ковалентно связанной с аминоконцевым глицином. К другим протеинам относятся: протеаза

(PR, кодируемая геном *pro*), обратная транскриптаза (RT, кодируемая геном *pol*) и интеграза (IN, кодируемая геном *pot*). У некоторых вирусов присутствует dUTPase (DU), роль которого не ясна.

Липиды составляют около 35 % сухого веса вириона, и являются производными клеточной мембраны.

Углеводы составляют 3 % сухого веса вириона. Обычно оба (реже один) поверхностных оболочечных протеина гликозилированы. В вирусной оболочке также обнаруживаются клеточные гликолипиды.

Организация генома и репликация. Вирион несет две копии генома. Инфекционный вирус имеет 4 основных гена, кодирующих вирусные протеины в следующем порядке: *5′-gag-pro-pol-env-У.* Некоторые ретровирусы содержат гены, кодирующие неструктурные протеины, играющие важную роль в регуляции экспрессии генов и репликации вируса. Другие могут нести влияющие на патогенез последовательности клеточного происхождения, которые могут быть включены в полноразмерный геном вируса (например, у вируса саркомы Рауса – *Rouse sarcoma virus,* RSV) или в виде замен при делециях вирусных последовательностей (например, у вируса саркомы мышей – *Murine sarcoma virus*). Такие делеции приводят к нарушению репликации вируса и зависят от нетрансформирующих вирусов-помощников, необходимых для образования инфекционного потомства. Во многих случаях последовательности клеточного происхождения образуют гибриды с генами вирусных структурных белков, которые транслируются в один химерный протеин (например, *gag-one*).

Проникновение в клетку определяется взаимодействием гликопротеином вириона и специфическими рецепторами на клеточной поверхности, следствием чего является слияние вирусной оболочки и клеточной мембраны и эндоцитоз. Некоторые из клеточных рецепторов были идентифицированы. В проникновении вируса иммунодефицита человека *(Human immunodificiency virus,* HIV) в клетку принимают участие два рецептора: иммуноглобулин-подобный протеин с одним трансмембранным участком CD4 и хемокиновый рецептор, пронизывающий мембрану семь раз (CCR5 или CXCR4). Рецепторы для экотропных *(Murine leukemia virus,* MLV), ам-

фотропных MLV и *Gibbon are leukemia virus* (GALV) связаны с участием в транспортировке мелких молекул и имеют сложную структуру с множественными трансмембранными доменами. Для вирусов лейкоза птиц (ALVs) идентифицировано два рецептора: для вирусов подгруппы A – мелкая молекула с одним трансмембранным доменом, отдаленно напоминающая клеточный рецептор для низкоплотностных липопротеинов, тогда как для вирусов подгруппы B – рецепторы семейства протеинов фактора некроза опухоли.

Репликация начинается с обратной транскрипции (при участии обратной транскриптазы, RT) вирионной РНК в кДНК, с использованием 3'-конца тРНК в качестве праймера. Синтез кДНК сопровождается разрезанием вирусной РНК (за счет RNAse H активности RT), Продукты гидролиза служат для первичного синтеза кДНК с негативной полярностью. Процесс обратной транскрипции характеризуется высокой частотой рекомбинации.

Ретровирусная ДНК интегрируется в хромосомную ДНК клетки, образуя провирус, при участии вирусного протеина IN. Слияние конца вирусной ДНК с клеточной сопровождается удалением двух оснований с концов вирусной ДНК и формированием короткого дуплекса клеточного сиквенса в сайте интеграции. Интеграция вирусного генома может происходить по многим сайтам клеточного генома. Однако однажды интегрировавшись, сиквенс уже не может изменить свою позицию внутри той же клетки. Карта интегрированного провируса колинеарна неинтегрированной вирусной ДНК. Интеграция предшествует вирусной репликации (рисунок 52).

Интегрированный провирус транскрибируется клеточной РНК полимеразой II в вирионную РНК и мРНК в ответ на транскрипционный сигнал в вирусных LTRs. У вирусов некоторых родов транскрипция также регулируется вирусными трансактиваторами. В зависимости от вируса и генетической карты различают несколько классов мРНК. мРНК, включающая весь геном служит для трансляции генов *gag, pro, pol* (расположенных в 5'-половине РНК), продуктом которых является полипротеин-предшественник, разрезаемый до структурных протеинов, полимеразы, RT и IN, соответственно.

Меньшие РНК, включающие 5'-конец генома, после сплайсинга с сиквенсом

3'-конца генома, и включающие ген *env,* участки U3 и R, транслируются в предшественники оболочечных протеинов.

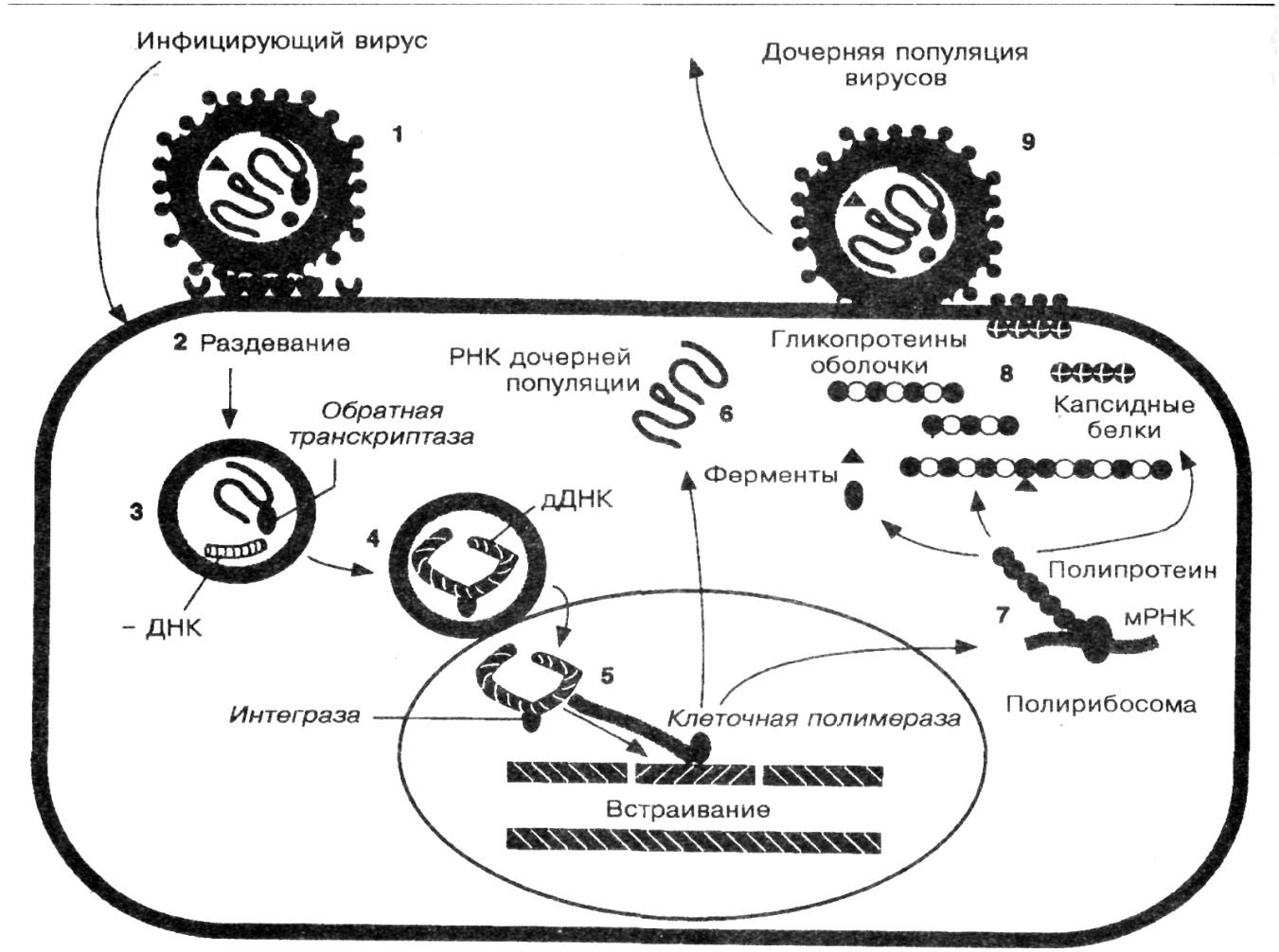


Рисунок 52 – Репликативный цикл ретровирусов

Инфекционная вирусная частица (1) проникает в клетку посредством слияния с клеточной стенкой после адсорбции на ней. Затем вирус *раздевается* (2), а обратная транскриптаза (входит в состав вирусной частицы) индуцирует синтез -ДНК, используя в качестве матрицы молекулу РНК (3). +ДНК копируется с вновь синтезированной молекулы -ДНК, в результате чего образуется двойная цепь ДНК (дДНК) (4). дДНК транспортируется в ядро клетки, где клеточная ДНК подвергается сплайсингу с образованием рекомбинантов с вирусной ДНК (5). Интегрированная молекула ДНК транскрибируется клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразой в +РНК, используемую в качестве геномов дочерних популяций (6), а также транслируется как мРНК для синтеза (через стадию образования полипротеинов) структурных белков и ферментов (7). Некоторая часть +РНК подвергается сплайсингу с об-

разованием мРНК малого размера, кодирующей поверхностные, регуляторные и добавочные белки (8). Зрелые дочерние популяции высвобождаются почкованием (9).

У вирусов, содержащих дополнительные гены, может происходить другой сплайсинг, но все такие РНК будут иметь общий 5'-концевой сиквенс. Спумавирусы уникальны в том, что могут использовать внутренний промотор, расположенный в гене *env* выше доступа к рамке считывания. Большинство первично транслированных продуктов представляют собой полипротеины, подвергающиеся протеолитическому разрезанию для приобретения функциональной активности. Продукты генов *gag, pro* и *pol* обычно являются вторичными после первичной трансляции продуктов. Для трансляции *pro к pol* используются обходные трансляционные терминирующие сигналы.

Сборка капсида происходит либо на плазматической мембране (вирусы большинства родов), либо как внутрицитоплазматические частицы (*Betaretrovirus* и *Spumavirus*), и высвобождаются из клетки почкованием. Полипротеиновый процессинг внутренних протеинов происходит попутно или последовательно с созреванием вириона.

Антигенные свойства. Вирусные протеины содержат типо- и группоспецифические антигенные детерминанты. Некоторые из типоспецифических детерминант участвуют в антитело-обусловленной нейтрализации вируса. Группоспецифические детерминанты являются общими у членов одной серогруппы или могут встречаться у членов разных серогрупп внутри рода. Показана слабая перекрестная активность между представителями разных родов. Эпитопы определяющие Т-клеточный ответ обнаружены у многих структурных протеинов. Антигенные свойства редко используются в классификации вирусов данного семейства.

Биологические особенности. Ретровирусы широко распространены среди позвоночных как экзогенные агенты. Эндогенные провирусы, являющиеся результатом произошедшего когда-либо инфицирования герминативных клеток, наследуются по законам Менделя. Ретровирусы связаны с различными болезнями: лейкемии, лимфомы, саркомы и другие опухолевидные процессы тканей мезодермального происхождения; карцинома печени, почек, молочных желез; иммунодефициты

(СПИД); аутоиммунные болезни; болезнь нижних двигательных нервов и многие другие остро протекающие болезни. Некоторые ретровирусы непатогенны.

Распространение может быть горизонтальное (через кровь, слюну, половые контакты и т.п.) и вертикальное (прямое инфицирование плода; инфицирование через молоко, или при прохождении через родовые пути). Эндогенные ретровирусы наследуются в виде провирусов.

Род: *Alpharetrovirus*

Типовой вид: *Avian leukosis virus* (ALV) (вирус лейкоза птиц).

Сборка вирусных частиц происходит на плазматической мембране, по морфологии С-типа. Молекулярная масса протеинов: MA ± 19 × 10^3; CA ± 27 × 10^3; NC ± 12 × 10^3; PR ± 15 × 10^3; RT ± 68 × 10^3; IN ± 32 × 10^3; SU ± 85 × 10^3; TM ± 37 × 10^3. Геном 7,2 кб (1 мономер). Расположение генов: *gag-pro-pol-env.* Дополнительных генов нет. LTR около 350 нуклеотидов, из которых 250 составляют участок U3, 20 – сиквенс R, 80 – участок U5. Вирусы широко распространены и являются экзо- и эндогенными вирусами уток и других видов птиц. Изоляты ALV подразделяются на подгруппы A-J по различию в используемых клеточных рецепторах. Отдаленное сходство сиквенсов выявлено у эндогенных вирусов птиц и млекопитающих. Инфекция ассоциируется с малигнизацией и другими болезнями (истощение, остеопороз). Выделено много онкоген-содержащих вирусов.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Для подразделения на виды используются следующие критерии:

- нуклеотидный сиквенс;
- аминокислотный сиквенс (генных продуктов);
- спектр естественных хозяев;
- разный онкогенез (если есть).

Например, вирус лейкоза птиц может быть легко отличен от вируса саркомы Рауса, так как не имеет онкогена, и кодирует только *gag, pol* и *env.* Репликация дефектных альфаретровирусов может быть отличена от вируса саркомы Рауса по различным делениям участков генов *gag, pol* и *env* и наличию уникальных для каждого

онкогенов. Вирус саркомы Рауса кодирует онкоген *sre,* тогда как вирус миелобластоза птиц, например, кодирует онкоген *myb.* Спектр хозяев, определяемый взаимодействием поверхностных гликопротеинов и клеточных рецепторов обычно используется для определения штаммов внутри вида. В настоящее время официально зарегистрировано 9 видов.

Род: *Befaretrovirus*

Типовой вид: *Mouse mammary tumor virus* (MMTV) (вирус опухоли молочной железы мышей).

Характерные особенности. Вирионы MMTV имеют морфологию типа B (эксцентрично расположенное ядро, выступы на поверхности вириона). Другие члены рода имеют морфологию типа D (менее плотные поверхностные выступы и цилиндрический кор). Сборка капсида происходит в цитоплазме (образуя структуру, называемую частицами типа A), после чего они транспортируются и отпочковываются через цитоплазматическую мембрану. Молекулярная масса протеинов: MA ± 10×10^3; p21 ± 21×10^3; CA ± 27×10^3; NC ± 14x × 10^3; DU; PR ± 15×10^3; RT; IN; SU ± 52×10^3; TM ± 36×10^3. Размер генома от 8 kb до 10 kb (1 мономер). Организация для MMTV: *gag-pro-pol-env-sag.* У MMTV есть дополнительный ген *sag,* продуктом которого является суперантиген.

В данный род входят экзогенные, передающиеся вертикально (с молоком) и эндогенные вирусы мышей, так же как и экзогенные, передающиеся горизонтально, и эндогенные вирусы приматов и овец. Вирусы мышей ассоциированы с карциномой молочной железы и Т-лимфомами, тогда как экзогенные вирусы приматов ассоциированы с иммунодефицитными болезнями; *Jaagsiekte virus* (JSRV) ассоциирован с раком легких у овец. Онкоген-содержащие вирусы не выявлены.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Для подразделения на виды используются следующие критерии:

- нуклеотидный сиквенс;
- аминокислотный сиквенс (генных продуктов). Спектр естественных хозяев.

Некоторые ретровирусы приматов довольно различны между собой, хотя и

относятся к одному виду благодаря рекомбинации с геном *env* гаммаретровирусов. Наиболее дивергентные из них эндогенные *Squirrel monkey retrovirus* (SMRV) и *Langur virus* (LNGV), которые не могут инфицировать клетки из тканей органов приматов. Несколько серологически различных штаммов существует у вида *Mason-Pfizer monkey virus* (M-PMV). *Mouse mammary tu virus* (MMTV) выделен как отдельный вид, благодаря наличию уникального участка, кодирующего *sag* и очень отличающегося гена *env. Ovine pulmonary adenocarcinoma virus* (JSRV) также выделен как отдельный вид на основе оценки степени нуклеотидной дивергенции. Сходные эндогенные провирусы были идентифицированы и у других млекопитающих (грызуны, приматы). В настоящее время официально зарегистрировано 5 видов.

Род: *Gammaretrovirus*

Типовой вид: *Murine leukemia virus* (MLV) (вирус лейкемии мышей).

Характерные особенности. Вирион имеет морфологию типа С, со слабо различимыми поверхностными выступами. Плотный кор расположен в центре. Сборка капсида происходит на внутренней поверхности мембраны одновременно с почкованием. Молекулярная масса протеинов: MA ± 15 $\times 10^3$; CA ± 30 $\times 10^3$; NC ± 10 $\times 10^3$; PR ± 14 $\times 10^3$; RT ± 80 $\times 10^3$; IN ± 46 $\times 10^3$; SU ± 70 $\times 10^3$; TM ± 15 $\times 10^3$. Геном 8,3 kb; расположение генов: *gag-pro-pol-env.* Дополнительных генов нет. Размер LTR составляет 600 нуклеотидов, 500 нуклеотидов – регион U3, 60 нуклеотидов – R, 75 нуклеотидов – U5.

Вирусы широко распространены, экзогенные (передаются горизонтально и вертикально) и эндогенные вирусы встречаются у многих млекопитающих. Вирусы ретикулоэндотелиозов включают несколько видов, выделенных у птиц, не имеют сходных эндогенных последовательностей. Сходные эндогенные последовательности обнаружены у млекопитающих. Вирусы ассоциируются с рядом таких болезней как малигнизация, иммуносупрессия, нейрологические нарушения и др. Выделено много онкоген-содержащих вирусов млекопитающих и вирусов группы ретикулоэндотелиозов.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Для подразделения на виды используются следующие критерии:

- нуклеотидный сиквенс и вирусный онкогенез;
- антигенные свойства;
- спектр естественных хозяев;
- патогенность.

Описаны вирусы ретикулоэндотелиозов млекопитающих, рептилий и птиц. Вирусы млекопитающих могут быть как способными к репликации и не имеющими онкогенов клеточного происхождения, так и дефектными по способности к репликации, имеющие разные клеточные онкогены.

Murine leukemia virus **(**MLV**)** может быть отличен от *Gibbon ape leukemia virus* (GALV) no дивергенции сиквенсов, различием в рецепторах, необходимых для проникновения в клетку, и ограниченной антигенной перекрестной реактивности в ELISA. Вирус саркомы мышей, дефектные по репликации отличается от MLVs и между собой по наличию клеточных онкогенов (*Moloney sarcoma virus* (*mos*) и *Wooley monkey sarcoma virus* (*sis*)) и потерей частей генов *gag, pol, env.* В настоящее время официально зарегистрировано 17 видов.

Род: *Deltaretrovirus*

Типовой вид: *Bovine leukemia virus* (BLV) (вирус лейкемии (лейкоза) КРС),

По морфологии и стратегии сборки вирион дельтаретровирусов сходен с таковым гаммаретровирусов: морфология типа С, со слабо различимыми поверхностными выступами, плотный кор расположен в центре; сборка капсида происходит на внутренней поверхности мембраны одновременно с почкованием. Молекулярная масса протеинов: MA ± 19 × 10^3; CA ± 24 × 10^3; NC ± от 12 × 10^3 до 15 × 10^3; PR ± 14 × 10^3; RT; IN; SU ± 60 × 10^3; TM ± 21 × 10^3. Геном 8,3 kb; расположение генов; *gag-pro-pol-env-tax-rex.* Дополнительные гены: *tax-rex,* кодируют неструктурные протеины, участвующие в регуляции синтеза и процессинга вирусной РНК. Размер LTR составляет от 550 до 750 нуклеотидов, от 200 до 300 нуклеотидов – регион U3, от 135 до 235 нуклеотидов – R, от 100 до 200 нуклеотидов – U5. Экзогенные вирусы (с горизонтальной передачей) данного рода обнаружены только у небольшой группы млекопитающих. Родственных эндогенных вирусов не идентифицировано. Ин-

фекции связаны с В- или Т-клеточными лейкемиями или лимфомами, так же как и с нейрологической болезнью (тропический спастический парапорез или HTLV-ассоциированная миопатия) с длительным латентным периодом с инцидентностью менее 100 %. Онкоген-содержащих вирусов не выявлено.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Для подразделения на виды используются следующие критерии:

- нуклеотидный сиквенс;
- антигенные свойства;
- спектр естественных хозяев;
- патогенность.

HTLV-1 и STLV-1 были отнесены в соответствующий кластер не по признаку спектра восприимчивых хозяев, а в соответствии с географическим распространением. Все описанные субтипы HTLV-1 наиболее вероятно возникли при межвидовой передаче от обезьян человеку. Например, *Primate T-lymphotropic virus 1* (PTLV-1) отличается от *Primate T-lymphotropic virus 2* (PTLV-2), в первую очередь, на основе филогенетических различий. Оба вируса имеют одинаковую кодирующую стратегию, но только PTLV-1 имеет отношение к болезни человека.

Род: *Epsilonretrovirus*

Типовой вид: *Walleye dermal sarcoma virus* (WDS V) (вирус дермальной саркомы (глаукомы)).

Все представители рода являются экзогенными ретровирусами. Имеют сложную структуру. Размер генома от 11,7 kb до 12,8 kb, расположение генов: *gag-prO'pol-env-orfA-orfB;* 1-3 ORFs, кодирующие преимущественно дополнительные протеины. ORFa (вирусный гомолог циклину D) присутствует у всех трех ретровирусов, вызывающих глаукому. Функции двух других ORFs у вирусов глаукомы или одной ORF у ретровируса змееголова не определены. Размер LTR ретровирусов рыб варьирует от 500 до 650 нуклеотидов, 450 нуклеотидов – регион U3, 80 нуклеотидов – R, 75 нуклеотидов – U5.

Филогенетический анализ участка полимеразы показал, что ретровирусы глаукомы и окуней образуют группу вирусов, отличающихся от ретровирусов

змееголова. Тем не менее, на данный момент, все ретровирусы рыб оказались в одной группе с ретровирусами типа С млекопитающих.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Для подразделения на виды используются следующие критерии:

- нуклеотидный сиквенс и вирусный онкогенез;
- аминокислотный сиквенс продуктов генов;
- спектр естественных хозяев.

Данный род состоит из трех видов ретровирусов рыб, различающиеся между собой на основе филогенетического разнообразия. В данный таксон включены два предполагаемых вида. С появлением дополнительных данных ретровирус змееголова может быть выделен в отдельный род. Вирус гиперплазии окуней был секвенирован только по гену полимеразы и остается в статусе предполагаемого, пока не будет получена дополнительная информация по сиквенсу. В настоящее время официально зарегистрировано 3 основных и 2 предполагаемых вида.

Род: *Lentivirus*

Типовой вид: *Human immunodificiency virus 1* (HIV-1) вирус иммунодефицита человека 1.

Вирион имеет характерную морфологию, с прямоугольным или конусовидным кором (нуклеотидом). Сборка вириона происходит на клеточной мембране. Молекулярная масса протеинов: MA ± 17 × 10^3; CA ± 24 × 10^3; NC ± 71 × 10^3; PR ± 14 × 10^3; RT ± 66 × 10^3; DU (у всех кроме лентивирусов приматов); IN ± 32 × 10^3; SU ± 120 × 10^3; TM ± 41 × 10^3. Размер генома 9,3 kb; расположение генов: *gag-pro-pol-vif-vpr-tat-rev-vpu-env-nef.* Кроме основных генов *gag-pro-pol-env* присутствуют дополнительные гены (например, для HIV-1: *vif vpr, tat, rev, vpu* и *nej*), продукты которых участвуют в регуляции и синтезе вирусной РНК и других репликативных процессах. У других вирусов могут быть дополнительные гены неструктурных белков (например, у HIV-2: *vpx*). Размер LTR 600 нуклеотидов, 450 нуклеотидов – регион U3, 100 нуклеотидов – R, 80 нуклеотидов – U5.

В состав рода входят экзогенные вирусы (с горизонтальной и вертикальной

передачей) человека и многих других млекопитающих. О существовании родственных эндогенных вирусов сведений нет. Лентивирусы приматов отличаются по использованию хемокинового рецептора, протеина CD4 и по отсутствию DU. Некоторые группы проявляют перекрестную активность по антигенам Gag (лентивирусы овец, коз и кошек). Вирусы, родственные *Feline immunodificiency virus* (FIV) были выделены от других крупных кошачьих (например, *Puma lentivirus),* а наличие антител к антигену Gag у львов и других крупных кошачьих свидетельствует о существовании других вирусов, близких FIV и лентивирусам овец и коз.

Вирусы ассоциируются с различными болезнями, включая иммунодефициты, нейрологические нарушения, артриты и др. Онкоген-содержащие вирусы не обнаружены.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Для подразделения на виды используются следующие критерии:

- нуклеотидный и аминокислотный сиквенс;
- антигенные свойства;
- спектр естественных хозяев;
- патогенность.

На основе различий по спектру восприимчивых хозяев лентивирусы были подразделены на 5 групп (лентивирусы приматов, овец и коз, лошадей, кошек и КРС). Внутри группы лентивирусов приматов HIV-1 отличается от HPV-2, прежде всего по дивергенции нуклеотидных сиквенсов, которая превышает 50 %, и по наличию у HIV-2 гена *vpx.* Показана ограниченная перекрестная реактивность в ELISA на основе Gag-антигенов; по продукту гена *env* перекрестной активности нет. В настоящее время официально зарегистрировано 10 видов.

Род: *Sputavirus*

Типовой вид: *Chimpanzee foamy virus* (CFV) (пенящий вирус шимпанзе).

Характерные особенности. Вирион имеет характерную морфологию, со слабозаметными поверхностными выступами и центральным неплотным ядром. Сборка капсида происходит в цитоплазме, после чего он отпочковывается в эндоплазматическую сеть или через плазматическую мембрану. Для почкования капсида не-

обходим протеин Env. Нет сведений о разрезании в инфекционном вирионе протеина-предшественника Gag до субъединиц MA, CA, NC. Молекулярная масса протеинов: Gag-предшественник ± 74 × 10^3 N-концевой продукт разрезания Gag± 70 × 10^3; Pol-предшественник ± 127 × 10^3; RT ± 80 × 10^3; IN ± 40 × 10^3; Env-предшественник ± 130 × 10^3; SU ± 80 × 10^3; TM ± 48 × 10^3; Itas/Bel ± 35 × 10^3; Bet (Bel-l/Bel-2 fusion protein) ± 60 × 10^3; Env-Bet fusion protein ± 170 × 10^3. Размер генома 11,6 kb; расположение генов: *gag-pro-pol-env-tas-bet, Tas* является ДНК-связывающим протеином с трансактиваторной функцией. Функции другого дополнительного протеина не известны. Размер LTR 1770 нуклеотидов, 1400 нуклеотидов –регион U3, 200 нуклеотидов – R, 150 нуклеотидов – U5. У вирусов КРС и кошек размер соответствует от 950 до 1000 нуклеотидов. Спумавирусы могут использовать два сайта начала транскрипции: R a LTR и внутренний промотор (IP), расположенный выше дополнительных рамок считывания в гене *env.* Активность обоих промоторов зависит от Tas. Другим важным критерием отличия спумавирусов от представителей других родов семейства *Retroviridae* – экспрессия протеина Pol со сплайсированной субгеномной мРНК и присутствие в вирионе большого количества обратнотранскрибированной ДНК.

Вирусы распространены повсеместно, экзогенные вирусы найдены у многих млекопитающих. Естественного инфицирования людей не зарегистрировано, отмечались редкие случаи заражения людей от нечеловекообразных обезьян. Есть данные о существовании родственных (но не близких) эндогенных вирусов. Многие изоляты вызывают характерную «пенистую» цитопатологию в культуре клеток. Болезней, ассоциированных со спумавирусной инфекцией, не отмечается. Онкоген-содержащих вирусов не обнаружено.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Для подразделения на виды используются следующие критерии:

- нуклеотидный и аминокислотный сиквенсы;
- спектр естественных хозяев.

В настоящее время официально зарегистрировано 5 видов.

14.2 РНК-содержащие вирусы

14.2.1 Семейство: *Reoviridae*

Род: *Orthoreovirus, Orbivirus, Rotavirus, Coltivirus, Aquareovirus, Cypovirus, Fijivirus, Phytoreovirus, Oryzavirus*

Характеристика вириона. Вирион икосаэдральной симметрии, но может выглядеть сферическим. Состоит из капсида, сформированного концентрическими протеиновыми слоями, в виде 1 – 3 четких капсидных чехлов, имеющих внешний диаметр от 60 нм до 80 нм. Вирусы девяти родов можно подразделить на две группы. Одна группа содержит вирусы, интактные вирусные частицы (или коры) которых содержат относительно большие выступы (spikes) или «башенки», расположенные на 12-ти вершинах экосаэдра (включая *Orthoreovirus, Aquareovirus, Cypovirus, Fijivirus, Oryzavirus* и, как и большинство неклассифицированных вирусов беспозвоночных). Вторая группа включает роды, вирусы которых имеют ровные или почти сферические вирионы и кор без крупных поверхностных выступов по вершинам (*Orbivirus, Rotavirus, Coltivirus, Phytoreovirus*).

Важно отметить, что номенклатура для описания вирусных частиц с различным числом интактных капсидных слоев варьирует у разных родов, хотя данная номенклатура может использоваться в любом случае. Транскрипционно активные коровые частицы вирусов, имеющих выступы, имеют только один полный капсидный слой (с симметрией T = 2), к которому прикрепляются выступы (спайки – spikes). У интактных вирусных частиц кор обычно окружен неполным протеиновым слоем (с симметрией T = 13), который перфорирован спайками, и образует внешнее капсидное покрытие. Поэтому, вирусные частицы обычно выглядят имеющими двухслойный чехол. Исключение составляют cypoviruses, имеющие вирион только с одной капсидной оболочкой, эквивалентной «коровой» частице вирусов других родов. У вирусов рода *Cypovirus* транскрипционно активная частица с одной оболочкой является интактным вирионом, хотя характерным является то, что частицы некоторых cypovirases могут смыкаться внутри матрикса протеиновых кристаллов, называемых

полиэдрами (polyhedra), которые образованы более чем на 90 % вирусным протеином – «полиэдрином». В противоположность этому, вирусы с гладким кором содержат субкор, который может быть относительно хрупким, с полным протеиновым чехлом (T = 2), который усилен у транскрипционно активных коровых частиц полным слоем коровой оболочки (T = 13). Такие дважды покрытые коровые частицы, не имеют поверхностных выступов (спайков) и в интактном вирионе окружены внешним капсидным чехлом, приобретая вид частиц с тремя слоями оболочки. Самый внутренний протеиновый чехол вирусного капсида имеет диаметр от 50 нм до 60 нм и окружает 1042 геномных сегментов, представленных линейными двуспиральными РНК. Для вирусов с гладким кором характерно то, что энзиматически активные минорные протеины вириона также расположены внутри центрального пространства, и прикреплены к внутренней поверхности (с пятиосевым типом симметрии) (включая РНК-зависимую РНК полимеразу (транскриптазу и редуктазу), NTPase, хеликазу, кэпирующие и трансметилазные энзимы). Для вирусов, имеющих кор с выступами, некоторые из протеинов-энзимов формируют «башенки» на поверхности кора. Выступы, имеющие внутри полость, используются как каналы для выхода образующихся мРНК, синтезируемых энзимами, связанными с кором.

Частицы вирусов, принадлежащих разным родам, могут покидать инфицированную клетку почкованием *(Orbivirus)* или почковаться внутрь эндоплазматического ретикулума *(Rotavirus),* приобретая мембранную оболочку, клеточного происхождения, хотя во многих случаях оболочка сохраняется не долго. У вирусов некоторых родов протеины внешнего капсида могут быть модифицированы протеазами (такими как трипсин и химотрипсин), что приводит к образованию «инфекционных» или «промежуточных субвирусных частиц». Такие изменения могут привести к изменению параметров частицы, определяющих прикрепление и проникновение в клетку.

Диаметр вириона от 60 нм до 80 нм; Mr 120×10^3; плавучая плотность в CsCl от 1,36 г/см^3 до 1,39 г/см^3. Вирусные частицы умеренно резистентны к нагреванию, органическим растворителям (например, эфиру) и неионным детергентам. Стабильность при различных значениях pH у представителей разных родов различна.

Геном. РНК: двуспиральная, линейная, сегментированная (10-12); от 15 % до 20 % сухой массы вириона. Mr отдельных молекул РНК составляет от 0,2 × 10^6 до 3,0 × 10^6, всей РНК – от 12 × 10^6 до 20 × 10^6. Вирион содержит позитивные и негативные цепи РНК в равных пропорциях – одна копия каждого сегмента на вирион. Интактные вирионы некоторых видов содержат также значительное количество коротких односпиральных РНК. Позитивные цепи каждого дуплекса кэпированы по 5'-концу (структура типа 1). Обе цепи РНК имеют 3'-ОН, и вирусные мРНК не имеют 3'-поли-А.

Другие компоненты вириона. Протеины составляют от 80 % до 85 % сухого веса вириона. Размер протеинов варьирует по Mr от 15 × 10^3 до 155 × 10^3. Структурными компонентами вириона являются три мажерных капсидных протеина (СР) и некоторые из минорных протеинов. Не менее трех внутренних вирусных структурных протеинов составляют полимеразу и другие ассоциированные энзимы, участвующие в процессе синтеза мРНК и кэпировании (включая полностью консервативную dsRNA-зависимую ssРНК полимеразу (транскриптазу), нуклеотидфосфогидролазу, гуанилинтрансферазу, две трансметилазы и dsRNA-хеликазу).

Зрелый вирион не содержит липидной оболочки. В зависимости от рода миристиловые остатки могут быть ковалентно связаны с одним из вирусных протеинов. Для рота- и орбивирусов характерно приобретение липидной оболочки на промежуточной стадии морфогенеза или при выходе из клетки, которая впоследствии теряется.

У вирусов некоторых родов, один из поверхностных протеинов, а также мелкие неструктурные вирусные протеины могут быть гликозилированы.

Организация генома и репликация. Вирусные РНК в основном моноцистронные, хотя некоторые сегменты имеют второй функциональный инициирующий кодон или другие ORFs. Протеины кодируются только на одной цепи (мРНК) каждого дуплекса. Проникновение вируса в клетку различается у представителей разных родов, но обычно является результатом потери компонентов внешнего капсида. Транскрипционно активные родительские вирусные частицы (коры) высвобождают-

ся в цитоплазму клеток. Повторяющаяся асимметричная транскрипция полноразмерных мРНК каждого сегмента dsRNA (двуспиральной РНК) происходит внутри этих частиц. Продукты мРНК, образующиеся в большом количестве с меньших сегментов, выводятся через вершины икосаэдральной частицы. Структуры, обозначаемые виропластами или вирусными тельцами-включениями, встречаются в отдельных областях цитоплазмы, являющихся местами репликации и сборки вновь образуемых вирусов. При электронно-микроскопическом исследовании виропласты выглядят гранулярными средней электроноплотности и могут содержать вновь образующиеся вирусные частицы. Компоненты внешнего капсида приобретаются на периферии виропластов.

Механизм синтеза и ассемблирования генома изучен недостаточно. Относительно ортореовирусов показано, что кэпированные мРНК и определенные NS протеины инкорпорируются внутрь «комплекса», считающегося предшественником будущих вирусных частиц. Затем мРНК используется в качестве матрицы для одного раунда синтеза негативной цепи, с образованием сегментов dsRNA. Разные мРНК находятся в цитоплазме в разных соотношениях. Однако dsRNA геномные сегменты обычно упаковываются в точном эквимолярном соотношении (одна копия каждого геномного сегмента в одной частице). Сегменты РНК имеют консервативные терминальные последовательности по обоим концам, которые используются как сигналы распознавания для РНК транскриптазы или репликазы. Эти сиквенсы также могут иметь значение для селекции и инкорпорирования РНК внутрь новых частиц. Для одного рода описано, что РНК зрелых частиц упаковывается в виде серии концентрических и высокоорганизованных чехлов (shells), с элементами икосаэдральной симметрии.

Кроме родительских субвирусных частиц (коров), вновь образованные коры также синтезируют мРНК, обеспечивая этап амплификации и репликации. В зависимости от рода, некоторые протеины NS участвуют в транслокации вирусных частиц внутри клетки и их выходе. Многие cypoviruses формируют также полиэдры, являющиеся крупными кристаллическими протеиновыми матрицами, включающими вирусные частицы, и участвующими в трансмиссии между отдельными насеко-

мыми-хозяевами. Этапы морфогенеза и высвобождения вируса зависят от рода. Реассортация сегментов генома происходит легко в клетках, коинфицированных вирусами одного вида.

Антигенные свойства. Вирусы позвоночных имеют групповые или серогрупповые (видоспецифические) антигены, а внутри каждой серогруппы – более вариабельные серотип-специфические антигены. Вирусы насекомых и растений могут проявлять меньшую вариабельность по протеинам, вероятно из-за отсутствия антитело-опосредованного селективного прессинга. Между родами антигенного родства не установлено. Некоторые вирусы обладают гемагглютинирующими свойствами.

Биологические особенности. Биологические особенности вирусов зависят от их родовой принадлежности. Некоторые вирусы репродуцируются только в определенных видах позвоночных и передаются между хозяевами алиментарно или аэрозольно. Другие вирусы позвоночных (орби- и колтивирусы) реплицируются как в позвоночных, так и в беспозвоночных (москиты, клещи, комары и др.). Вирусы растений реплицируются как в растениях, так и в членистоногих (векторах). Вирусы патогенные для насекомых (cypoviruscs) передаются контактно или алиментарно.

Критерии подразделения на виды внутри семейства. Главным критерием для включения вирусного изолята в тот или иной вид внутри семейства является способность к реассортации сегментов генома во время коинфекции. Однако прямых свидетельств реассортации сегментов генома между разными вирусными штаммами недостаточно, поэтому для анализа родства, сходства и различий используются другие методы: идентификация естественных хозяев и векторов, клиническое проявление, серологические особенности, сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных сиквенсов, перекрестная гибридизация РНК и кДНК, анализ консервативных областей генома, определение серотипа, определение электрофоретипа (анализ профиля миграции сегментов генома при электрофоретическом разделении), амплификация консервативных областей с использованием ПЦР (с последующим анализом продуктов в перекрестной гибридизации, рестрикционном анализе и секвенированием).

Миграция dsRNA геномных сегментов при электрофорезе в полиакриламид-

ном геле (PAGE) сильно зависит от первичной структуры и Mr молекул. Однако миграционные характеристики при электрофорезе в агарозном геле (AGE) зависят только от Mr. Поэтому последний вариант может быть более удобным для идентификации и дифференциации вирусных видов с использованием электрофоретипирования, тогда как PAGE более чувствителен и может быть использован для более тонкой дифференциации между штаммами внутри одного вида.

Род: *Orthoreovirus*

Типовой вид: *Mammalian orthoreovirus* (MRV)

Характерные особенности. Инфицируют только позвоночных, распространяются аэрозольным и алиментарным путями. Все члены рода имеют: 1) хорошо определяемую, при негативном контрастировании, капсидную структуру; 2) 10 сегментов dsRNA, представленных тремя крупными (L), тремя средними (M) и четырьмя мелкими (S) сегментами; 3) характерный протеиновый профиль с тремя X первичными продуктами трансляции; 4) 1-2 дополнительных очень мелких протеинов, кодируемых полицистронным геномным сегментом; 5) все члены двух вторых подгрупп индуцируют образование синцития.

Морфология. Вирион икосаэдральной симметрии, но может выглядеть сферическим, имеет двойную протеиновую капсидную оболочку. Криоэлектронная микроскопия на примере MRV и ARV показала следующее строение вириона. Вирион состоит из центральной части (диаметр 48 нм), содержащей сегменты dsRNA, и внешнего капсида (диаметр 85 нм), имеющего икосаэдральную симметрию (T = 13). Поверхность вириона покрыта 600 пальцевидными выступами (отростками, длиной 10 нм), организованными в 60 гексамерных и 60 тетрамерных кластеров, которые окружают каналы (диаметром от 5 нм до 8 нм), радиально проникающие через внешний капсидный слой и достигающие центральной полости. Интактные вирионы содержат большие открытые углубления, имеющие форму цветка (пятичленного), придающего капсиду при трехмерном анализе угловой профиль. Промежуточные субвирусные частицы (ISVP), образующиеся при частичном удалении внешних капсидных протеинов, имеют диаметр примерно 80 нм. Цветкообразные структуры могут включать увеличенную форму протеина ol, участвующего в прикреплении к

клетке, расположенного по вершинам в виде спайка длиной 40 нм. Коровые частицы, образуемые при более значительном удалении внешних капсидных протеинов, имеют на своей поверхности 150 эллипсоидных узелков и своеобразных «башенок», расположенных на пятиугольных вершинах.

Мг(вириона) 130×10^6, плавучая плотность в CsCl 1,36 г/см^3 (1,38 г/см^3 – для ISVPs, 1,43 г/см^3 – для коровых частиц). Вирионы достаточно стабильны при сильных ионных воздействиях, температуре до 55 °С, значениях pH от 2 до 9, воздействии жирорастворителей и детергентов. УФ облучение снижает инфекционность.

Геном. 10 сегментов линейных двуспиральных РНК, Mr от $0,6 \times 10^6$ до $2,6 \times 10^6$. По анализу подвижности в геле сегменты были подразделены на три группы: L (L1-L3; от 3,8 kbp до 3,9 kbp), M (M1-M3; от 2,2 kbp до2,3 kbp) и S **(**S1-S4; от 0,9 kbp до 1,6 kbp).

Полная вирусная частица содержит многочисленные олигонуклеотиды (длиной от 2 до 20 оснований), составляющих примерно 25 % общего содержания РНК, три четверти которых представляют собой абортивные повторяющиеся 5'-концевые транскрипты, образованные кор-ассоциированными транскриптазой и кэпирующими ферментами, тогда как остальное составляют олигоаденилаты. Геномные РНК не имеют поли-А, и не содержат ковалентно связанных протеинов

Протеины. Структурные протеины ортореовирусов обозначаются в соответствии с их относительной массой и классом. Стабилизированная структура внешнего капсида состоит из 200 тримеров продуктов разрезания протеина u1 (Mr 76×10^3, после разрезания – Mr 72×10^3 и Mr 4×10^3). Пентамерные субъединицы протеина X2 формируют цветкообразные структуры и «башенки» по вершинам вириона и кора. Структуры протеина X1 взаимодействуют с тетрамерными субъединицами протеина a3 и с протеином рЛС, составляя основу внешнего капсида. Протеин X2 связан с кором вириона. Четвертый компонент внешнего капсида протеин c1, представлен в виде 12 гомотримеров, связанных с вершинами вириона. Протеины X1 и a2 (по 120 копий каждый) представляют собой мажерные структурные протеины внутреннего капсида и взаимодействуют с геномом (обладают способностью связывать

dsRNA (двуспиральные РНК). Два структурных протеина вируса Х3 и ц2 представлены в вирионе 12-ю копиями, расположенными внутри внутреннего капсида. Протеин Х3 формирует отростки длиной 7 нм, простирающиеся по направлению внутренней части кора, и образующие нижележащий слой 12-ти вершин капсида. Протеин ц2, вероятно, связан со структурами протеина Х3.

Организация генома и репликация. Геном представлен 10 сегментами dsRNA, упакованных в эквимолярном соотношении (одна копия сегмента на вирион). Сегменты содержат терминальные NTRs, которые короче по 5'-концам (соответственно от 12 bp до 32 bp и от 35 bp до 38 bp для MRV-3). Большинство сегментов имеют мажерную ORF (от 353 до 1298 кодонов). Один геномный сегмент полицистронный, содержит более чем одну функциональную ORF.

Полный процесс инфекции включает адсорбцию, проникновение и раздевание коровых частиц (зависящие от низких pH), асимметричную транскрипцию кэпированных неполиаде-нилированных мРНК (с использованием консервативных механизмов – новая цепь смещается), трансляцию, ассемблирование плюс-цепей внутрь новых субвирусных частиц, переход плюс-цепи в двуспиральную РНК и дальнейшие раунды транскрипции и трансляции мРНК. Финальная стадия репликативного цикла включает ассемблирование внешнего капсида и новых субвирусных частиц, с образованием инфекционных вирионов. Такие частицы скапливаются в виде паракристаллов в перинуклеарных участках ядерной цитоплазмы и высвобождаются после лизиса клетки. Подгруппы 2 и 3 (ARV. BRV и NBV) образуют мультиядерный синцитий (через 10-12 часов от начала инфекции).

Антигенные свойства. Серотип-специфическим антигеном ортореовирусов, взаимодействующим с нейтрализующими антителами является протеин ст1. На основе этих антигенов различают 3 серотипа MRV и 5-11 серотипов ARV. Протеины MRV ст1 нст1s проявляют штаммовую специфичность и перекрестную цитотоксическую l'-клеточную активность. Протеины MRV Х2 и а3 являются группоспецифическими антигенами, аналогичными протеинам ARV Х2В и ст2/стВ. Гомология по сиквенсу отмечается только между штаммами внутри вида. Наиболее сильное антигенное сходство показано в отношении ARV и NBV.

Биологические особенности. Распространяются алиментарно и аэрозольно; членистоногих переносчиков нет. Отмечается специфичность по отношению к естественным хозяевам (бабуины, летучие мыши, птицы, КРС, человек, обезьяны, овцы, свиньи, змеи). Распространены повсеместно. Ортореовирусы человека, как правило, авирулентны, но могут вызывать заболевания верхних дыхательных путей и энтериты у детей. У мышей ортореовирусные инфекции сопровождаются диареей, замедлением развития, синдромом жирных волос, гепатитами, желтухами, миокардитами, миозитами, пневмониями, энцефалитами и неврологическими симптомами. У домашних животных инфекция сопровождается поражением дыхательных путей и диареями. У обезьян инфекция проявляется развитием гепатита, билиарной атрезии, менингитов, некрозов эпендимы и эпителиальных клеток хороидального сплетения. Изолят BRV был выделен от бабуинов с менингэнцефаломиелитом, а изоляты от змей – от животных с признаками неврологических расстройств. Птичьи ортореовирусы не инфицируют млекопитающих. Исход болезни у птиц варьирует от инаппарантной формы, до летального, что зависит от штамма вируса и возраста птицы. При развитии системной инфекции вирус выделяется из многих тканей. У цыплят болезнь проявляется нарушением оперения, гастроэнтеритами, гепатитами, миокардитами, пневмониями, потерей веса, слабым ростом, гибелью. У индеек ортореовирусная инфекция проявляется в виде энтеритов. У птиц, перенесших острую системную инфекцию, развивается теносиновит, напоминающий патологию ревматоидного артрита у людей.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Ортореовирусы включают 4 вида и 2 неклассифицированных вируса. Определяющим критерием для классификации по видам является прямое доказательство обмена генетическим материалом путем реассортации сегментов генома. На данный момент нет сведений о реассортации между четырьмя видами.

Представители данного рода могут быть идентифицированы по следующим признакам:

- способность к обмену генетическим материалом путем реассортации сегментов генома во время коинфекции, продуцируя жизнеспособные вирионы;

- идентификация консервативных терминальных сиквенсов геномных РНК внутри вида (абсолютная консервативность от 4 bp до 8 bp 5'- и 3'-концов);
- идентификация идентичности сиквенсов между протеинами, кодируемыми гомологичными геномными сегментами (более 85 % идентичности по аминокислотам внутри вида и 65 % – между видами);
- идентификация идентичности сиквенсов между гомологичными сегментами генома (более 75 % идентичности внутри вида и 60 % – между видами);
- идентификация серотипа вируса (на основе перекрестной нейтрализации) с вирусным типом, уже классифицированным в качестве вида данного рода;
- демонстрация широкого антигенного сходства по мажерным структурным протеинам внутри вида, с использованием ELISA и иммунопреципитации;
- анализ электрофоретипа с помощью AGE, но не PAGE (некоторое сходство может быть между близкородственными видами);
- сходная организация полицистронных геномных сегментов;
- идентификация хозяина и клинические признаки.

На основе анализа аминокислотных сиквенсов протеина ст2 (мажерный, внутреннего капсида) 4 вида ортореовирусов можно подразделить на 3 подгруппы. Подгруппа 1 включает все нефузогенные изоляты MRV, представленные одним видом MRV и подразделяемые на серотипы. Подгруппу 2 составляют два вида, представленных многочисленными изолятами ARV, выделенными от промышленной птицы (включая несколько серотипов), и NBV (выделенным только однажды от летучих лис). Аминокислотная идентичность по протеину класса S между этими двумя видами составляет от 40 % до 60 %, идентичность по гомологичным протеинам между подгруппами составляет от 20 % до 30 %, между изолятами внутри вида – 90 %. Два данных вида, образующих синцитий, более близки в антигенном отношении между собой, чем по отношению к другим видам, обладают сходным консервативным концевым сиквенсом сегментов генома и проявляют сходство в организации полицистронного, индуцирующего слияние (fusion-inducing), геномного сегмента S1. По сиквенсной дивергенции и неспособности к реассортации изоляты ARV и NBV под-

разделяются в отдельные виды в пределах одной подгруппы.

Третья подгруппа представлена одним видом BRV. Этот изолят также вызывает образование синцития, но имеет небольшое сходство по сиквенсу (от 20 % до 30 %) и антигенным свойствам с другими фузогенными видами. BRV также содержит полицистронный геномный сегмент S4, эквивалентный сегменту S1, с отличающейся организацией гена, протеин слияния, не имеющий сходства с аналогом ARV и NBV, и уникальный консенсусный сиквенс по 5'-концу.

Два неклассифицированных вируса, выделенных от змей, также способные индуцировать слияние клеток, но не имеющие электрофоретического профиля геномного сегмента, сходного с таковым у ARV и BRV. Ndelle virus (NDEV) ранее обозначался как неклассифицированный орбивирус, однако анализ генома показал высокую степень гомологии с MRV, как минимум, по четырем геномным сегментам. В настоящее время официально зарегистрировано 4 основных и 3 предполагаемых вида.

Род: *Orbivirus*

Типовой вид: *Bluetongue virus* (BTV) (вирус блютонга).

Характерные особенности. Вирион имеет капсид без особых характерных признаков. Геном представлен 10 сегментами двуспиральной РНК. Коровью частицы имеют характерные кольцевидные капсомеры. Репликация сопровождается продукцией вирусных «трубочек» (tubules) и вирусных телец-включений; мажерный внешний коровый протеин (VP7(T13)) может формировать в цитоплазме клеток плавучие гексагональные кристаллы.

Распространение вируса происходит с участием различных кровососущих членистоногих.

Морфология. Вирион BTV икосаэдральной симметрии, но может выглядеть сферическим; диаметр 80 нм; коровые частицы имеют максимальный диаметр 73 нм, субкор имеет максимальный диаметр 59 нм и внутренний диаметр 46 нм. Зрелый вирион не имеет липидной оболочки. Выход из клетки осуществляется через плазматическую мембрану, при этом может формироваться липидная оболочка, которая вскоре теряется. Неочищенные вирионы часто ассоциируются с клеточными

мембранами. При обычной электронной микроскопии поверхность вириона неразличима, однако внешний капсид имеет определенную структуру икосаэдральной симметрии и парусообразные («sail» – shaped) поверхностные выступы, которые могут быть обнаружены на вирионе, сохранившем структуру (например, при использовании криоэлектронной микроскопии). При удалении внешнего капсидного слоя можно различить поверхностный слой коровой частицы, который полностью состоит из капсомеров VP7(T13), организованных в виде гексамерных колец (пентамерных – по пятигранным вершинам). Эти кольца, легко различимые с использованием обычной электронной микроскопии, и послужили основой для названия рода. Коровые частицы также содержат полный внутренний капсидный чехол (подкоровый слой), который окружает 10 геномных сегментов dsRNA. Минорные коровые протеины (транскриптазный комплекс) прикреплены к внутренней поверхности субкора по пятиосной симметрии. Сборка субкорового слоя определяет конечный размер и симметрию частицы.

Mr (вирион) 108×10^6, Mr (кор) 67×10^6; плавучая плотность в CsCl 1,36 г/см^3 и 1,40 г/см^3 (для вириона и кора, соответственно). Инфекционность вирионов стабильна при pH от 8 до 9, но резко снижается при значениях pH, выходящих за рамки от 6,5 до 10,2. Чувствительность внешних капсидных протеинов к воздействию катионов (например, MgCb, CsCl) зависит от pH среды и штамма. При pH ниже 5,0 вирионы и коры разрушаются. За исключением ортореовирусов, при pH 3,0 инфекционность вируса утрачивается. В пробах крови, сыворотки или альбумина, при температуре не выше 15 °C, вирус может сохраняться в течение десятилетий. Очищенные вирионы BTV в 0,1 M Tris / HCl pH 8, при температуре 4 °C сохраняют активность в течение года. Кристаллы коровых частиц очень стабильны при температуре 29 °C. При нагревании до 60 °C инфекционная активность вируса резко падает. В целом орбивирусы относительно резистентны к воздействию растворителей и детергентов, хотя к отдельным детергентам чувствительность отдельных вирусов может различаться. Додецилсульфат натрия разрушает частицы. Замораживание может приводить к снижению инфекционности вируса на 90 % в основном за счет разрушения частиц. Однако при однократном замораживании и хранении при минус

70 °C инфекционность вируса сохраняется.

Геном. 10 сегментов линейных двуспиральных РНК, имеющих Mr от $0{,}6 \times 10^6$ до $2{,}6 \times 10^6$. Общая Mr генома MRV-3 около 15×10^6 (23549 bp); 12 % и 19,5 % сухой массы вириона и кора, соответственно. Геномная РНК упаковывается в виде серий упорядоченных концентрических чехлов внутри VP3(T2) слоя субкора. Четыре слоя РНК, каждый из которых имеет элементы икосаэдральной симметрии, может быть выявлен в коре BTV методом кристаллографии (рентгеновскими лучами). Внутри центрального пространства субкора молекулы dsRNA ассоциируются с плотной белковой субстанцией по вершинам пятиосной симметрии (вершинам икосаэдрона). Геномная РНК содержит 5'-концевую структуру Cap 1.

Размер сегментов генома вируса блютанга варьирует от 822 bp до 3954 bp (общий размер 19,2 kbp, общая Mr $13{,}1 \times 10^6$). Короткие олигонуклеотиды внутри зрелых вирионов не обнаружены. Геномные РНК обозначаются сегментами 1-10 в соответствии с повышением электрофоретической подвижности в 1 % агарозном геле и в соответствии со снижением молекулярного веса. Например, для вируса блютанга сегменты подразделены по подвижности на три класса: 3 крупных (от 1 kbp до 3 kbp; от 3,9 kbp до 2,8 kbp), 3 средних (от 4 kbp до 6 kbp; от 2,0 kbp до 1,6 kbp) и 4 малых сегмента (от 6 kbp до 10 kbp; от 1,2 kbp до 0,8 kbp). В сегментах генома, проанализированных на данный момент, выявлены только по одной ORF, которые всегда на одной и той же цепи. Однако ORF может иметь более одного функционального кодона инициации трансляции по 5'-концу.

Для BTV-10 5'-NTR варьирует от 8 bp до 34 bp, тогда как по 3'-концу они составляют от 31 bp до 116 bp. У других вирусов данная область также короче по 5'-концу, относительно 3'-конца. У BTV NTRs включают терминальные последовательности в 6 bp, которые идентичны у всех 10 сегментов РНК, и консервативны у разных изолятов BTV. Другие орбивирусы имеют похожие сиквенсы, но которые не всегда идентичны и не всегда консервативны для всех 10 сегментов.

Другие компоненты вириона. Определено 7 вирусных структурных протеинов (VP1-7), составляющие 80,5 % сухого веса вириона.

РНК-зависимая РНК полимераза внешний слой внешнего капсида, определяет серотип вируса, участвует в прикреплении к клетке, определяет вирулентность, легко разрезается протеазами. Наиболее вариабельный протеин. Реагирует с нейтрализующими антителами. Тример формирует внутреннюю основу протеинового капсидного чехла, симметрия T = 2, определяет конечный размер и структуру капсида, связывает РНК, взаимодействует с минорными внутренними протеинами. Димер, трансметилаза 1 и 2, кэпирующий энзим (гуанилтрансфераза). В цитоплазме образует трубочки, функция которых не ясна. Характерно для репликации орбивирусов. Образует внутренний слой внешнего капсида, гликозилирован, частично определяет серотип вируса, вариабельный, тример.

Тример, образует внешнюю поверхность кора, симметрия T = 13, у некоторых видов (AHSV) образует гексагональные кристаллы, участвующие в проникновении в клетку и поддержании инфекционности коровой частицы в клетках насекомых-переносчиков, взаимодействует с антителами, нейтрализующими кор, иммунодоминантны R видоспецифический антиген. Участвует в образовании матрикса телец-включений, связывает ssRNA, фосфорилирован. Может быть ассоциирован с внешним капсидом. Связывает ss- и dsRNA, хеликаза, NTPase.

Гликопротеины, мембранные протеины, участвуют в выходе из клетки. У некоторых видов (AHSV) являются вариабельными протеинами и определяют вирулентность.

У BTV внешний капсидный протеин представлен 180 копиями; парусообразный протеин VP2, представленный 360 копиями расположен ниже протеина VP5 (Mr 59×10^3), который организован в 120 тримеров. VP2 и VP5 соприкасаются с VP7 (T = 13). Поверхность коровой частицы образована 780 копиями протеина VP7, которые организованы в сеть гекса- и пентамерных колец. Ниже расположен субкоровый капсидный чехол, образованный 120 копиями протеина VP3, организованного по T = 2 симметрии. VP3 (T2) капсидный чехол окружает 10 двуспиральных сегментов генома и три структурных минорных протеина (VP1 (Pol, Mr 150×10^3), являющийся РНК полимеразой; VP4 (Cap, Mr 76×10^3), образующий функциональные ди-

меры, обладающие активностью гуанилинтрансферазы и трансметилазы 1 и трансметилазы 2); и VP6/VP6a (Hel, Mr 36 × 10^3), связывающий РНК и обладающий протеазной и хеликазной активностью).

Различают 3 неструктурных протеина. Протеин NS1 (TuP, Mr 64 × 10^3) образует в клетках трубочки разлитой длины (до 4 мкм), функция которых не ясна, но которые являются характерными при орбивирусных инфекциях. Протеин NS2 (VP, Mr 41 × 10^3) является компонентом матрикса сборки и репликации. Протеины NS3/NS3a (Mr 25 × 10^3 и 24 × 10^3) участвуют в высвобождении вирусных частиц из клетки.

Организация генома и репликация. Сегменты генома BTV, в соответствии с профилем миграции в 1 %-ной агарозе, обозначаются следующим образом: Сегмент 1-VP1 (Pol); Сегмент 2-VP1; Сегмент 3-VP3 (T2); Сегмент 4-VP4 (Cap); Сегмент 5-NS1 (TuP); Сегмент 6-VP5; Сегмент 7-VP7 (T13); Сегмент 8-NS2 (ViP); Сегмент 9-VP6/VP6a (Hel); Сегмент 10-NS3/NS3a. Родственные гены разных штаммов BTV сходны.

Для адсорбции вируса используются компоненты внешнего капсида, хотя для проникновения в клетку может быть использован VP7(T13). VP2 (вероятно также и VP5) является определяющим вирулентность. Внешний капсидный слой теряется во время ранних стадий репликации. Транскрипционная частота мРНК отдельных геномных сегментов различна; с меньших сегментов синтезируется больше копий. Вирусные тельца-включения считаются местом морфогенеза транскрипционно активных вирусных коров, содержащих dsRNA. Наименьшие частицы, содержащие РНК, обнаруживаемые в тельцах-включениях, представляют собой вновь образованные субкоровые частицы. Внешний коровый протеин VP7(T13) добавляется в тельца-включения и внешний капсидный протеин. Вирусные частицы транспортируются внутри клетки благодаря специфическому взаимодействию с клеточным цитоскелетом, и могут покидать клетку до ее лизиса за счет взаимодействия с мембранно-связанным протеином NS3. Отмечена специфическая ассоциация между трубочками, образованными протеином NS1, и зрелыми вирионами в цитоплазме

клетки. В клетках млекопитающих, репликация орбивирусов приводит к выключению синтеза белков клетки и обычно заканчивается лизисом клетки и высвобождением вирусных частиц. У персистентно инфицированных клеток насекомых не наблюдается отключения синтеза клеточных белков, лизиса или ЦПЭ. У некоторых видов вирусов (AHSV) протеин NS3 определяет вирулентность. Вирусные частицы могут покидать клетку по двум основным путям: экструзией (разрушение мембраны клетки) и почкованием. В клетках *Culicoides variipennis* (вектора BTV) отмечается только почкование вируса, приводящее к появлению у вирионов мембранной оболочки, которая, однако, нестабильна и быстро теряется. Непрерывное высвобождение вирусных частиц из инфицированных клеток и реинфекция являются характерным признаком орбивирусной репликации.

Антигенные свойства. Основным вирусным серогрупповым (видоспецифичным) антигеном является иммунодоминантный внешний коровый протеин VP7(13). Антитела к данному белку обладают нейтрализующей активностью по отношению к коровым частицам, но не для интактного вириона. Другие вирусные протеины также консервативны между видами вирусов (особенно кор и неструктурные протеины). Однако некоторые белки могут проявлять перекрестную активность с аналогичными белками вирусов других видов (чаще односторонне). Анализ сиквенса РНК консервативных сегментов показал возможность подразделения всех орбивирусов на 4 основные «группы». Первая группа (A) включает AHSV, BTV, EHDV, EEV, EUBV, PALV, WALV и WARV. Вторая группа (B) включает CNUV, IERIV, WMV и GIV. Третья группа (C) включает CORV. Четвертая группа (D) включает WGRV.

Все виды орбивирусов включают несколько серотипов, которые могут быть идентифицированы в реакции нейтрализации интактных вирусных частиц (в первую очередь, через взаимодействие антител с внешними капсидными протеинами). Главным антигеном BTV, участвующим в нейтрализации, является протеин VP2. Протеин VP5 также может быть использован в определении серотипа вируса, вероятно за счет конформационного скрытия протеина VP2. Оба эти протеина (VP2 и VP5) BTV проявляют очень высокую степень антигенной и сиквенсной вариабельности. У других вирусов (GIV) относительный размер внешних капсидных протеи-

нов (VP4 и VP5) очень различен и их роль также может быть различной. Очевидно, что VP2 BTV (особенно в ассоциации с VP5) и VP7(T13) могут быть протективными антигенами.

У AHSV мелкие неструктурные протеины NS3 и NS3 также вариабельны и на основе анализа сиквенсов могут быть подразделены на три группы (а, р и у), Предварительные данные свидетельствуют о слабой перекрестной активности NS3 между этими группами. Данный белок может участвовать в определении вирулентности (AHSV), вероятно в результате своего участия в высвобождении вирусных частиц из клетки (почкование) и последующего дессиминирования вируса.

Биологические особенности. Инфекционность коровых частиц BTV может быть в 1000 раз ниже, чем у интактных вирусных частиц, или совсем отсутствовать, в зависимости от используемой культуры клеток млекопитающих. Однако в некоторых клетках насекомых и взрослых насекомых-векторах инфекционность коровых частиц лишь немного ниже, чем у интактных вирионов. Обработка вирионов трипсином или химотрипсином приводит к образованию инфекционных субвирусных частиц. Такие субвирусные частицы BTV теряют гемагглютинирующую активность, так же как и склонность к агрегированию, но значительно повышают инфекционность по отношению к взрослым насекомым-векторам и некоторым культурам клеток насекомых.

Орбивирусы инфицируют широкий спектр позвоночных, включая жвачных (домашних и диких), однокопытных (домашних и диких), грызунов, птиц, сумчатых, летучих мышей, ленивцев, приматов, и человека. Орбивирусы репродуцируются в членистоногих, которые являются основным фактором их распространения (комары, москиты, клещи, в зависимости от вида вируса). Показана трансстадийная передача у клещей. Может происходить внутриутробное заражение у позвоночных. Орбивирусы, переносчиками которых являются членистоногие с коротким жизненным циклом (комары, москиты, мошки), энзоотичны только в районах, где имаго векторов может существовать большую часть года. Нет сведений о трансовариальной передаче орбивирусов у *Culicoides,* хотя они выделялись из культур клеток, приготовленных из яиц клещей. BTV и EHDV распространены повсеместно между параллелью

50° северной широты и параллелью 30° южной широты в Америке и между 40° северной широты и параллелью 35° южной широты – в остальном мире. Однако очевидно, что вирус персистирует в зимний период без признаков болезни у хозяев. Механизм персистенции у видов позвоночных (естественных хозяев) даже на низком уровне может иметь важное значение. Распространение вирусов также зависит от первичного заноса в районы, где имеются восприимчивые позвоночные и подходящие виды переносчиков. По этой причине, не все серотипы каждого вида (например, BTV) присутствуют в данной местности, где некоторые серотипы эндемичны.

Инфекция орбивирусов у членистоногих не проявляется или проявляется очень незаметно. Инфекция у позвоночных может варьировать от инаппарантной до фатальной, в зависимости от вида вируса и животного-хозяина. Некоторые штаммы BTV вызывают гибель овец, другие – различную патологию, включая геморрагии, хромоту, отеки живота, кратковременный цианоз языка (что дало название вирусу), поражения носа и рта и т.п., тогда как другие не вызывают явной патологии. Инфекция, вызванная BTV, у КРС может не проявляться клинически, но сопровождается длительным вирусоносительством. AHSV, EHDV, EEV могут вызывать серьезную патологию у соответствующих естественных хозяев (позвоночных). Уровень смертности в серологически чистой популяции может превышать 98 % (AHSV).

Критерии подразделения на виды внутри рода. Также как и в отношении представителей других родов семейства, определяющим критерием для классификации по видам является доказательство способности к реассортации генетических сегментов при коинфекции, с образованием жизнеспособного потомства. Однако на данный момент недостаточно сведений о реассортации между изолятами, и в основе методов диагностики отдельных видов (серогрупп) лежат серологические исследования (с использованием иммунодоминантного серогруппового (видоспецифичного) антигена VP7(T13)).

Представители данного рода могут быть идентифицированы на основании следующих признаков:

1 Способность к обмену генетическим материалом путем реассортации сегментов генома во время коинфекции, приводящим к образованию жизнеспособных

вирионов.

2 Высокий уровень серологического перекрестного реагирования в ELISA, или таких методиках, как реакция связывания комплемента, реакция диффузной преципитации (иммунодиффузии в геле), с использованием поли- или моноклинальных антител, специфичных консервативным антигенам, таким как VP7(T13). Например, в конкурентном ELISA, при разведении тестируемых сывороток 1:5, позитивные сыворотки проявляют 50 % ингибицию цветной реакции, тогда как негативные контрольные сыворотки или сыворотки, специфичные другому виду будут проявлять ингибицию менее 25 % в сравнении с контролем. Разные, но родственные виды могут проявлять слабую перекрестную реактивность, которая может быть только односторонней.

3 Высокий уровень сходства сиквенсов РНК консервативных геномных сегментов. Вирусы внутри одного вида проявляют обычно менее 24 % вариабельности по сиквенсу в геномном сегменте 3 (кодирующем мажерный субкоровый структурный протеин VP3(T2)). Вирусы разных видов обычно вариабельны более чем на 26 % по сиквенсу данного участка. Эти различия также отражают аминокислотные сиквенсы вирусных протеинов.

4 Относительно эффективная перекрестная гибридизация консервативных геномных сегментов (которые не кодируют внешние капсидные компоненты, или другие вариабельные протеины) при строгих условиях (более 85 % гомологии) (Northern или dot blot, с зондами, специфичными вирусной РНК или кДНК).

5 ПЦР с использованием праймеров к консервативным участкам генома или сегментам, таким как сегменты 3 и 7. Может сочетаться с анализом перекрестной гибридизации (Northern или dot blot).

6 Идентификация по серотипу вируса с вирусным типом, уже классифицированным в качестве вида данного рода. Серотипы разных видов не способны к перекрестной нейтрализации.

7 Анализ электрофоретипа с помощью AGE, но не PAGE. Вирусы, относящиеся к одному виду проявляют относительно одинаковый электрофоретип. Однако крупные делеции/вставки могут приводить к проявлению разного профиля электро-

форетипа у членов одного вида (например, у EHDV) и некоторое сходство может быть между близкородственными видами.

8 Идентичные консервативные терминальные участки геномных сегментов (некоторые близкородственные виды могут иметь идентичные терминальные сиквенсы по нескольким сегментам).

9 Идентификация общего вектора (переносчика) или вида-хозяина и клинических признаков. Например, BTV переносится только видами *Culicoides* и может инфицировать овец и КРС, с проявлением сильно различающихся клинических признаков, но не инфицирует лошадей. В отношении AHSV все наоборот.

В настоящее время официально зарегистрировано 19 видов.

Род: *Rotavirus*

Морфология. Данные, полученные по ротавирусу обезьян A (simian rotavirus A/SA11 (SiRV-A/SAll)) представляют собой парадигму, по отношению к другим вирусам рода. Зрелый инфекционный вирион имеет внешний диаметр около 100 нм и обладает тремя концентрическими протеиновыми слоями без липидосодержащей оболочки. Внутренний слой, представленный белком VP2, имеет диаметр 51 нм и толщину 3,5 нм. Этот слой сравним с внутренним капсидным слоем вирусов некоторых других родов данного семейства (например, VP3(T2) слой вируса блотанга, который называется у орбивирусов субкором). Слой VP2 окружает вирусный геном и два структурных протеина VPl(Pol) и VP3(Cap), которые организованы в серии 12 энзиматических комплексов, прикрепленные к внутренней поверхности VP2(T2) по пятиосной симметрии. Собранная геномная РНК вместе с энзиматическими комплексами имеют общий диаметр примерно 44 нм и обозначаются как субкор ротавирусов. Однако этот субкор не эквивалентен субкору вирусов других родов (орбивирусов).

Два внешних слоя интактной частицы ротавируса имеют решетчатую структуру поверхности (T13) (levo), икосаэдральную симметрию и уникальный характерный набор из 132 крупных каналов, проходящих через оба слоя, и соединяющих внешнюю поверхность с самым внутренним протеиновым слоем VP2. Средний капсидный слой состоит из 780 копий протеина VP6(T13), организованных в 260 гри-

мерных морфологических единиц, располагающихся трехосно по икосаэдральной решетке. Этот слой образует внешнюю поверхность «двухслойной» частицы (диаметр примерно 70,5 нм) и сравним с одним из капсидных слоев вирусов некоторых других родов внутри данного семейства. Например, коровые частицы орбивирусов имеют внешний коровый слой из 780 копий протеина VP7(T13), который структурно сходен с протеином VP6(TI3) ротавирусов. Самый внешний слой ротавирусного капсида, состоящий из двух протеинов (VP4 и VP7), и необходимый для сохранения инфекционности, имеет приблизительный диаметр 75 нм. Гликопротеин VP7 образует поверхность внешней оболочки и организован в виде тримеров, взаимодействующих с концами тримеров, образованных протеином VP6(T13). Протеин VP4 образует 60 димерных выступов (спаек) длиной примерно 20 нм, которые простираются от поверхности внешней оболочки примерно на 12 нм, давая максимальный диаметр 100 нм. Эти спайки проходят внутрь частицы и могут взаимодействовать с VP7 и VP6, и даже VP2(T2).

Полноценная трехслойная частица ротавирусов имеет плавучую плотность в CsCI 1,36 г/см^3. Инфекционность вируса исключительно зависит от наличия внешнего белкового слоя, целостность чего требует наличия кальция. Этот слой может быть удален при обработке вириона кальций-хелатными агентами (EGTA, EDTA). Инфекционность сохраняется при pH от 3 до 9. Инфекционность относительно стабильна при нагревании до 50 °C, но резко снижается при серии замораживаний-оттаиваний. Инфекционность сохраняется при флюорокарбонной экстракции, обработке растворителями (хлороформ), или неионными детергентами (дезоксихолат натрия). Однако инфекционность теряется при обработке додецилсульфатом натрия (0,1 %) или дезинфектантами (бетапропиолактон, хлорсодержащие агенты, формалин, фенол с 95 % этанолом) которые удаляют внешний чехол. Гемагглютинирующая активность интактных частиц резко падает при 45 °C, в результате замораживания-оттаивания или в результате удаления спайков VP4 при pH 10. У разных штаммов ротавирусов могут быть вариации по физико-химическим характеристикам и стабильности. Например, ротавирус человека не проявляет гемагглютинирующей активности и теряет протеины внешнего слоя гораздо легче, чем другие штаммы. В

исследованиях по реассортации было показано, что это может быть связано с происхождением VP4.

Двухслойные частицы неинфекционны, имеют плавучую плотность в CsCl 1,38 г/см^3. Однослойные частицы могут быть получены при обработке двухоболочечных частиц хаотропными агентами (тиоционат натрия) или высокими концентрациями $CaC1_2$. Однослойные частицы имеют плавучую плотность в CsCl 1,44 г/см^3.

Геном *Rotavirus A* (RV-A) окружен внутренним белковым чехлом. В каждой частице геном представлен одной копией dsRNA каждого из 11 сегментов, которые варьируют по размеру (изоляты RV-A) от 3302 bp до 663 bp и имеют общую длину примерно 18550 bp. Штаммы RV-A при фракционировании PAGE обычно имеют профиль сегментов 4 : 2 : 3 : 2. Сегменты генома нумеруются с 1 по 11 в соответствии с мобильностью в PAGE. Однако даже у RV-A мобильность сцепленных сегментов (чаще от 7 до 9) может различаться. У других ротавирусов отклонения от соотношения профиля мобильности могут быть связаны с наличием дополнительного сегмента (1800 bp), включенного в вирион, в виде частично дуплицированных геномных сегментов. РНК генома имеет богатый A+U состав (от 58 % до 67 %). Сегменты полностью спарены, и позитивная цепь содержит 5'-концевую кэповую структуру, но не имеет сигнала полиаденилирования по 3'-концу. По сравнению с ортореовирусами, вирионы ротавирусов не содержат одноцепочечных олигонукдеотидов. Выявлено два уровня консервативности концевых сиквенсов у изолятов RV-A. Первый – все геномные сегменты имеют короткие консервативные 5'- и 3'-концы (10 и 8 нуклеотидов, соответственно). Непосредственно после этих участков по направлению внутрь цепей расположен второй консервативный регион (30-40 нуклеотидов), который специфичен для конкретного сегмента генома. Длина 5'-NTR различается, но все меньше 50 нуклеотидов и во всех сегментах предшествуют, как минимум, одной ORF, после первых AUG. Некоторые сегменты содержат дополнительные ORFs внутри рамки (гены 7, 9, 10) или вторую ORF (ген 11), но только в случае генов 9 и 11 они дают более чем один первичный продукт трансляции (т.е. моноцистронные) с каждого геномного сегмента. Длина 3'-NTR варьирует от 17

нуклеотидов (сегмент 1) до 182 (сегмент 10), и в последнем случае, составляет около 25 % общей длины сегмента.

Другие компоненты вириона. В отношении вируса RV-A определено 13 первичных продуктов трансляции. В случае гена 9 используются два инициирующих кодона в одной ORF, давая перекрывающиеся формы VP7. Ген 11 имеет две ORFs, которые кодируют VP5 и VP6. Номенклатура протеинов ротавирусов основана на профиле их миграции в SDS-PAGE и начинается с наименее подвижного (с наибольшей Mr), с префиксом VP – для структурных протеинов, и NSP – для неструктурных. Определено 6 структурных протеинов. Вирусный кор состоит из геномных РНК, ассоциированных с VPl(Pol) и VP3(Cap), а VP2(T2) образует чехол кора (внутренний протеиновый слой капсида). Считается, что самый крупный протеин VPl(PoI) (Mr 125×10^3) обладает активностью РНК-зависимой РНК полимеразы. Протеин VP3(Cap) (88×10^3) обладает гуанилилтрансферазной активностью. Количество этих белков незначительно – не более 25 молекул на одну вирусную частицу. Протеин VP2(T2) (94×10^3) представлен 120 копиями. Анализ аминокислотного сиквенса данного протеина показал наличие двух мотивов лейцинового зиппера (leucine zipper motif), которые считаются характерными для димеризации нуклеиновых кислот и связывающих протеинов.

Средний протеиновый чехол вириона образован 780 молекулами протеина VP6(T13) (Mr 41×10^3), организованных в 260 тримерных единицы. Два других протеина вириона VP4 (Mr 88×10^3) и VP7 (Mr 38×10^3), представленных в количестве 120 и 780 молекул, соответственно, образуют внешний чехол. Спайковый протеин VP4 (размером в 776 или 775 у большинства штаммов, выделенных от человека) содержит сайт трипсинового разрезания. Разрезание дает *in vitro* два продукта VP5 (Mr 60×10^3) и VP8 (Mr 28×10^3), повышает инфекционность вируса.

Вирусным геномом кодирует 6 неструктурных протеинов. Наиболее крупный NSP1 (Mr 53×10^3) является наиболее вариабельным протеином ротавирусов внутри конкретного вида (65 % дивергенции по сиквенсу между штаммами RV-A). Более низкая вариабельность внутри вирусного вида показана для протеинов VP2(T2) –

менее 25 % и для VP4 – менее 45 %. Однако на межвидовом уровне вариабельность этих белков значительна (более 87 % для VP4, и более 84 % – для VP2). Несмотря на вариабельность, протеин NSP3 имеет консервативный богатый цистеином мотив близ N-конца, который напоминает «цинковый палец» – металлосвязывающий домен. Такой домен присутствует у ряда протеинов, связывающих нуклеиновые кислоты, и NSP1 связывает как цинк, так и ssРНК. Данный протеин участвует на ранних стадиях сборки вириона. NSP2(ViP) (Mr 35×10^3) участвует в репликации РНК (особенно на ранних стадиях), и обладает неспецифической активностью связывания одно- и двуспиральных РНК. NSP3 (Mr 34×10^3) также участвует в ранних стадиях репликации вирусного морфогенеза и выключении синтеза клеточных белков. Он образует мультимеры и обладает активностью связывания односпиральных РНК, специфичной для консервативных областей по 3'-концам вирусных мРНК.

Протеин NSP4 (Mr 20×10^3 и 28×10^3) участвует в поздних стадиях созревания вириона и показано, что он может функционировать как энтеротоксин.

Протеин NSP5 (Mr 26×10^3) обладает РНК-связывающей активностью, но функция его не ясна. ORF протеина NSP6 (Mr 12×10^3) консервативна у большинства исследованных вирусных изолятов, но функция данного белка также не ясна.

Сильно обогащен маннозой по N-концу, гликозилирование и тримминг, неразрезанные сигнальные последовательности, RER трансмембранный гликопротеин, 2 гидрофобных N-концевых участка, участвует в морфогенезе и почковании через эндоплазм этический ретикулум, предположительно есть сайт связывания Ca^{2+}, энтеротоксин неструктурный фосфорилирован гликозилирован по О-концу. Слегка основной, обогащен серином и треонином, связывает РНК, киназное взаимодействие с NSP6 (неструктурный, обнаруживается в тельцах-включениях).

Продукт второй ORF (другая рамка считывания) взаимодействует с NS5 (неструктурный, обнаруживается в тельцах-включениях).

О наличии в составе вирионов липидов сообщений нет, хотя незрелые частицы, при почковании в эндоплазматический ретикулум могут временно иметь мембрану. Три вирусных протеина гликозилированы.

Организация генома и репликация. Цикл репликации, продолжающийся от 10 до 12 ч при 37 °С был изучен на перевиваемой культуре клеток почки обезьян. Определено, что вирусный протеин VP4 участвует в прикреплении к клетке, однако соответствующий клеточный рецептор не идентифицирован. Вирус может проникать в клетку двумя путями: рецептор-опосредованным эндоцитозом и прямым проникновением. В обоих случаях удаляется внешний белковый чехол и в цитоплазму высвобождается транскрипционно активная двухоболочечная частица. Вирион-ассоциированные энзимы продуцируют 5'-кэпированные неполиаденилированные мРНК, являющиеся полноразмерными транскриптами минус-цепей каждого геномного сегмента, и несущие две функции: транслируются в вирусные протеины или являются матрицами для репликации генома. Ассемблирование 11 мРНК предшествует синтезу негативных цепей. После связывания с VP6, незрелая вирусная частица, почкуясь в эндоплазматический ретикулум, приобретает липидную мембрану, которая теряется при последующем присоединении VP4 и VP7.

Антигенные свойства. Для детальных антигенных характеристик проводят анализ трех вирусных протеинов (VP4, VP6(T13) и VP7). Протеин VP6(T13) наиболее консервативный и иммуногенный, и несет группо- и подгруппоспецифические детерминанты. Он не вызывает образование нейтрализующих антител, но играет роль в индукции протективного ответа, и используется в диагностических тестах. Гликопротеин внешнего чехла VP7 индуцирует образование типоспецифических вируснейтрализующих антител и используется для молекулярных и эпидемиологических исследований. В реакции нейтрализации в культуре клеток определено 14 типов гликопротеинов и G серотипов. Анализ сиквенса VP7 разных изолятов показал, что изоляты одной сероipynnbi имеют менее 10 % вариабельности по сиквенсу, тогда как между серотипами этот показатель достигает от 15 % до 25 %. На протеин VP4 также вырабатываются нейтрализующие антитела, но их использование в серотипировании менее приемлемо.

Биологические особенности. Все ротавирусы очень трудно культивируются *in vitro* только в некоторых линиях эпителиальных клеток из почек обезьян. Инфекция этих клеток может быть усилена предварительной обработкой вируса трипси-

ном. Сходная картина наблюдается и *in vivo,* когда репродукция вируса происходит только в окончательно дифференцированных энтероцитах, расположенных на вершинах микроворсинок эпителия тонкого кишечника.

Отмечается несколько механизмов патогенеза, включая деструкцию энтероцитов, приводящую к нарушению процесса всасывания к осмотической диарее. До проявления гистологических изменений, часто отмечается водянистая диарея, которая считается секреторной, и вызываемой ротавирусным энтеротоксином. Наконец предполагается, что деструкция энтероцитов может приводить к потере барьера проницаемости между эпителием и кровеносной системой, что приводит к осмотическому выходу жидкости из системы циркулирования в кишечник. Ротавирусы инфицируют широкий спектр видов птиц и млекопитающих, чаще всего раннего возраста. Однако RV-B вызывает эпидемии у людей старшего возраста.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Также как и в отношении представителей других родов семейства, определяющим критерием для классификации по видам является доказательство способности к реассортация генетических сегментов при коинфекции, с образованием жизнеспособного потомства. Однако на данный момент недостаточно сведений о реассортации между изолятами, и в основе методов идентификации отдельных изолятов лежат серологические исследования в совокупности с анализом нуклеотидных или аминокислотных сиквенсов.

На данный момент различают 5 видов ротавирусов (RV-A до E) и два дополнительных вида (RV-F и RV-G).

Представители отдельных видов данного рода могут быть идентифицированы по следующим признакам:

1) способность к обмену генетическим материалом путем реассортации сегментов генома во время коинфекции, с образованием жизнеспособных вирионов;

2) высокий уровень серологического перекрестного реагирования в ELISA, с использованием поли- или моноклональных антител, специфичных VP6(T13) или его гомологам у других (не RV-A) вирусов;

3) высокий уровень консервативности сиквенсов РНК в концевых и близлежащих к ним участков. Определено два уровня консервативности сиквенсов: корот-

кий консенсусный сиквенс (10 нуклеотидов) по концам всех геномных сегментов и внутри сегментов – сегмент-специфические консенсусные последовательности (по 40-50 нуклеотидов). Профиль фингерпринта различен для каждого вида вируса и может быть использован в диагностических целях;

4) высокий уровень сходства сиквенсов РНК в консервативных сегментах генома. Вирусы внутри одного вида имеют вариабельность по сиквенсу не более 10 % (сегмент 6, кодирующий VP6(T13)), тогда как вирусы разных видов проявляют вариабельность более чем на 30 %. Такие различия также показаны для аминокислотного сиквенса вирусных протеинов, таких как VP2(T2);

5) идентификация по серотипу вируса с вирусным типом, уже классифицированным в качестве вида данного рода. Серотипы разных видов не способны к перекрестной нейтрализации;

6) идентификация по специфичности виду-хозяину. Например, на данный момент RV-E был найден только у свиней. RV-D, а также предполагаемые RV-F и RV-G были выделены только от птиц.

Официально зарегистрировано 5 основных и 2 предполагаемых вида.

Род: *Coltivirus*

Типовой вид: *Colorado tick/ever virus* (CTFV).

Характерные особенности. Геном состоит из 12 сегментов двуспиральной РНК. Во время репликации вирусы обнаруживаются в цитоплазме клеток в ассоциации с гранулярными матрицами, филаментами или трубочками и извитыми нитями. Иммунофлюоресцентный анализ показал флюоресценцию ядра. Передача вирусов между позвоночными-хозяевами происходит посредством членистоногих переносчиков – клещей и москитов.

Морфология. Частицы диаметром от 60 нм до 80 нм имеют два концентрических капсидных чехла и кор, имеющий диаметр 50 нм. Данные электронной микроскопии (негативное контрастирование) свидетельствуют об относительно гладкой (ровной) поверхности капсомерной структуры и икосаэдральной симметрии. Частицы обнаруживаются тесно связанными с филаментозными структурами и гранулярными матрицами в цитоплазме. Большинство вирусных частиц безоболочечные, хо-

тя некоторые приобретают оболочечную структуру при прохождении через эндоплазматический ретикулум.

Плавучая плотность вириона в CsCl составляет 1,38 г/см^3. Вирус остается стабильным при pH от 7 до 8, но теряет инфекционность при pH 3. При температуре 4 °C вирус сохраняет активность в течение длительного периода в присутствии 50 % сыворотки крови плода КРС (фетальная сыворотка КРС) в 0,2 M Tris-HCl pH 7,8. Нагревание до 55 °C значительно снижает инфекционность вируса. Колтивирусы стабильны при обработке неионными детергентами, sodium lauroyl sarcosine или фреоном, но быстро разрушаются при обработке дезоксихолатом натрия или додецилсульфатом натрия. Ультразвуковая обработка средней мощности не приводит к деструкции частиц и может использоваться при очистке вируса. Вирус длительное время сохраняется при минус 80 °C, особенно при добавлении 50 % сыворотки крови плода КРС.

Геном представлен 12 сегментами dsRNA, которые обозначаются «геномный сегмент 1» – «геномный сегмент 12» в соответствии с уменьшением молекулярной массы или повышением электрофоретической подвижности при AGE. Геном состоит примерно из 21000 bp, а длина сегментов колеблется от 3,75 kbp до 756 bp.

Для подгруппы А колтивирусов (CTFV), при анализе размера геномной РНК в AGE, характерно выделение трех классов: крупные (L, сегменты от 1 до 4), средние (M, сегменты от 5 до 10) и мелкие (S, сегменты от 11 до 12). Геном включает около 28 kbp (общая Mr 18×10^6), длина сегментов от 675 bp до 14400 bp. Профиль генома в AGE *Eyach virus* (EYAV), также относящегося к подгруппе А сильно отличается от профиля CTFV. В подгруппе В также просматривается два профиля миграции геномной РНК в AGE: профиль 6-6 для *Banana virus* (BAV-In6423) и 6-5-1 для *Kadipiro virus* (KDV).

Анализ перекрестной гибридизации РНК показал, что изоляты CTFV относительно гомогенны, и выделить отдельные серотипы проблематично (хотя некоторые вариации просматриваются в сегментах 4 и 6). Общее сходство по геномному сиквенсу по четырем мелким сегментам разных изолятов CTFV варьирует от 90 % до 100 %. Степень сходства по сиквенсу 12 сегмента изолятов CTFV и EYAV составля-

ет от 53 % до 58 %. Изоляты BAV проявляют вариабельность по профилю миграции, что свидетельствует о вариабельности первичной структуры. Общее сходство этих изолятов по нуклеотидному сиквенсу составляет от 80 % до 99 % по сегменту 7 и от 54 % до 99 % – по сегменту 9.

Длина 5'-NTR и 3'-NTR исследованных сегментов разных колтивирусов составляет от 14 до 17 и от 35 до 249 нуклеотидов, соответственно. Состав G + C подгруппы A (от 48 % до 52 %) отличается от состава подгруппы B (от 37 % до 39 %).

Антигенные свойства. CTFV из Северной Америки и EYAF из Европы, классифицированные как разные виды, проявляют низкую перекрестную активность в реакции нейтрализации. Изолят S6-14-03, выделенный от зайца *(Lepus californicus)* в Северной Калифорнии, также считается отдельным видом (CTFV-CaJ, серологически близким *Eyach virus.* Методы, основанные на использовании поли- и моноклональных антител, не показали наличия перекрестной активности между колтивирусами подгруппы B и CTFV. Таким образом, выделяется четыре вида колтивирусов, принадлежащих двум разным подгруппам. Однако требуется дальнейший анализ неклассифицированного Китайского изолята, для подтверждения или исключения существования других видов.

Биологические особенности. Колтивирусы были выделены от нескольких видов млекопитающих (включая человека), а также от клещей (родов *Dermacentor, Haemaphysalis, Oiobius, Ixodes)* и москитов/комаров (родов *Culex* и *Anopheles),* являющихся переносчиками.

Аспирация крови от животных, инфицированных CTFV, взрослыми клещами и нимфами приводит к развитию у них персистентной инфекции, которая обеспечивает трансстадийную, но не трансовариальную передачу вируса. Сохранению вируса способствует также длительное (до 5 месяцев) вирусоносительство, наблюдаемое у некоторых грызунов. Инфицирование человека CTFV происходит при укусе инфицированным лесным клещом *D. Andersoni.* Передача от человека человеку была отмечена только как результат переливания крови. Считается, что наблюдающаяся у человека и грызунов продолжительная виремия, является результатом внутриэритроцитарной локализации вируса, защищающей его от воздействия иммунной систе-

мы.

Инфекция, вызванная CTFV характеризуется у людей внезапной лихорадкой, ознобом, головной и ретроорбитальной болями, светобоязнью, миальгиями и общим недомоганием. Абдоминальные боли встречаются в 20 % случаев. Сыпь проявляется редко (менее 10 %). Двух- или трехфазная лихорадка может сохраняться до 10 суток. Тяжелые формы болезни, включающие признаки поражения ЦНС или геморрагической лихорадки встречаются редко, в основном у детей до 12 летнего возраста. В некоторых случаях это заканчивается фатально. Может происходить внутриутробное заражение CTFV, однако риск аборта или смерти плода не известен.

CTFV сопровождается лейкопенией у взрослых хомяков и, примерно, у 2/3 инфицированных людей. У мышат-сосунков, обычно погибающих на 6-8 сутки после заражения, обнаруживаются некроз миокарда, некробиотические изменения мозжечка, широкие очаговые некрозы и периваскулярные воспалительные процессы в коре мозга; отмечается дегенерация мышечной ткани, некрозы печени, сильная инволюция тимуса, некрозы ретины и бурого жира. У человека проявляется сходная патолого-анатомическая картина: менингит, менингоэнцефалит, энцефалит, кровотечения в желудочно-кишечном тракте, пневмония, миокардит.

Инфекция, обусловленная CTFV, встречается у лесных обитателей гор Rocky Mountain, на высоте от 4000 до 10000 футов, в Северной Америке. Антитела к вирусу были обнаружены у зайцев в Ontario, а выделение вируса регистрировалось в Long Island и New York. *Eyach virus* широко распространен в Европе. Изоляты BAV были выделены в 1987 г из цереброспинальной жидкости и сыворотки крови пациентов с признаками лихорадки и энцефалита. Индонезийские изоляты были выделены исключительно от москитов. Хотя клиническое проявление инфекций, вызванных BAV и KDV, документировано не так хорошо, как для CTFV, предполагается широкое их распространение в странах Юго-Восточной Азии.

Критерии подразделения на виды внутри семейства. Также как и в отношении представителей других родов семейства, определяющим критерием для классификации по видам является доказательство способности к реассортации генетических сегментов при коинфекции, с образованием жизнеспособного потомства. Од-

нако на данный момент недостаточно сведений о реассортации между изолятами, и в основе методов идентификации отдельных изолятов лежат серологические исследования в совокупности с анализом нуклеотидных или аминокислотных сиквенсов.

Представители отдельных видов данного рода могут быть идентифицированы по следующим признакам:

1) способность к обмену генетическим материалом путем реассортации сегментов генома во время коинфекции, с образованием жизнеспособных вирионов;

2) результаты анализов на основе методов перекрестной гибридизации (northern или dot-blot, с зондами из РНК или кДНК);

3) серологический анализ с использованием реакции связывания комплемента (РСК) и реакции нейтрализации. Изоляты CTFV проявляют высокий уровень перекрестной нейтрализации. Перекрестная нейтрализация между видами CTFV и EYAV (подгруппа A) детектируется только в РСК. Вирусы подгрупп A и B не проявляют значимой перекрестной активности;

4) сравнительный анализ сиквенсов (сегментов от 7 до 12). Внутри одного вида проявляется высокий уровень сходства сиквенсов по консервативным сегментам, например, по сегменту 12 вариабельность не превышает 11 %;

5) сравнительный анализ аминокислотных сиквенсов продуктов сегмента 12, показывает вариабельность между видами более 50 %;

6) сравнительный анализ электрофоретипа в AGE. Внутри одного вида профиль электрофоретипа достаточно стабилен. Однако в случае делеций или вставок (в сегментах 7 и 9) электрофоретип может изменяться;

7) сравнительный анализ консервативных концевых последовательностей РНК. Данные последовательности проявляют консервативность на уровне вида. Сиквенс 3'-концов некоторых сегментов может быть консервативным у разных видов (например, BAV и KDV);

8) анализ G + C состава вирусной РНК. Виды, принадлежащие одной подгруппе, имеют сходный G + C состав. Сегменты РНК видов CTFV и EYAV, принадлежащих подгруппе A, имеют состав G + C от 48 % до 52 %, тогда как сегменты видов BAV и KDV, принадлежащих группу B, имеют G + C состав от 37 % до 39 %.

В настоящее время официально зарегистрировано 4 основных и 4 предполагаемых вида.

Род: *Aquareovirus*

Типовой вид: *Aquareovirus A* (ARV-A) (аквареовирус Л).

Характерные особенности. Аквареовирусы внешне напоминают ортореовирусы, но имеют геном из 11 сегментов dsRNA. Инфицируют различных водных животных, включая рыб и ракообразных. Аквареовирусы репродуцируются в культурах клеток из тканей органов рыб и млекопитающих, при температуре от 15 °С до 25 °С. Характерный ЦПЭ проявляется в виде синцития.

Морфология. Вирусные частицы сферические, икосаэдральной симметрии (80 нм в диаметре), с двумя концентрическими капсидными чехлами, сформированными тремя протеиновыми слоями. Внешний капсид, толщиной 10 нм, окружает кор, имеющий диаметр 60 нм. Промежуток между внешним капсидом и внутренним кором, при электронной микроскопии с негативным контрастированием, выглядит в виде четкого светлого кольца. Небольшие поверхностные отростки соединяют внутренние и внешние капсидные слои. Коровая частица содержит также внутренний слой, содержащий 11 геномных сегмента dsRNA и внутренние коровые протеины (транскриптазный комплекс). Морфология аквареовирусных частиц очень напоминает субвирусные частицы ортореовирусов, однако, главным отличием является отсутствие у аквареовирусов гемагглютинирующих спайков (отростков).

Плавучая плотность вириона в CsCl составляет 1,36 г/см^3. Инфекционность вируса стабильна при pH от 3 до 10 и при обработке эфиром или хлороформом. Воздействие солей цезия к потере белков не приводит. При температуре 4 °С, 16 °С или 23 °С в среде (МЕМ) с 5 % сыворотки инфекционность аквареовирусов практически не снижается в течение 28 суток. Однако инфекционность утрачивается при хранении при 45 °С в течение 7 суток или при нагревании до 56 °С.

Геном представлен 11 сегментами dsRNA (общая Mr 16,0 × 10^6), представленные в вирусной частице в эквимолярном соотношении. Сегменты имеют Mr от 0,4 × 10^6 до 2,5 × 10^6 и обозначаются «геномный сегмент 1» – «геномный сегмент

11» в соответствии с уменьшением молекулярной массы или повышением электрофоретической подвижности в 1 % агарозном геле. По размеру (профилю миграции) сегменты подразделяются на 3 класса: крупные (L, сегменты 1-3, Mr от $2{,}5 \times 10^6$ до $2{,}3 \times 10^6$), средние (M, сегменты 4-6, Mr от $1{,}9 \times 10^6$ до $1{,}6 \times 10^6$) и короткие (S, сегменты 7-11, Mr от $1{,}0 \times 10^6$ до $0{,}37 \times 10^6$). По взаимной РНК-РНК гибридизации определено 6 видов (AVR-A-F). Электрофоретический профиль одинаков для членов одного вида.

Другие компоненты вириона. Вирион ARV-A содержит 7 структурных протеинов: VP1 (Mr 130×10^3) капсид (кор); VP2 (Mr 127×10^3) – внутренний капсид (кор); VP3, Mr 126×10^3) – внутренний капсид (кор); VP4 (Mr 73×10^3) – внутренний капсид (кор); VP5 (Мг 71×10^3) – минорный, внешний капсид, VP6 (Mr 46×10^3) – внутренний капсид (кор), VP7 (Mr 35×10^3) – мажерный, внешний капсид. Также вирус кодирует 5 неструктурных протеинов: NS1 (Mr 97×10^3); NS2 (Mr 39×10^3); NS3 (Mr 29×10^3); NS4 (Mr 28×10^3); NS5 (Mr 15×10^3).

Липидных компонентов нет, VP7 ARV-A может быть гликозилирован.

Антигенные свойства. Внешние капсидные протеины аквареовирусов не обладают гемагглютинирующей активностью. Вирусы имеют типо- и группоспецифические антигенные детерминанты. Вирусы одного вида антигенно близки. Незначительная антигенная перекрестная реактивность была показана только между ARV-A и ARV-B. Вероятно, внутри видов существуют разные серотипы. Мажерный внешний капсидный протеин ARV-A (VP7) не является мажерным антигеном нейтрализации.

Биологические особенности. Аквареовирусы были выделены от пойкилотермных позвоночных и беспозвоночных животных, обитающих в пресной и соленой воде. Вирусы хорошо репродуцируются в клеточных линиях из тканей рыб при температуре от 15 °С до 25 °С, с проявлением ЦПЭ в виде синцития. Вирусы обычно слабопатогенны для своих хозяев. Однако grass carp reovirus очень патогенен для карпов (grass carp). Инфекционность аквареовирусов повышается при обработке трипсином или хемотрипсином, что коррелирует с разрушением внешнего капсид-

ного протеина (VP7).

Критерии подразделения на виды внутри рода. Как и в отношении представителей других родов семейства, определяющим критерием для классификации по видам является доказательство способности к реассортации генетических сегментов при коинфекции, с образованием жизнеспособного потомства. Однако на данный момент для аквареовирусов таких данных нет. Поэтому, наиболее употребительными являются методы на основе перекрестной РНК-гибридизации и серологические тесты.

Представители отдельных видов данного рода могут быть идентифицированы по следующим признакам:

1) способность к обмену генетическим материалом путем реассортации сегментов генома во время коинфекции, продуцируя жизнеспособные вирионы;

2) результаты анализов на основе методов перекрестной гибридизации (Northern или dot-blot, с зондами из РНК или кДНК). Например, при гибридизации по Northern, при условиях (stringency), не дающих более 17 ошибочных спариваний, будет наблюдаться только внутривидовая гибридизация;

3) сравнительный анализ сиквенсов сегментов. Например, геномный сегмент 10, кодирующий мажерный капсидный протеин VP7, проявляет вариабельность по нуклеотидному составу более 45 % между вирусами разных видов. По аминокислотному составу (VP7) вариабельность достигает 64 %;

4) серологический анализ на основе реакции нейтрализации (или других методов) с использованием поли- или моноклональных антител, специфичных консервативным антигенам. Результаты перекрестной нейтрализации совпадают с результатами перекрестной гибридизации;

5) сравнительный анализ электрофоретипа в AGE. Внутри одного вида профиль электрофоретипа достаточно стабилен. Могут наблюдаться сходные электрофоретипы отдельных сегментов разных видов. Однако в случае делеций или вставок (в сегментах 7 и 9) электрофоретип может изменяться;

6) сравнительный анализ консервативных концевых последовательностей сегментов геномной РНК. Некоторые близкородственные виды имеют идентичные

концевые последовательности у некоторых сегментов.

На основе перекрестной РНК-гибридизации выделено 6 видов, и пять видов предполагаемых.

Род: *Cypovirus*

Типовой вид: *Cypovirus J* (CPV-1).

Характерные особенности. Вирусы данного рода инфицируют и патогенны только для членистоногих определенных видов. К культурам клеток адаптировать не удалось. При температуре выше 35 °С репликация вируса прекращается. Распространение вируса происходит в составе полиэдров, попадающих в корм. Большинство вирусов вызывают хронические болезни с поражением пищеварительного тракта, нарушением развития личинок, но редко сопровождается их смертностью.

Диаметр частиц от 55 нм до 69 нм. Вирион имеет только одну капсидную оболочку с поверхностными выступами (спайками). Геном представлен 10 сегментами dsRNA. Геном кодирует 5 протеинов. Для проникновения в клетку и инициации транскрипции не требуется модификации вириона, так как транскриптазные и кэпирующие энзимы активны без модификации частиц, и также сохраняют РНК-полимеразную активность при разрушении (при многократном замораживании-оттаивании) частицы. Вирусные частицы могут концентрироваться при участии вирусного протеина, формируя полиэдры в цитоплазме клеток. Для идентификации видов используются методы анализа электрофоретипа геномных dsRNA структурных и полиэдринового протеинов. Изоляты с одинаковым электрофоретипом РНК проявляют высокий уровень антигенной перекрестной реактивности по данным протеинам.

В настоящее время официально зарегистрировано 14 основных и 2 предполагаемых вида.

Род: *Fijivirus*

Типовой вид: *Fiji disease virus* (FDV).

Характерные особенности. Инфицируют только насекомых *(Nilaparvata lugens reovirus,* NLRV) или (Fijiviruses) еще и растения определенных видов семейства *Graminae* или *Liliaceae.* Фидживирусы широко распространены в природе, но

не обнаружены в Северной Америке, об их обнаружении в Африке и Индии точных данных нет.

Вирионы имеют икосаэдральную симметрию, с двумя оболочками, больше округлой, чем угловатой, формы (d от 65 нм до 70 нм), с короткими отростками (спайками типа А). Геном представлен 10 сегментами dsRNA. Идентифицировано 6 вирусных протеинов.

Официально идентифицировано 8 видов фидживирусов, разделенных на пять групп (по анализу нуклеотидных и аминокислотных сиквенсов).

Род: *Phytoreovirus*

Типовой вид: *Wound tumor virus* (WTV).

Характерные особенности. Основными хозяевами являются растения. Между восприимчивыми растениями вирусы распространяются цикадами, в которых вирус также репродуцируется и передается трансовариально. Механической передачи вирусов не отмечается.

Вирионы икосаэдральной симметрии, имеют угловатую поверхность (d 70 нм). Геном представлен 12 сегментами dsRNA. Идентифицировано 7 структурных вирусных протеинов. Антигенного родства по внешним капсидным протеинам у вирусов разных видов нет.

Всего официально идентифицировано 3 вида вирусов и 1 вид предполагаемый.

Род: *Oryzavirus*

Типовой вид: *Rice ragged stunt virus* (RRSV).

Характерные особенности. Основными хозяевами являются растения (семейства *Graminae)*. Между восприимчивыми растениями вирусы распространяются определенными видами насекомых, в которых вирус также репродуцируется (трансовариально не передается). Механической передачи вирусов не отмечается. Распространены в странах Юго-Восточной Азии и Дальнего Востока, в Тайване; наносят значительный ущерб в рисоводстве (потери урожая от 20 % до 100 %).

Интактные вирионы икосаэдральной симметрии, с 2 белковыми оболочками (диаметр от 75 нм до 80 нм), имеют выросты (спайки) типов А и В. Геном представлен 10 сегментами dsRNA. Идентифицировано 5 структурных и 3 неструктурных

вирусных протеина. Выражено значительное антигенное родство по некоторым протеинам обоих видов вирусов.

Всего официально идентифицировано 2 вида вирусов.

Неклассифицированные вирусы семейства.

Описано 7 видов вирусов, выделенных от насекомых, 3 вида – от ракообразных и 1 вид – от паукообразных.

14.2.2 Семейство: *Birnaviridae*

Род: *Aquabirnavirus, Avibirnavirus, Entomobirnavirus*

Характеристика вириона. Вирион безоболочечный, икосаэдральной симметрии (диаметр 60 нм) с одним протеиновым чехлом. Капсид образован 260 тримерными субъединицами (решетка T13), внутренний слой состоит из 200 тримерных субъединиц, производных VP3 и VP4 по внутренним пятиосным вершинам.

Mr (вирион) 55×10^6, плавучая плотность в CsCl 1,33 г/см^3 (1,30 г/см^3 – дефектные интерферирующие частицы).

Вирусные частицы стабильны при pH от 3 до 9, нагревании до 60 °C в течение 1 часа, устойчивы к воздействию эфира и 1 %-го додецилсульфата натрия при 20 °C, pH 7,5 в течение 30 минут.

Геном представлен 2 сегментами двуспиральной РНК (от 9 % до 10 % массы вириона). Размер большего сегмента A вируса инфекционного некроза поджелудочной железы рыб (IPNV) варьирует в пределах 2962 bp (штамм SP), 3092 bp (штамм Jasper) и 3104 bp (штаммы N1 и DRT). Размер сегмента B варьирует от 2731 bp (штамм DRT) до 2784 bp (штамм Jasper). У вируса инфекционной бурсальной болезни (IBDV) размер сегмента A составляет от 3063 bp (штамм Farragher) до 3261 bp (штамм P2). Сегмент B данного вируса имеет размер от 2715 bp (штамм UK661) до 2922 bp (штамм QC-2). У *Drosophila X virus* (DXV) сегмент A имеет длину 3360 bp. Несмотря на различия в размере сегмента A среди членов одного рода, продуктом кодирующего участка генома является полипротеин из 972 (IPNV), 1012 (IBDV) и 1032 (DXV) аминокислотных остатков. Также репортерный участок кодирует ви-

русную полимеразу размером от 844 до 845 (IPNV), 879 (IBDV) и 891 (штамм QC-2, IBDV) аминокислотных остатков. Оба геномных сегмента включают протеин VPg (Mr 94 × 10^3), связанный с ним по 5'-концам.

Другие компоненты вириона. Вирион содержит 5 полипептидов: VP1 (Mr 94 × 10^3), обладающий активностью РНК-зависимой РНК полимеразы, так же как и VPg; npe-VP2 (Mr 62 × 10^3) и VP2 (Mr 54 × 10^3), являющиеся мажерными капсидными полипептидами и типоспецифическими антигенами; VP3 (Mr 30 × 10^3), являющийся внутренним капсидным протеином и группоспецифическим антигеном. Неструктурный протеин NS (IPNV) является вирускодируемой протеазой, которая разрезает полипротеин до VP2, NS и VP3. Вирусный протеин, обозначаемый VP4 (Mr 29 × 10^3), является компонентом вириона IBDV и проявляет протеазную активность, как и протеин NS. Дополнительный неструктурный полипептид (имеющий положительный заряд), обозначаемый VP5 (Mr 16,5 × 10^3 у IBDV или 17 × 10^3 у IPNV) не существенен для репликации вируса IBDV. Нет сведений о 5'-кэпировании вирусных мРНК.

Липидов в структуре вириона не обнаружено. У IPNV и IBDV N-гликозилированных протеинов не выявлено. Протеин VP2 (IPNV) O-гликозилирован.

Организация генома и репликация. Организация сегмента А разных бирнавирусов сходна, хотя отмечается некоторое различие по размеру протеинов. Сегмент А генома IPNV имеет 2 ORFs: ORF1 кодирует протеин с Mr 17 × 10^3, а ORF2 с перекрывающейся рамкой считывания кодирует большой полипротеин с Mr 106 × 10^3. У DXV 0JAF1 имеет сиквенс, кодирующий протеин с Mr 27 × 10^3 (237 аминокислотных остатков), расположенный между участками, кодирующими VP4 и VP3. Сегмент В кодирует один крупный продукт (Mr 94 × 10^3).

Единичный цикл репродукции занимает от 18 до 22 часов у IPNV и от 6 до 8 часов у IBDV. Вируссвязывающие протеины (IBDV) обнаруживаются на поверхности разных типов клеток цыплят. После проникновения вируса в клетку активируется вирусная РНК-зависимая РНК полимераза, образующая 2 продукта, соответст-

вующих длине генома – (24S) мРНК, с каждой молекулы (14S) сегмента dsRNA. мРНК не кэпированы, а вновь образующиеся мРНК не содержат участков поли-А и связаны 5'-концом с VPg. Транскрипция вирусной РНК происходит по полуконсервативному механизму смещения цепи (strand displacement replication). Данных о синтезе минус-цепей РНК нет. Обе мРНК обнаруживаются в клетке через 3-4 часа после заражения и накапливаются в одинаковых пропорциях в течение всего репликативного цикла (молекул А примерно в 2 раза больше, чем молекул В). Вирусспецифические белки обнаруживаются в клетке через 4-5 часов после заражения, соотношение которых также сохраняется в течение всего репликативного цикла. Нет ранних или поздних протеинов. мРНК сегмента А транслируется в полипротеин (Mr 106×10^3), содержащий (5'-3') полипептиды VP2, NS и VP3. Считается, что NS котрансляционно разрезает полипротеин до образования трех полипептидов. Пре-Т2 процессируется разрезанием до образования VP2. Однако в зрелом вирионе обнаруживаются как VP2, так и npe-VP2. Продукт ORF с Mr от $16{,}5 \times 10^3$ до 17×10^3 обнаруживается в клетках, инфицированных как IBDV, так и IPNV.

мРНК сегмента В транслируется в полипептид (Mr 94×10^3), являющийся вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой (VP1). Этот продукт обнаруживается в вирионе как в «свободном» виде, так и в ассоциации с геномом.

Сборка и накопление вирусных частиц происходит в цитоплазме. Для IBDV характерно накопление VP4 в ядре и цитоплазме. Механизм высвобождения вируса не ясен. При культивировании в культуре клеток примерно половина популяции вируса остается клеточно-ассоциированной. *In vitro* (в зависимости от множественности заражения) образуются дефектные интерферирующие частицы.

Антигенные свойства. Мажерный капсидный протеин VP2 является типоспецифическим антигеном, содержащим вируснейтрализующие эпитопы. Анти-УРЗ антитела не обладают нейтрализующей активностью. Между вирусами, относящимися к разным родам (вирусами рыб, птиц и насекомых), перекрестной серологической активности не наблюдается.

Биологические особенности. Естественными хозяевами IPNV являются лосо-

севые, хотя вирус был выделен и от других пресноводных рыб, и от двустворчатых моллюсков. Распространение вируса может быть вертикальным и горизонтальным. Векторы (переносчики) не выявлены. Вирус распространен повсеместно и часто вызывает эпизоотии с высоким уровнем смертности мальков лососевых, содержащихся в искусственных условиях. Вирус вызывает некротические изменения поджелудочной железы, но обнаруживается и в других органах, таких как почки, гонады, кишечник, мозг и др. (без признаков их изменения). Взрослые инфицированные рыбы становятся пожизненными носителями вируса без явных признаков проявления болезни.

Естественными хозяевами IBDV являются цыплята и индейки. В редких случаях вирус был выделен от уток и других видов домашней птицы. Распространение вируса происходит горизонтально, векторы не описаны. Вирус распространен повсеместно. Инфицирование цыплят раннего возраста сопровождается поражением фабрициевой сумки, приводящим к дефициту В-лимфоцитов. Смертность наблюдается у цыплят от 3 до 6 месячного возраста и ассоциируется с воспалительными процессами фабрициевой сумки, образованием иммунных комплексов, истощением комплемента и нарушением тромбообразования.

Естественными хозяевами DXV является *Drosophila melanogaster.* Распространение вируса происходит горизонтально, векторы не описаны. Географическое распространение неизвестно. Инфицированные плодовые мушки становятся чувствительными к CO_2. Тропизм вируса и гистопатология не изучены. Вирус был также выделен из популяций *Culicoides* spp.

Род: *Aquabirnavirus*

Типовой вид: *Infectious pancreatic necrosis virus* (IPNV) (вирус инфекционного некроза поджелудочной железы).

Биологические особенности. Инфицируют рыб, моллюсков и ракообразных. Аквабирнавирусы были выделены от различных водных животных, обитающих как в пресной, так и в соленой воде. Природа этих агентов и, в некоторых случаях, отсутствие ассоциации с какими-либо болезнями, усложняет их классификацию и номенклатуру. Первые сообщения о выделении IP были связаны, с эпизоотиями, куль-

тивируемой в искусственных условиях, форели *(Salvalinus fontinalis).* Вскоре было установлено, что IPNV является этиологическим агентом болезней разных лососевых, включая роды *Salmo, Salvalinus* и *Oncorhynchus.* Была выявлена связь вируса с болезнями японских угрей *(Anguilla japonica),* проявлявшейся нефритами, американских сельдей *(Brevoortia tryrranus) с* признаками «вертячки» («spinning disease»), и желтохвосток *(Seriola qumqueradiata)* с признаками асцита и черепных геморрагии. У молодняка лососевых вирус вызывает острые гастроэнтериты и поражение поджелудочной железы. Бирнавирусы ассоциируются с гематопоэтическим некрозом, сопровождающимся высокой смертностью, рыб вида *Scophthalmus maximns* с признаками некроза почек. Бирнавирусы выделялись также от морских моллюсков с некротическими процессами в жабрах.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Аквабирнавирусы подразделяются на две серогруппы, не проявляющие перекрестной активности в реакции нейтрализации, но имеющие некоторое родство при иммунофлюоресцентном анализе. Серогруппа А содержит большинство изолятов аквабирнавирусов (количество которых превышает 200), которые, в свою очередь, на основе изучения перекрестной нейтрализации, подразделены на 9 серотипов (А1 – А9). Большинство типовых штаммов было выделено в Северной Америке и Европе во время вспышек болезни инфекционного некроза поджелудочной железы у лососевых. Исключение составляют штамм Hecht (серотип А), выделенный от щук *(Esox Indus)* и вирус серотипа 5, выделенный от двустворчатых моллюсков *(Tellina tenuis).* Анализ сиквенсов разных изолятов IPNV показал наличие центрального вариабельного домена (в позиции от 183 до 335 аминокислотных остатков), включающего два гидрофильных гипервариабельных сегмента.

Серогруппа В включает единственный серотип, представленный менее чем десятью изолятам, выделенными в Европе от рыб и морских беспозвоночных. Всего официально зарегистрировано 2 вида.

Род: *Avibirnavirus*

Типовой вид: *Infectious bursal disease virus* (IBDV) (вирус инфекционной бурсальной болезни).

Биологические особенности. Инфицируют только птиц. Типовой вид (IBDV) вызывает болезнь у цыплят, характеризующуюся иммуносупрессией, обусловленной поражением лимфоидных клеток в фабрициевой сумке, в которой (как и в других лимфоидных органах) отмечается апоптоз клеток. Недавно было показано, что протеин VP2 индуцирует апоптоз трансфицированных клеток млекопитающих, что сходно с апоптозом В-лимфоцитов у инфицированных цыплят. Быстрое снижение количества В-клеток приводит к развитию иммуносупрессии и снижению резистентности к другим агентам. Вирус распространен повсеместно, характеризуется значительной контагиозностью и имеет большое экономическое значение в птицеводстве. В перекрестной нейтрализации идентифицировано 2 серотипа. Штаммы серотипа 1 патогенны для цыплят, тогда как штаммы серотипа 2 – не патогенны.

Неклассифицированные вирусы семейства: Rotifer bimavirus (RBV) *(Brachiorus plicatilis).*

Сходство с другими таксонами. Бирнавирусы не имеют сходства по сиквенсам (нуклеотидным и аминокислотным, сегмент А) и антигенным свойствам с представителями других таксонов. РНК-зависимая РНК полимераза (RdRp), кодируемая сегментом В, имеет сходство с другими вирусными RdRp. Бирнавирусная RdRp имеет гидрофильный высокоосновный домен по карбоксильной части протеина. Внутри этого домена обнаружены консервативные аминокислоты, позиции которых совпадают с таковыми RdRp других вирусов, в особенности таких dsRNA-содержащих вирусов как реовирусов. Но, тем не менее, сиквенс не настолько консервативен, чтобы быть детектируемым по стандартным алгоритмам филогенетического родства.

Пикобирнавирус (*Picobirnavirus*) – предлагаемое название для нового рода вирусов, выделенных недавно от детей и некоторых видов животных, и отличающихся от существующих членов этого семейства. Эти вирусы икосаэдральной симметрии (T = 3), имеют диаметр от 30 нм до 40 нм. Плавучая плотность в CsCl 1,4 г/см^3. Их геном состоит из 2 или 3 сегментов dsRNA, имеющих длину 2,6 kbp и 1,9 kbp – для двухсегментного генома и 2,9 kbp, 2,4 kbp и 0,9 kbp – для трехсегментного генома. Вирусы обнаруживались в фекалиях животных с признаками диареи или без них.

14.2.3 Отряд: *Mononegavirales*

Семейство: *Bornaviridae, Filoviridae, Paramyxoviridae, Rhabdoviridae*

Общие признаки. Отряд включает четыре семейства оболочечных вирусов, имеющих геном, представленный линейной, несегментированной, негативной, односпиральной РНК. Семейства *Filoviridae, Paramyxoviridae* и *Rhabdoviridae* имеют общие черты, свидетельствующие об их филогенетическом родстве. Общие признаки: негативная полярность РНК, несегментированный геном, сходная организация генома (3'-нетранслируемый участок – гены коровых протеинов – гены оболочечных протеинов – гены полимеразы – 5'-нетранслируемый участок), спиральный нуклеокапсид, инициация транскрипция осуществляется вирус-ассоциированной РНК-зависимой РНК-полимеразой с единственного 3'-промотора. У данных трех членов отряда проявляется комплементарность 3'- и 5'-концов генома, от 93 % до 99 % которого кодируют протеины. Рибонуклеопротеиновый кор (но не депротеинизированная РНК) инфекционен. Созревание происходит путем почкования, в основном, через плазматическую мембрану, реже через внутренние мембраны (вирус бешенства) или внутреннюю ядерную мембрану (рабдовирусы растений). Вирусы созревают в цитоплазме, кроме некоторых рабдовирусов растений. Семейство *Bornaviridae* характеризуется уникальным процессингом мРНК, но было включено в отряд на основе сходства генома (одноцепочечная, несегментированная, негативная, линейная РНК), сходства генетической организации, комплементарности некодирующих 5'- и 3'-концов и гомологии консенсусных сигнальных последовательностей начала и окончания транскрипции. Борнавирусы отличаются ядерной репликацией и транскрипцией, и наличием у полимеразы сигнала ядерной локализации. Участки гомологии консервативных последовательностей аминокислот присутствуют в протеинах L (полимераза) с высокой степенью гомологии в предполагаемом каталитическом домене. Наибольшее сходство по протеину L обнаружено между вирусом болезни борна *(Borna disease virus)* и *Sonchus yellow net virus* (род *Nucleorhabdovirus).* За исключением борнавирусов и вирусов растений, относящихся к роду *Nucleorhabdovirus,* все остальные члены отряда реплицируются в цитоплазме.

Морфология. Вирионы крупные, оболочечные структуры обычно с выступающей бахромой из пепломеров, имеющих длину от 5 нм до 30 нм и располагающихся на расстоянии от 7 нм до 10 нм друг от друга, за исключением семейства *Bornaviridae.* Морфология частиц вариабельна, но общим можно выделить следующее:

а) для семейства *Bomaviridae:* сферические частицы, диаметром 90 нм, имеющие электроноплотный кор (диаметром 50 нм), без пепломеров;

б) для семейства *Filoviridae:* простые, отростчатые, U-образные, шестигранные или циркулярные нити (филаменты), с униформным диаметром (около 80 нм), достигающие в длину 14000 нм, хотя очищенные вирионы бациллоформные и с униформной длиной (790 нм для *Marburg virus);*

в) для семейства *Paramyxoviridae:* нитевидные (филаментозные), плеоморфные или сферические структуры различного диаметра;

г) для семейства *Rhabdoviridae:* правильные пулевидные или бацилломорфные частицы.

Рибонуклеопротеиновый кор (ядро), имеющий диаметр от 13 нм до 20 нм, у представителей семейств *Filoviridae* и *Rhabdoviridae* организован в спиральный нуклеокапсид диаметром 50 нм.

Физико-химические особенности. Mr (вириона) от 300×10^6 до 1000×10^6; плавучая плотность вириона в CsCl от 1,18 г/см^3 до 1,20 г/см^3. Инфекционность вируса быстро теряется при тепловой обработке (56 °С), УФ или рентгеновском облучении и при обработке детергентами или жирорастворителями.

Геном. Вирионы содержат одну молекулу линейной, неинфекционной, негативной полярности, односпиральной РНК, размером от 8,9 kb до 19 kb, Mr от 3×10^6 до 5×10^6, составляющей от 0,5 % до 2,0 % веса частицы. Вирусная РНК не имеет 5'-кэпированных концов или ковалентносвязанных протеинов. 3'-конец вирусной РНК не имеет поли-А. 5'- и 3'-концы имеют обратную комплементарность и консервативные концевые мотивы у каждого из четырех семейств. В инфицированных клетках обнаруживается полноразмерная РНК с позитивной полярностью (антигеномная).

Геном включает линейные сиквенсы генов, с ограниченным перекрыванием у некоторых вирусов, и короткие концевые некодирующие области. У представителей всех семейств обнаружены консервативные мотивы в сигналах начала и окончания транскрипции. Межгеномные участки имеют размер от двух до нескольких сотен нуклеотидов. Исключением является возможность кодирования генетической информации по всем трем рамкам считывания гена P респировирусов и морбилливирусов. Сплайсинг некоторых РНК и перекрывание старт/стоп сигналов является характерным для борнавирусов.

Другие компоненты вириона. Протеиновые компоненты вириона могут быть представлены 5-7 структурными протеинами, включающими оболочечный протеин, матриксный протеин, мажерный РНК-связывающий протеин, другие нуклеотид-ассоциированные протеины, полимеразный протеин, а так же, у некоторых вирусов, несколькими неструктурными протеинами, которые могут быть фосфорилированными. Матриксный протеин у всех, за исключением борнавирусов, негликозилирован. У *Borna disease virus* данный протеин N-гликозилирован и экспрессируется на поверхности вириона. Энзиматическая активность вириона может быть ассоциирована с транскриптазами, полиаденилирующими трансферазами, трансферазами мРНК и нейраминидазами.

Вирионы от 15 % до 25 % состоят из липидов, композиция которых отражает клеточные мембраны, через которые происходило почкование вируса. Обычно фосфолипиды составляют от 55 % до 60 %, стеролы и гликолипиды – от 35 % до 40 % от общего количества липидов. Гликопротеины могут быть ковалентносвязанными с жирными кислотами в области липидной мембраны.

Углеводы составляют около 3 % веса вириона. Углеводы представлены как N- и O-связанные цепи гликанов, обычно сложного типа.

Организаций генома и репликация. У представителей семейств *Filoviridae, Paramyxoviridae* и *Rhabdoviridae* дискретные мРНК транскрибируются последовательными прерывистыми синтезами, полярно и поэтапно. Обычно гены не перекрываются. Местом мультипликации является цитоплазма, за исключением вирусов, относящихся к роду *Nucleorhabdovirus* и семейству *Bornaviridae,* мультиплицирую-

щихся в ядре. Транскрипция генома борнавирусов сложна и включает сплайсинг и перекрывание стоп/старт-сигналов. Гены протеинов Р респировирусов и морбилливирусов отличаются тем, что все три ORFs могут быть использованы через альтернативные не-AUG стартовые кодоны, а редактирование мРНК может быть связано со вставками нуклеотидов, приводящими к изменению рамки считывания при экспрессии продукта данного гена. Репликация происходят путем синтеза антигеномной РНК с позитивной полярностью. Геномные и антигеномные РНК присутствуют в виде нуклеокапсидов. мРНК борнавирусов кэпирована, но синтез не ингибируется а-аманитином, что предполагает неучастие механизма кэп-связывания. У фило- парамиксо- и рабдовирусов созревание вирусных частиц происходит путем почкования независимо ассемблирующихся спиральных нуклеокапсидов через мембрану клетки с образованием липидной оболочки, содержащей трансмембранные протеины.

Антигенные свойства. В антителозависимой нейтрализации участвуют мембранные гликопротеины. Серотип вируса определяется поверхностными антигенами. Исключение составляют филовирусы, которые не нейтрализуются *in vitro.* Антитела, специфичные гликозилированному матриксному протеину и оболочечному протеину gp94 борнавирусов, обладают нейтрализующей активностью.

Биологические особенности. Спектр восприимчивых естественных хозяев может быть ограниченным или широким. Филовирусы были выделены только от приматов. Парамиксовирусы встречаются только у позвоночных, каких-либо векторов для них не известно. Рабдовирусы инфицируют позвоночных, беспозвоночных и растения. Некоторые рабдовирусы способны к репликации, как в позвоночных, так и в беспозвоночных, некоторые – в беспозвоночных и растениях, но ни один не реплицируется сразу в трех разновидностях биологических систем. Патогенность в отношении человека обусловлена семейством вируса: например, геморрагические лихорадки (семейство *Filoviridae),* болезни респираторной и нервной систем (семейство *Paramyxoviridae),* от легкой лихорадки до болезней нервной системы с фатальным исходом (семейство *Rhabdoviridae).* Борнавирусы были выделены от человека, лошадей, КРС, овец, кроликов, кошек, крыс и страусов. Патология, связанная с дан-

ными вирусами различна. Инфекция у животных ассоциируется с состояниями, варьирующими от нарушений в поведении, до тяжелых негнойных энцефаломиелитов; есть данные об ассоциации борнавирусных инфекций у человека с нейропсихиатрическими болезнями. Цитопатология может не проявляться вовсе (борна- и филовирусы) или сопровождаться быстрыми литическими процессами (рабдо- и парамиксовирусы); для парамиксовирусов свойственно образование синцитиев.

14.2.3.1 Семейство: *Bornaviridae*

Род: *Bornavirus*

Типовой вид: *Borna disease virus* (BDV) (вирус болезни Борна).

Морфология. Вирион имеет сферическую форму (диаметр 90 ± 10 нм), содержит электроноплотной кор (ядро) (диаметр от 50 нм до 60 нм) и внешнюю мембранную оболочку, имеющую выступы длиной около 7 нм.

Частично очищенные инфекционные частицы имеют плавучую плотность в CsCl от 1,16 г/см^3 до 1,22 г/см^3, в сахарозе – 1,22 г/см^3, в реографине – 1,13 г/см^3. Инфекционность вируса быстро снижается при 56 °С, при 37 °С относительно стабильна, но в присутствии сыворотки заметно снижается в течение суток. Инактивация вирионов происходит при pH ниже 5, так же как и при обработке, органическими растворителями, детергентами и УФ облучении. Инфекционность полностью теряется при обработке хлорсодержащими дезинфектантами или формальдегидом.

Геном. РНК односпиральная, линейная, несегментированная, с негативной полярностью; размер 8,9 kb, Mr 3 × 10^6, геном неполиаденилирован. Экстрацистронные сиквенсы найдены по 3'- и 5'-концам. Сиквенс 3'-конца имеет высокое содержание A + U (U / A = 2 : 1). Концы генома имеют частичную инвертированную комплементарность. Полноразмерные антигеномные позитивные РНК обнаруживаются в инфицированных клетках и вирусных рибонуклеопротеинах. Дефектные РНК в инфицированных клетках не обнаруживались. Два полноразмерных сиквенса двух штаммов BDV отличаются только на 2 нуклеотида.

Другие компоненты вириона. Геном BDV имеет 6 ORFs, кодирующих поли-

пептиды: p40 (Mr 40 × 10^3), p24 (Mr 24 × 10^3), p10 (Mr 10 × 10^3), p16 (Mr 16 × 10^3), p56 (Mr 56 × 10^3), p180 (Mr 180 × 10^3). Протеины p40, p24 и p11 соответствуют нуклеопротеину (NP), фосфопротеину (P) - транскрипционному активатору и матриксному протеину (M), соответственно, и аналогичны таковым других вирусов данного отряда. В инфицированных клетках обнаруживается две изоформы NP (p40 и p38), транслируемые с разных мРНК. В отличие от других вирусов с негативной несегментированной геномной РНК (NNS) у борнавирусов протеин p16**,** предполагаемый M-протеин, гликозилирован и присутствует в вирусной оболочке. Протеин p56 сходен с поверхностными гликопротеинами (G) других вирусов с NNS. Антитела к p56 обладают нейтрализующей активностью. Аминокислотный сиквенс p180, гомологичен таковым вирусным полимеразам (семейство L-протеинов) других вирусов с NNS.

Организация генома и репликация. РНК с негативной полярность BDV кодирует не менее 6 ORPs в порядке 3'-NP-P / p10-M-G-L-5'. ORFs не фланкированы сигналами начала-окончания транскрипции или полиаденилирования. Транскрипция и репликация борнавирусов происходит в ядре. Полноразмерные молекулы антигеномной РНК (комплементарные геномной) являются матрицами для синтеза молекул геномной РНК. Геномные и антигеномные РНК не кэпированы, не полиаденилированы. Эти РНК существуют в инфицированных клетках как нуклеокапсиды.

Проникновение BDV в клетку происходит по типу рецептор-опосредованного эндоцитоза, с участием вирусных протеинов G и M. В эндосомах происходит слияние мембран вируса и клетки, сопровождающееся высвобождением рибонуклеопротеина который транспортируется в ядро. Вирусные мРНК полиаденилированы и по 5'-концу имеют блокирующую группу, напоминающую кэп, функция которого не ясна. Моноцистронные мРНК идентифицированы только для генов NP и P / p10. Продукты генов G и L синтезируются от нижележащих ORFs внутри полицистронных мРНК. Геномная РНК имеет 3 сайта инициации транскрипции и 4 сайта окончания транскрипции (полиаденилирования). В геноме вируса обнаружено 2 интрона I (1932-2025) и II (2410-3703).

В инфицированных клетках протеины NP, P и p10 экспрессируются как в ядре,

так и в цитоплазме. Наибольшую экспрессию имеют белки NP и P, которые обнаруживаются а большинстве инфицированных клеток. В противоположность этому, только от 1 % до 10 % инфицированных клеток экспрессирует белок G на детектируемом уровне. Экспрессия полноразмерного BDV G (GP-84/94) ограничена эндоплазматическим ретикулумом и ядерной мембраной.

Процесс сборки и место созревания вирионов не ясны; почкование частиц из инфицированных клеток было показано только на примере культуры клеток MDCK, после обработки n-бутиратом. Инфекционные рибонуклеопротеиновые частицы BDV накапливаются в ядре. В цитоплазме клеток обнаружены вирусоподобные частицы, аналогичные очищенным неассоциированным с клетками, инфекционным частицам BDV. Эти частицы не ассоциированы с какими-либо цитоплазматическими мембранами.

Антигенные свойства. BDV имеет несколько антигенных детерминант. Так называемый растворимый антиген (s-антиген) полученный из супернатанта после ультрацентрифугирования суспензии ткани мозга, инфицированного BDV и предварительно обработанной ультразвуком, содержит протеины NP, P и M. Сывороточные антитела от животных, инфицированных BDV, распознают все компоненты s-антигена, но редко распознают вирусные G-продукты. Полевые изоляты BDV, от одного или разных видов животных, так же как и от животных, экспериментально инфицированных вирусами, с разной историей пассирования, проявляют строгую серологическую перекрестную реактивность. Определен только один серотип BDV, но с помощью моноклональных антител между изолятами BDV выявлены минорные антигенные различия. У экспериментально инфицированных животных обнаруживаются комплемент-независимые IgG-специфичные вируснейтрализующие антитела. Титр вируснейтрализующих антител обычно очень низок и зависит от вида животного. В нейтрализации участвуют оба протеина BDV M и G.

Биологические особенности. Лошади и овцы считаются основными естественными хозяевами BDV, у которых он вызывает фатальную нейрологическую болезнь называемую «Болезнью Борна». Однако инфекция, обусловленная BDV, встречается в естественных условиях у более широкого спектра животных: КРС,

кролики, кошки, страусы. Спорадические случаи описаны у ослов, мулов и лам. Экспериментально показана восприимчивость птиц, грызунов, и нечеловекообразных приматов. Нервно-поведенческие нарушения, наблюдаемые у BDV-инфицированных животных, напоминают некоторые нейропсихиатрические нарушения у людей. Материалы серологических и молекулярно-эпидемиологических исследований показали, что BDV может вызывать инфекцию у людей, что возможно связано с определенными нейропсихиатрическими нарушениями.

Считается, что BDV передается со слюной, назальными или коньюнктивальными секретами. Инфекция может развиться в результате прямого контакта с указанными секретами или при контаминации ими воды или продуктов. Наиболее вероятным естественным путем распространения вируса является аэрозольный (назальный), позволяющий вирусу достигнуть ЦНС путем внутриаксонной миграции по обонятельному нерву. Отмечается увеличение количества случаев в одни годы и их снижение в другие. Чаще болезнь встречается весной и в начале лета, что предполагает существование потенциальных векторов (членистоногих переносчиков). BDV не выделяли от насекомых, но имеются сообщения, что клещи являлись переносчиками инфекционного энцефаломиелита жвачных на Среднем Востоке, признаки которого напоминают болезнь борна.

Бессимптомное инфицирование в естественных условиях многих видов животных отмечалось в Европе, Северной Америке, Африке и Азии, что говорит о возможном широком распространении вируса. Однако определенного резервуара вируса в природе не найдено. Между различными полевыми изолятами BDV, а также между вирусами с разной историей пассажей *in vivo* или *in vitro,* отмечаются фенотипические различия. Однако данные молекулярно-эпидемиологических исследований свидетельствуют о консервативности сиквенсов BDV, даже у вирусов, выделенных от разных видов животных.

BDV нейротропен и имеет нецитолитическую стратегию мультипликации. Вирус вызывает болезни ЦНС у ряда видов позвоночных, что сопровождается нарушением в поведении и иногда воспалительными инфильтратами клеток в мозге. Период инкубации при инфицировании BDV может варьировать от недель до лет, с

клиническими признаками, различающимися в зависимости от генетического статуса, возраста, иммунного статуса, путей заражения, и свойств вируса. Классическая болезнь борна сопровождается Т-клеточно-зависимым иммунным механизмом. Воспалительные клетки обнаруживаются формирующими периваскулярные скопления и внутри паренхимы мозга. В инфильтратах клеток в ЦНС обнаруживают CD4 и CD8 Т-клетки, что, вероятно, связано с иммунообусловленной патологией. Нарушения эмоциональных и познавательных функций связано со специфическими нейрохимическими нарушениями при отсутствии лимфоидной инфильтрации. Повышенная вирусная экспрессия в структурах лимбической системы и астроцитах, структурные нарушения нейронов гиппокампа, являются основными гистопатологическими признаками BDV-инфекции.

Сходство с другими таксонами. BDV имеет организацию генома, как у других NNS РНК вирусов. Экспрессия генома регулируется перекрыванием транскрипционных единиц и транскрипционных сигналов ORFs, считыванием по сигналам терминации транскрипции и дифференциальным использованием кодонов инициации. Каждый из этих типов стратегии встречается у представителей отряда *Mononegavirales,* но только у борнавирусов они все в совокупности. Так же как и у ортомиксовирусов, BDV использует сплайсинг РНК для образования некоторых мРНК, что также характерно для представителей отряда *Mononegavirales.* Официально зарегистрирован 1 вид.

14.2.3.2 Семейство: *Filoviridae*

Род: «Marburg-like viruses», «Ebola-like viruses»

Морфология. Вирионы плеоморфные, но в основном, палочковидной или нитевидной формы (иногда с отростками), U-образной, 6-гранной или циркулярной формы, наблюдаемой в культуре клеток. Длина частиц варьирует значительно (до 14000 нм), что, вероятно, связано с агрегацией, но диаметр около 80 нм. Длина частиц, ассоциируемая с максимальной инфекционностью, составляет 790 нм для вируса Марбург и 970 нм – для вируса Эбола.

Вирион имеет липидную мембрану, являющуюся производной клеточной плазматической мембраны. Поверхностные выросты (длиной 10 нм), находящиеся на расстоянии 10 нм друг от друга, образованы гликопротеином GP. Находящийся под оболочкой нуклеокапсид имеет центральную ось (20 нм в диаметре), которая окружена спиральным нуклеокапсидом (примерно 50 нм в диаметре) с перекрестными связями, через каждые 5 нм. Он состоит из геномной РНК, протеина L (large), нуклеопротеина (NP) и протеинов VP35 и VP30.

Mr (вирион) $3{,}82 \times 10^3$; плавучая плотность вириона в градиенте тартрата калия составляет 1,14 г/см^3, нуклеокапсида в CsCl – 1,32 г/см^3.

Инфекционность относительно стабильна при температуре ниже 20 °С, но резко падает при 60 °С в течение 30 минут. Инфекционность снижается при воздействии солей аммония, гипохлорита и фенольных дезинфектантов, жирорастворителей, 3-пропиолактона, формальдегида, УФ и у облучения.

Геном. РНК односпиральная. несегментированная, негативной полярности; размер 19 kb *(Marburg virus* 19,1 kb, *Zaire Ebola virus* 18,9 kb). Геномная РНК имеет Mr $4{,}2 \times 10^6$ и составляет 1,1 % от общей массы вириона; не полиаденилирована и не кэпирована (так же как нет ковалентно связанных протеинов) по 3'- и 5'-концам, соответственно.

Другие компоненты вириона. Вирусные частицы содержат семь протеинов: протеин L является РНК-зависимой РНК транскриптазой-полимеразой; поверхностный гликопротеин (GP), образующий вирусные спайки (выросты) в виде тримеров; нуклеопротеин (NP); матриксный или мембрано-ассоциированный протеин 40 (VP40); протеин VP35, который является, по-видимому, компонентом транскриптазы-полимеразы; протеин VP30 вероятно является минорным нуклеопротеином; VP24 является вторым матриксным или мембрано-ассоциированным протеином.

Липиды входят в состав вирусной мембраны, образованной из клеточной плазматической мембраны.

Гликопротеины сильно гликозилированы сложными N-связанными гликанами, их гибридами или олигоманнозными типами, и O-связанными гликанами нейтрального мицинового типа. Гликаны составляют более 50 % общей массы GP. *Zaire*

Ebola virus более сиализирован, чем *Marburg virus,* и в определенных клеточных линиях GP *Marburg virus* полностью лишены сиаловых кислот. GP *Marburg virus* ацилированы и образуют гомотримеры. NP и VP35 фосфорилированы.

Организация генома и репликация. Филовирусы имеют следующую организацию генома: 3'-NP-VP35-VP40-OP-VP30-VP24-L-5'. Последовательности по краям 3'- и 5'-концов консервативны и проявляют значительную комплементарность. Гены фланкированы транскрипционными старт / стоп-сайтами (полиаденилирования), содержащими высококонсервативные пентамеры 3'-UAAUU-5'. Большинство генов разделены неконсервативными межгенными последовательностями, но некоторые из них перекрываются. У *Marburg virus* обнаружено одно перекрывание генов, тогда как у *Zaire Ebola virus* – несколько. Большинство генов обладают длинными 3'- и 5'-некодирующими областями. В противоположность *Marburg virus* ген GP *Zaire Ebola virus* включает 2 ORFs, которые сливаются через транскрипционное редактирование.

Проникновение в клетку происходит по типу эндоцитоза. Транскрипция и репликация генома происходит в цитоплазме, подобно представителям семейств *Paramyxoviridae* и *Rhabdoviridae,* 5'-некодирующие области мРНК имеют шпилевидную структуру. Во время репликации синтезируются полноразмерные позитивные копии РНК. Во время инфекции нуклеокапсиды формируют в цитоплазме тельца-включения. Высвобождение вирионов происходит путем почкования через плазматическую мембрану. Экспрессионная стратегия гена GP *Zaire Ebola virus* уникальна и включает транскрипционное редактирование. Первичный продукт нередактированного транскрипта (ORF1) представляет собой небольшой гликопротеин sGP, секретируемый за пределы клетки. Только редактирование РНК позволяет экспрессироваться полноразмерному GP.

Антигенные и генетические особенности. Нейтрализация вируса *in vitro* проявляется слабо. Между вирусами двух родов перекрестная активность почти не проявляется. Гены GP *Marburg virus* и *Zaire Ebola virus* различаются на 57 %, что позволяет четко разделять два рода. Перекрестная активность видов рода «Ebola-like viruses» может быть подтверждена антигенно и генетически. Все 4 вида отличаются

друг от друга по нуклеотидному составу от 37 % до 41 %. Виды рода «Marburg-like viruses» в антигенном и генетическом отношении более гомогенны. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей показал две генетические ветви, сосуществующие вместе с недавно выделенным в Кении изолятом, отличающимся от других на 21 %. Между штаммами отдельных видов филовирусов показаны очень незначительные вариации по нуклеотидному сиквенсу – менее 2 % между штаммами вида *Zaire Ebola virus*. Между изолятами, выделенными от разных пациентов во время одной вспышки генетические различия минимальны или их нет совсем. Между штаммами видов *Zaire Ebola virus* и *Marburg virus* различия по аминокислотным сиквенсам превышают 68 %, тогда как между видами рода *Zaire Ebola virus* различия меньше, но тоже значительны (более 30 %),

Биологические особенности. История возникновения филовирусов и их резервуары в природе не известны. Векторы не описаны. При вспышках болезни вирус быстро распространяется среди людей. Последующие случаи заболеваний связаны с близким контактом с больными (заболевание членов семей или медицинского персонала). Наиболее вероятный путь распространения вируса среди людей – прямой контакт с кровью или другими жидкостями организма, хотя возможен и воздушно-капельный путь передачи. Использование контаминированных шприцов и игл является причиной нозокомиального инфицирования.

Смертность среди людей при заражении *Marburg virus* составляет около 25 %, тогда как при заражении *Zaire Ebola virus,* смертность составляет от 50 % до 90 %. *Reston Ebola virus,* выделенный от обезьян циномольгус, имеет невысокую патогенность или апатогенен для людей. Серологические исследования показали наличие специфических антител к филовирусам в крови людей многих африканских стран (Заир, Судан, Габон, Нигерия, Либерия, Камерун, Кения).

Болезнь проявляется внезапной лихорадкой, головной болью, миальгиями и анорексией. Затем могут появиться такие симптомы, как абдоминальные боли, ангина, тошнота, рвота, кашель, артралгия, диарея, фарингит и конъюнктивит. Развивается обезвоживание, апатия, дезориентация и характерная, не вызывающая зуд, центростремительная сыпь, сопровождающаяся разной степени эритемой и шелушени-

ем, с последующей гибелью на 5-7 сутки после заражения. Геморрагические проявления развиваются во время пика болезни и являются прогностическим признаком. Наиболее явными являются кровотечения в желудочно-кишечном тракте, петехии и геморрагии в области колотых ран и слизистых оболочек. Лабораторные параметры менее характерны.

Патологические изменения при фатальной геморрагической лихорадке Марбург и Эбола включают геморрагический диатез кожи, слизистых мембран, висцеральных органов и желудочно-кишечного тракта. Наблюдается увеличение селезенки, лимфоузлов, почек и, особенно, мозга. При микроскопическом исследовании наблюдаются некротические очаги в печени, лимфоидных органах, почках, семенниках и яичниках. Наиболее сильно выражены некротические очаги в паренхиме печени. Гепатоциты часто содержат тельца-включения, параллельно с большим количеством нуклеокапсидов, видимых в электронный микроскоп. Часто развивается интерстициальная пневмония, панкреатиты и иридоциститы.

Филовирусы проявляют тропизм к клеткам макрофагальной системы, гепатоцитам, адреналин-синтезирующим клеткам, фибробластам и эндотелиальным клеткам. Вирус обнаруживается во всех органах с наибольшей концентрацией в печени, почках, селезенке и легких. Активация каскада свертывания крови с геморрагическим диатезом и фибринолизисом происходит в разной степени, в зависимости от штамма вируса.

Экспериментально инфицируются обезьяны, мыши, морские свинки и хомяки.

Род: "Marburg-like viruses"

Типовой вид: *Marburg virus* (MARV) (вирус Марбург).

Характерные особенности:

- почти нет перекрестной активности с вирусом Эбола;
- длина вириона 790 нм, тогда как у вируса Эбола – 970 нм;
- длина генома 19,1 kb, тогда как у вируса Эбола – 18,9 kb;
- одно перекрывание генов, тогда как у вируса Эбола – несколько;
- для экспрессии гликопротеина не требуется транскрипционного редактиро-

вания гена 4;

- протеиновый профиль гомогенен между всеми штаммами, но отличен от такового вируса Эбола;
- нуклеотидные различия по гену гликопротеина составляют 57 % при сравнении с вирусом Эбола;
- смертность среди людей около 25 %.

Род: "Ebola-like viruses"

Типовой вид: *Zaire Ehola virus* (ZEBOV) (вирус Эбола Заир).

Характерные особенности:

- почти нет перекрестной активности с вирусом Марбург;
- длина вириона 970 нм, тогда как у вируса Марбург – 790 нм;
- длина генома 18,9 kb, тогда как у вируса Марбург – 19,1 kb;
- несколько перекрываний генов, тогда как у вируса Марбург – одно;
- для экспрессии гликопротеина требуется транскрипционное редактирование;
- транскрипция только первой ORF гена 4 приводит к накоплению растворимого мелкого гликопротеина, не идентифицированного для вируса Марбург;
- протеиновый профиль видоспецифичен, но отличен от такового вируса Эбола;
- нуклеотидные различия по гену гликопротеина составляют 57% при сравнении с вирусом Марбург;
- смертность среди людей составляет от 50 % до 90 % для видов *Sudan Ebola virus* и *Zaire Ebola virus*. Вид *Reston Ebola virus* непатогенен для людей.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Внутри данного рода вирусы могут быть различены на основе различий по сиквенсу гена гликопротеина (различия более 30 %), данным по перекрестной защите (где это возможно) и по различию в географическом распространении. Официально зарегистрировано 4 вида.

Сходство с другими таксонами. При сравнении геномов филовирусов с другими представителями порядка *Mononegavirales* определена сходная структура и

предположительно похожие механизмы транскрипции и репликации. Сравнительный анализ отдельных генов показал, что филовирусы филогенетически достаточно отличны от других семейств данного порядка. Ограниченная гомология существует между карбоксильными частями GP филовирусов и трансмембранными p15E-подобными гликопротеинами онкогенных ретровирусов.

14.2.3.3 Семейство: *Paramyxoviridae*

Подсемейство: *Paramyxovirinae*

Род: *Respirovirus, Rubulavirus, Morbillivirus*

Подсемейство: *Pneumovirinae*

Род: *Pneumovirus, Metapneumovirus*

Морфология. Вирионы плеоморфные, чаще сферической или нитевидной формы; диаметр 150 нм и более. Вирион состоит из нуклеокапсида, окруженного липидной оболочкой. Оболочка образуется из плазматической мембраны клетки при почковании и содержит 2-3 трансмембранных гликопротеина, представляющие собой гомоолигомеры в виде спайко-подобных выростов (отростков) длиной от 8 нм до 12 нм, расположенных на расстоянии от 7 нм до 10 нм друг от друга. Один негликозилированный мембранный или матриксный протеин связан с внутренней поверхностью мембраны. Нуклеокапсид имеет спиральную симметрию (от 13 нм до 18 нм в диаметре, с шагом от 5,5 нм до 7 нм и длиной до 1000 нм), состоит из одной копии геномной РНК и связанных с ней протеинов. Встречаются мультиплоидные вирионы. Вирусная полимераза входит в состав вириона.

Mr (вирион) 500×10^3; плавучая плотность в сахарозе от 1,18 г/см^3 до 1,20 г/см^3. Вирионы очень чувствительны к нагреванию, жирорастворителям, ионным и неионным детергентам, формальдегиду и окислителям.

Геном. РНК: односпиральная, линейная, с негативной полярностью, неинфекционная; Mr от 5×10^6 до 7×10^6 (0,5 % веса вириона). Размер: 15384 нуклеотида – вирус Сендай *(Sendai virus,* SeV), 15462 нуклеотида – вирус парагриппа человека 3 *(Human parainfluenza* 3, HPIV-3), 15384 нуклеотида – вирус эпидемического пароти-

та *(Mumps virus,* MuV), 15246 нуклеотидов – вирус *Simian virus 5* (SV-5), 15450 нуклеотидов – вирус *Simian virus 41* (SV-41), 15156 нуклеотидов – вирус Болезни Ньюкасла *(Newcastle disease virus,* NDV), 15653 нуклеотида – вирус парагриппа человека 2 *(Human parainfluenza 2,* HPFV-2), 15894 нуклеотида – вирус кори *(Measles virus,* MeV), 15690 нуклеотидов – вирус чумы собак *(Canine distemper virus,* CDV), 15882 нуклеотида – вирус чумы КРС *(Rinderpest virus,* RPV), 15702 нуклеотида – морбилливирус китовых *(Cetacean morhillivirus,* CeMV), 15222 нуклеотида – респираторно-синцитиальный вирус человека *(Human respiratory syncylial virus,* HRSV). Некоторые вирионы могут содержать позитивную РНК. Полноразмерная геномная РНК обнаруживается в клетках или в составе вириона только в виде нуклеокапсида. Геномная РНК не имеет 5'-кэпа или связанных с геномом протеинов. 3'-конец генома не полиаденилирован.

Другие компоненты вириона. Члены подсемейства *Paramyxovirinae* кодируют от 7 до 9 протеинов (Mr от 5×10^3 до 250×10^3), из которых 2-4 (или более) образуются из 2-3 перекрывающихся ORPs в фокусе P. Пневмовирусы кодируют от 9 до 11 протеинов (Mr от $4{,}8 \times 10^3$ до 250×10^3). Общими для всех родов являются вирусные протеины: 3 нуклеокапсидных протеина: РНК-связывающий протеин (N или NP), фосфопротеин (P) и крупный полимеразный протеин (L); 3 мембрано-ассоциированных протеина: негликозилированный внутренний мембранный или матриксный протеин (M), два гликозилированных оболочечных протеина, включающие протеин слияния (F) и протеин прикрепления (G или H, или HN). Протеин F синтезируется в инфицированных клетках как предшественник F, который активируется после разрезания клеточными протеазами с образованием вирусных, связанных дисульфидными связями, субъединиц Fi (в порядке: amino-Fi-S-S-Fi-carboxyl). Вариабельными являются неструктурные протеины (C, NS1 и NS2); богатый цистеином, связывающий цинк, протеин (V); мелкий интегративный мембранный протеин (SH) и фактор процессивности транскрипции (M2, называемый ранее 22-кОа-протеин), который ранее считался вторым M-подобным протеином. Энзиматическая активность вириона (различная у разных родов) обусловлена РНК-зависимой РНК транскриптазой, аденилаттрансферазой, мРНК гуанилил- и метилтрансферазой, про-

теинкиназой и нейраминидазой.

Липиды, имеющие клеточное происхождение, составляют от 20 % до 25% массы вириона.

Углеводы составляют 6 % массы вириона; их композиция зависит от клетки-хозяина. Протеины слияния и прикрепления гликозилированы N-связанными сторонами карбогидратных цепей. В подсемействе *Pneumovirinae* протеин прикрепления (G) сильно гликозилирован по O-связанным карбогидратным сторонам цепей. Протеин SH респираторно-синцитиального вирус содержит полилактозаминогликан.

Организация генома и репликация. После прикрепления к клеточным рецепторам происходит слияние вирусной оболочки и поверхностной мембраны клетки (при нейтральном pH). Репликация вируса происходит в цитоплазме клеток и не зависит от функций ядра. Геном транскрибируется с 3'-конца вирус-ассоциированными энзимами в 5-10 отдельных, субгеномных, комплементарных геному, мРНК. Транскрипция контролируется короткими (от 10 до 13 нуклеотидов) консервативными сигнальными последовательностями старта/окончания/полиаденилирования, фланкирующими каждый транскрипционный элемент. мРНК кэпированы и имеют сайты полиаденилирования. Межгенные участки вирусов родов *Respirovirus* и *Morbillivirus* высококонсервативны по длине и сиквенсу, тогда как у вирусов родов *Rubulavirus* и *Pneumovirus* этого не отмечается. Репликация РНК происходит через промежуточную антигеномную полноразмерную РНК, имеющую позитивную полярность.

Сборка нуклеокапсида происходит в цитоплазме и тесно связана с синтезом РНК. Нуклеокапсид приобретает оболочку на клеточной поверхности в местах, содержащих вирусные гликопротеины. Члены подсемейства *Paramyxovirinae* содержат от 5 до 7 транскрипционных элементов и кодируют от 9 до 11 протеинов, каждый элемент кодирует одну мРНК, за исключением элемента P/V. Этот элемент транскрибируется в точную копию мРНК (P или V мРНК, в зависимости от рода) или в альтернативную версию, являющуюся результатом вставки одного или более нематричных нуклеотидов («РНК-редактирование») и перескакиванию рамки считывания на альтернативную ORF. Точная копия и альтернативная версия мРНК синтезируют

разные протеины (P и V), имеющие идентичные аминотерминальные домены, но различающиеся по карбокситерминальным доменам. Другие предполагаемые протеины P и C могут быть генерированы при инициации трансляции с разных кодонов одной ORF. Члены подсемейства *Pneumovirinae* имеют 8 (*Metapneumovirus*) или 10 (*Pneumovirus*) транскрипционных элементов, каждый из которых кодирует одну мРНК. Каждая мРНК кодирует 1 протеин, за исключением мРНК M2, кодирующей два протеина с разных ORFs. Между M2 и L некоторых пневмовирусов происходит перекрывание транскрипционных элементов, но это не оказывает влияние на другие мРНК.

Антигенные свойства. Протеины прикрепления (HN или H, или G) и слияния (F) играют важную роль в формировании вируснейтрализующих антител и иммунитета против реинфекции. При инфекции образуются антитела к N, и другим протеинам вируса. Различные протеины могут быть антигенами для цитотоксических или хелперных Т-клеток.

Биологические особенности. Парамиксовирусы были идентифицированы только у позвоночных, как правило, млекопитающих и птиц. Большинство вирусов имеет узкий спектр естественных хозяев, но способны к репродукции в разных культурах клеток. Инфекция клеток в культуре обычно литическая, но может быть кратковременная или персистентная. Одной из особенностей является образование телец-включений и синцития. Рецепторы клеточной поверхности, сиалогликопротеины и гликолипиды, участвуют в прикреплении респиро- и рубулавирусов. Поверхностный клеточный протеин CD46 является основным рецептором для вируса кори. Нуклеокапсиды ассоциируются с протеинами вирусной мембраны на плазматической мембране, после чего при почковании приобретают липидную мембрану.

Распространение вируса происходит горизонтально, чаще аэрозольно, векторов не определено. Парамиксовирусные инфекции начинаются с респираторного тракта (например, HRSV и HPIV), но могут распространиться на вторичные очаги (например, лимфоидные и эндотелиальные ткани для MeV, эндотелиальные ткани для MuV). Данные инфекции, как правило, ограничены и элиминируются иммунной системой хозяина. Данных о латентной инфекции нет. Долго протекающие перси-

стентные инфекции известны только для подострого склерозирующего панэнцефалита, редких осложнений дефектными вирусами кори, и чумы собак у старых животных, когда персистенция дефектных или инфекционных вирусных частиц продолжается в течение недель и месяцев (особенно у организмов с иммунными сдвигами).

14.2.3.3.1 Подсемейство: *Paramyxovirinae*

Род: *Respirovirus, Rubulavirus, Morbillivirus.*

Характерные особенности. Члены данного подсемейства имеют от 5 до 7 транскрипционных элементов. Представители разных родов имеют сходство по сиквенсам соответствующих протеинов, среди которых NP, M и L являются наиболее консервативными протеинами, F и HN – менее консервативными, а протеин P – низкоконсервативен, хотя уникальный участок V, имеет высокую степень гомологии. Подразделение на роды основано на филогенетическом группировании, в основе которого лежит анализ сходства аминокислотных сиквенсов, исключение составляет NDV, занимающий промежуточное положение между родами *Respirovirus* и *Rubulavirus* .(у NDV наблюдается редактирование РНК как у *Respirovirus,* но он не имеет протеина C, а имеет гликопротеины, подобные *Rubulavirus).* Их нуклеокапсид имеет диаметр 18 нм с шагом 5,5 нм; длина поверхностных спайков 8 нм. Редактирование транскрипционного элемента РНК P/V отмечается у всех членов, кроме HPIV-1. Все представители подсемейства проявляют гемагглютинирующую активность.

Род: *Respirovirus*

Типовой вид: *Sendai virus* (SeV) (вирус Сендай).

Характерные особенности. Члены данного рода имеют гемагглютинин и нейраминидазу. Идентифицировано 6 транскрипционных элементов. Все кодируют C-протеин, нередактированная P мРНК кодирует P и C, тогда как вставка в эту мРНК нуклеотида G приводит к появления V ORF. Аминокислотная идентичность внутри рода значительно варьирует, в зависимости от протеина, и всегда выше, чем при сравнении с рубула- и морбилливирусами. Например, между респировирусами

гомология по протеину NP составляет 88 % (ITPIV-1 и SeV), 63 % – при сравнении HP1V-2 и HPIV-3. Между родами сходство по протеину NP составляет 18 % – для HPIV-1 *(Respirovirus)* и MuV, HPIV-2 и HPIV-4 *(Rubulavirus),* и 21 % при сравнении с MeV *(Morbillivirus)*.

Критерии подразделения на виды внутри рода. HPIV-1 и IIPIV-3 представляют разные серотипы, определенные на основе перекрестной нейтрализации и перекрестной защиты. Их генетические карты сходны, но не идентичны (HPIV-3 редактирует протеин D, но не V, тогда как у HPIV-1 редактирования нет). SeV является мышиным HPIV-1, который отличается от HPIV-1 по спектру восприимчивых хозяев (HPIV-1 пермиссивен и патогенен для человека, тогда как в мышах практически не репродуцируется и для них не патогенен; SeV – пермиссивен и патогенен для мышей). Оба эти вирусы сходны по сиквенсу и антигенным свойствам, но у HPIV-1 нет редактирования протеина V. BPIV-3 отличается от HP1V-3 по спектру восприимчивых хозяев. Например, HPIV-3 у человека эффективно репродуцируется, легко передается и вызывает болезнь, тогда как BP1V-3 – для человека непатогенен и плохо передается. Более того, при сравнении HPIV-3 и BPIV-3 обнаруживается генетическое сходство, но и значительные отличия. Например, HPIV-3 и BPIV-3 проявляют 25 % антигенного родства в перекрестной нейтрализации и реакции подавления гемагглютинации. Кроме этого, BPIV-3 образует протеин V, тогда как HPIV-3 – нет. Официально зарегистрировано 5 видов.

Род: *Rubulavirus*

Типовой вид: *Mumps virus* (MuV) (вирус эпидемического паротита (свинки)).

Характерные особенности. Члены данного рода проявляют гемагглютинирующую и нейраминидазную активность. Родство по сиквенсу внутри рода выше, чем при сравнении с членами других родов. Например, идентичность по протеину NP HPIV-2 составляет от 39 % до 74 % при сравнении с MuV, SV-5, HPIV-4 и SV-41, и от 18 % до 24 % – при сравнении с HPIV-1 и MeV. Некоторые члены рода (SV-5 и MuV) содержат экстратранскрипционный элемент (SH) между участками F и HN. Оригинальная и редактированная версии мРНК кодируют протеины V и P, соответственно, за исключением NDV, сходного по данному параметру с членами рода *Res-*

pirovirus. Межгенные последовательности разной длины. Все представители данного рода не имеют ORF протеина C. Протеин P членов рода *Rubulavirus* существенно меньше, чем у респиро- или морбилливирусов.

Критерии подразделения на виды внутри рода. HPIV-2 и HP1V-4 представляют разные серотипы, определенные на основе перекрестной нейтрализации и перекрестной защиты. HPIV-2, SV-5 и SV-41 имеют существенное родство по сиквенсам и антигенным свойствам, но отличаются по другим параметрам (например, протеин NP HPIV-2 имеет гомологию на 57 % и 74 %, соответственно с SV-5 и SV-41), и спектру хозяев: HPIV-2, HPIV-4a и HPIV-4b инфицируют человека, SV-5 – собак, обезьян и человека, SV-41 – обезьян. Они имеют различия и в генетической карте: SV-5 имеет добавочный ген SH, у SV-41 нет сигнала терминации транскрипции для гена M, и, поэтому, не экспрессируется моноцистронная M мРНК. HPIV-4a и b различаются по реактивности с моноклональными антителами, но близкородственны по сиквенсу (95 % и 97 %, соответственно) протеинов NP и M, и не могут считаться разными видами. MuV не проявляет значительной активности в перекрестной нейтрализации и перекрестной защите с другими парамиксовирусами, имеет отличающуюся генетическую карту (содержит ген SH, который обнаруживается в этой группе только у SV-5), отличается по дивергенции сиквенсов (протеин NP MuV имеет аминокислотную идентичность не более 44 % с другими рубулавирусами), отличается по вызываемой болезни. NDV (вирус парагриппа типа 1 птиц) отличается от других рубулавирусов по редактированию мРНК, кодирующей V, но не P. Он также отличается по аминокислотному составу. Различные парамиксовирусы птиц являются серотипами, определяемыми в реакции ингибиции (задержки) гемагглютинации, хотя слабая реактивность просматривается между видами. Каждый серотип имеет отдельный профиль электрофоретического разделения полипептидов. Официально зарегистрировано 16 видов.

Род: *Morbillivirus*

Типовой вид: *Measles virus* (MeV) (вирус кори).

Характерные особенности. Долгое время основной характерной чертой представителей данного рода было отсутствие нейраминидазы, однако, недавно

нейраминидазная активность была показана в отношении RPV. Члены данного рода проявляют большее родство по аминокислотному сиквенсу между собой, чем с представителями других родов того же подсемейства. Они имеют одинаковую организацию генома, количество транскрипционных элементов и длину межгенных последовательностей с представителями рода *Respirovirus*. Все морбилливирусы имеют транскрипционную единицу P / C / V с редактированием РНК как у ретровирусов (точная копия мРНК кодирует P, а редактированная (с добавлением одного нуклеотида G) – V). Все морбилливирусы образуют внутрицитоплазматические и внутриядерные тельца-включения, содержащие вирусные рибонуклеокапсиды. Вирусы проявляют перекрестную реактивность в серологических тестах. Сиаловая кислота не является рецептором для морбилливирусов. Наличие рецепторов у узкого круга хозяев определяет их восприимчивость к вирусам. Для вируса кори таким рецептором является CD46.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Морбилливирусы подразделяются по спектру восприимчивых животных, нуклеотидным сиквенсам и антигенным свойствам. Между видами, в зависимости от исследуемого протеина, просматривается невысокое и среднее родство по сиквенсу (например, NP MeV и CDV имеют родство 65 %). Между видами проявляется активность в перекрестной нейтрализации и перекрестной защите, хотя эти признаки могут быть использованы для идентификации видов. MeV инфицирует приматов, CDV инфицирует членов отрада *Carnivora* (плотоядные), а RPV и PPRV (*Peste-deS'petits-ntminants virus*) – членов отряда *Artiodactyla* (парнокопытных, особенно жвачных и свиней). PPRV отличается от RPV по сиквенсу (по протеину NP PPRV проявляет от 68 % до 72 % гомологии с MeV, RPV и CDV) и по спектру восприимчивых животных (у КРС вызывает инфекцию не всегда). *Phocine distemper virus* (PDV) наиболее близок CDV, но отличается по спектру восприимчивых хозяев и дивергенции сиквенсов. Вирусы чумы дельфинов и морских свиней являются близкородственными между собой и близки RPV и MeV, но отличается по спектру восприимчивых хозяев и дивергенции сиквенсов. Официально зарегистрировано 6 видов.

14.2.3.3.2 Подсемейство: *Pneumovirinae*

Род: *Pneumovirus, Metapneumovirus*

Характерные особенности. Члены данного подсемейства отличаются от представителей подсемейства *Paramyxovirinae* по следующим признакам:

а) имеют от 8 до 10 транскрипционных элементов;

б) меньше средний размер ORF;

в) имеют один дополнительный негликозилированный ассоциированный с нуклеокапсидом протеин M2;

г) большее O-связанное гликозилирование протеина G

д) локус P кодирует один протеин, и РНК не подвергается редактированию;

е) отсутствие сходства по аминокислотному сиквенсу, кроме незначительного сходства протеинов F и L;

ж) диаметр нуклеокапсида составляет от 13 нм до 14 нм (тогда как у представителей подсемейства *Paramyxovirinae* – 18 нм);

и) шаг спирали нуклеокапсида составляет 7 нм;

к) длина гликопротеиновых спайков составляет от 10 нм до 14 нм.

Виды вирусов, входящие в состав подсемейства *Pneumovirinae* род *Pneumovirus* не имеют нейраминидазы. Гемагглютинин отсутствует у BRSV и HRSV, но есть у MPV. Протеин G структурно не родственен протеинам HN и H других родов семейства *Paramyxoviridae* и проявляет высокий уровень различия между штаммами: идентичность между изолятами HRSV составляет всего 53 %, а между респираторно-синцитиальным вирусами человека и животных – всего от 21 % до 30 %.

Род: *Pneumovirus*

Типовой вид: *Human respiratory syncytial virus* (HRSV) (респираторно-синцитиальный вирус человека).

Характерные особенности. HRSV и MPV различаются по спектру восприимчивых хозяев (человек и мыши, соответственно) и отсутствию (или очень слабой) перекрестной нейтрализации. В зависимости от исследуемого протеина этих вирусов уровень гомологии по аминокислотным сиквенсам варьирует от невыявляемого

до среднего (например, между протеинами NS1 и NS2 сходства не обнаруживается, тогда как протеины NP и F проявляют гомологию на 62 % и 40 %, соответственно). Их генетические карты различаются только по отсутствию у MPV перекрывания в гене M2/L. BRSV и HRSV отличаются между собой по спектру восприимчивых хозяев (КРС и человек, соответственно), хотя и не абсолютно. Например, оба вируса эффективно репродуцируются в культурах клеток человека и КРС, хотя может просматриваться некоторая специфичность. У шимпанзе HRSV эффективно репродуцируется, распространяется между особями, обладает патогенностью, тогда как BRSV в данном случае считается авирулентным и непатогенным. Оба вируса имеют значительное сходство по сиквенсам и антигенным свойствам, но и легко могут быть различены по этим признакам. Например, между BRSV и HRSV идентичность протеинов F и NP составляет 81 %, тогда как между штаммами HRSV эти значения достигают 89 % и 96 %, соответственно. Антисыворотки против одного вируса способны нейтрализовать другой (но в разной степени). У HRSV выделяется две антигенные подгруппы A и B, у которых аминокислотная идентичность варьирует от 96 % (N) до 53 % (G), гомология по нуклеотидным сиквенсам протеинов F и G составляет 50 % и 5 %, соответственно, а различие по взаимной перекрестной нейтрализации доходит до четырехкратного. Схожий антигенный диморфизм также может существовать и у BRSV. Официально зарегистрировано 3 вида.

Род: *Metapneumovirus*

Типовой вид: *Turkey rhinotracheitis virus* (TRTV) (вирус ринотрахеита индеек).

Характерные особенности. Относительное расположение генов SH-G против F-M2 является противоположным при сравнении с пневмовирусами. Нет генов NS1 и NS2, присутствующих у пневмовирусов. Вирионы не содержат гемагглютинина и нейраминидазы.

Неклассифицированные вирусы семейства. Помимо двух идентифицированных вирусов, обозначаемых Fer-de-Lance virus рептилий (FDLV) и Nariva virus (NARV) грызунов, известно еще несколько вирусов, выделенных от пингвинов, и отличающихся от парамиксовирусов. Более того, вирус Hendra, родственный подсемейству *Paramyxovirinae* (родственны гены F, H, M, H и P, V, C), был выделен от

растительноядных летучих мышей и лошадей в Queensland (Австралия). Известно два случая летальной инфекции у людей, заразившихся вирусом, выделенным от лошадей.

Сходство с другими таксонами. Стратегия экспрессии генома, репликация и структура генома членов данного семейства сходна с таковыми других семейств порядка *Mononegavirales* (*Rabdoviridae, Filoviridae*).

14.2.3.4 Семейство: *Rhabdoviridae*

Род: *Vesiculovirus, Lyssavirus, Ephemerovirus, Novirhabdovirus, Cytorhabdovirus, Nucleorhabdovirus*

Морфология. Вирион имеет пулевидную или конусовидную форму (длина от 100 нм до 430 нм; диаметр от 45 нм до 100 нм). Вирусы, инфицирующие растения имеют бациллоподобную, пулевидную форму или плеоморфны. Внешняя поверхность вириона покрыта выступами (пепломерами) длиной от 5 нм до 10 нм и диаметром 3 нм, образованными тримерами гликопротеина G. Нуклеокапсид от 30 нм до 70 нм в диаметре, спиральной симметрии, окружен липопротеидной оболочкой, имеющий длину в развернутом виде 700 нм и диаметр 20 нм. Нуклеокапсид представляет собой комплекс РНК и протеина N, вместе с протеинами L и P. Гликопротеин G, входящий в состав липидной оболочки, взаимодействует с нуклеокапсидом через протеин M. Нуклеокапсид инфекционен и проявляет транскриптазную активность.

Mr (вирион) от 300×10^6 до 1000×10^6; плавучая плотность в CsCl от 1,19 г/см^3 до 1,20 г/см^3, в сахарозе – от 1,17 г/см^3 до 1,19 г/см^3. Инфекционность вируса резко снижается при 56 °C, УФ или рентгеновском облучении, при обработке жирорастворителями.

Геном. РНК односпиральная, линейная, с негативной полярностью; размер от 11 kb до 15 kb; Mr от $4{,}2 \times 10^6$ до $4{,}6 \times 10^6$, от 1 % до 2 % от веса частицы. РНК неполиаденилирована, имеет 5'-концевой трифосфат. Концы содержат инвертированные комплементарные последовательности. При выделении РНК из вирусной попу-

ляции могут обнаруживаться дефектные РНК, которые обычно значительно короче полноразмерных (более чем в 2 раза), с негативной полярностью, иногда имеющие шпилечную структуру. Дефектные вирусы могут репродуцироваться только в присутствии гомологичных или реже гетерологичных рабдовирусов-помощников, содержащих функциональные гены. Полноразмерная РНК с позитивной полярностью встречается в общей РНК-популяции вирусов в 5 % случаев.

Другие компоненты вириона. Вирионы имеют в своем составе 5 структурных полипептидов, обозначаемых L, G, N, P и M.

Протеин L (Mr от 220×10^3 до 240×10^3; наблюдаемый размер в SDS-PAGE от 150×10^3 до 190×10^3) является компонентом вирусного нуклеокапсида, принимает участие в транскрипции и репликации. Проявляет активность РНК-зависимой РНК полимеразы и протеинкиназы.

Протеин G (Mr от 220×10^3 до 240×10^3) образует поверхностные пепломеры. Протеин G гликозилирован по N-связям. Участвует в проникновении вируса в клетку (прикрепление к клеточным рецепторам, слияние мембран и эндоцитоз), индуцирует образование вируснейтрализующих антител и клеточно-опосредованного иммунного ответа. Проявляет гемагглютинирующую активность.

Протеин N (Mr от 47×10^3 до 62×10^3) является мажерным компонентом вирусного нуклеокапсида, ассоциированным с полноразмерной РНК (негативной или позитивной полярности, с дефектными, но не с мРНК). Вновь синтезированные молекулы протеина N участвуют в регуляции транскрипции генома, репликации и считывании сигналов терминации транскрипции и полиаденилирования. Индуцирует развитие клеточно-опосредованного иммунного ответа и образование антител.

Протеин P (Mr от 20×10^3 до 30×10^3) является компонентом вирусной полимеразы. Он фосфорилирован и имеет размер в SDS-PAGE от 40×10^3 до 50×10^3. Растворимая форма обнаруживается в цитоплазме инфицированных клеток. Участвует в транскрипции; может предотвращать самоагрегирование протеина N и принимать участие в его ассоциации с РНК. Участвует в развитии клеточно-опосредованного иммунного ответа.

Протеин M (Mr от 20×10^3 до 30×10^3) является основным внутренним компонентом вириона. В некоторых случаях фосфорилирован. Связан с нуклеокапсидом и цитоплазматическим доменом гликопротеина G. Участвует в регуляции транскрипции геномной РНК, ингибирует транскрипцию клеточной ДНК (обнаруживается в ядрах клеток).

Структурные протеины составляют от 65 % до 75 % сухого веса вирусных частиц. Для протеинов некоторых вирусов ранее использовалась другая номенклатура: протеин P (NS, Ml или M2) и протеин M (Ml или M2). Для вируса везикулярного стоматита Индиана *(Vesicular stomatitis Indiana virus,* VSIV) определено следующее количество молекул протеинов в одной вирусной частице: L от 20 до 50; G от 500 до 1500; N от 1000 до 2000; P от 100 до 300; M от 1500 до 4000. Для вирионов описан ряд видов активности, соответствующих следующим ферментам: РНК транскриптаза (L и P), 5′-кэпирующий энзим, гуанил- и метилтрансферазы, протеинкиназа (кодируемая вирусом или клеткой), нуклеозидтрифосфатаза и нуклеозиддифосфаткиназа. Вероятно, данными свойствами обладает протеин L.

От 15 % до 25 % вирионы состоят из липидов, производных клеточной мембраны, через которую происходило почкование вируса. Фосфолипиды составляют от 55 % до 60 %, стеролы и гликолипиды – от 35 % до 40 % всех липидов.

Углеводы составляют 3 % сухого веса частицы. Они представлены в виде N-связанных гликановых цепей протеина G и гликолипидов. В клетках млекопитающих, в отличие от клеток насекомых, олигосахаридные цепи обычно сложного типа.

Организация генома и репликация. Вирусы имеют не менее 5 ORFs располагающиеся в геноме с негативной полярностью в следующем порядке (для VSIV): 3'-N-P-M-G-L-5'. Для некоторых вирусов определены дополнительные гены. Гены транскрибируются как 5'-кэпированные и 3'-полиаденилированные моноцистронные мРНК. Для некоторых вирусов описаны полицистронные мРНК. Короткая некэпированная, неполиаденилированная и нетранслируемая «лидерная» мРНК, комплементарно соответствующая 3'-концу вирусной РНК (например, предшествующая N мРНК) также транскрибируется. В отличие от мРНК она имеет 5'-трифосатированный конец. Данная РНК обнаруживается в ядре инфицированных

клеток. Для отдельных вирусов показано, что мРНК обычно имеет общую 5'-концевую последовательность. Межгенные сиквенсы обычно короткие, реже могут достигать в длину до 50 нуклеотидов. В некоторых случаях 5'-конец мРНК может перекрывать 3'-конец предыдущего гена.

Адсорбция вируса начинается с прикрепления протеина G к поверхностным клеточным рецепторам, что приводит к его проникновению внутрь клетки путем эндоцитоза. После проникновения вирусная оболочка удаляется за счет лизосомной активности и транскрипционно активный нуклеокапсид (РНК, N, L, P) оказывается в цитоплазме. Вирусная РНК транскрибируется (первичная транскрипция) вирусной транскриптазой в кэпированные полиаденилированные мРНК, которые транслируются в цитоплазматических полисомах. Трансляция G мРНК происходит на мембрано-связанных полисомах. После трансляции мРНК, в цитоплазме происходит репликация РНК (синтез полноразмерных позитивных и негативных цепей РНК). У некоторых видов мРНК рабдовирусов растений репликация РНК происходит в ядре клетки (рисунок 53).

Для репликации необходимы вновь синтезированные протеины N, P и L, участвующие в формировании промежуточных репликативных комплексов. После репликации происходят следующие раунды транскрипций (вторичная транскрипция), трансляции и репликации. Посттрансляционные события протеина G включают транспортировку через мембраны эндоплазматического ретикулума, удаление аминоконцевой сигнальной последовательности и гликозилирование в аппарате Гольджи.

В зависимости от клеток, протеин G может двигаться к плазматической мембране, особенно к базолатеральной поверхности поляризованных клеток.

Сборка вирусных нуклеокапсидных структур происходит в ассоциации протеина M и липидных оболочек, содержащих протеин G. Место формирования частиц зависит от вируса и клетки-хозяина. У везикуло-, лисса-, эфемеро- и новирабдовирусов нуклеокапсиды синтезируются в цитоплазме, и вирусы почкуются через плазматическую мембрану большинства, но не всех, клеток. Некоторые лиссавирусы почкуются преимущественно через внутрицитоплазматические мембраны, обра-

зуя, в некоторых случаях, вирусспецифические цитоплазматические включения, содержащие протеин N (тельца-включения вируса бешенства, называемые тельца Негри**).**

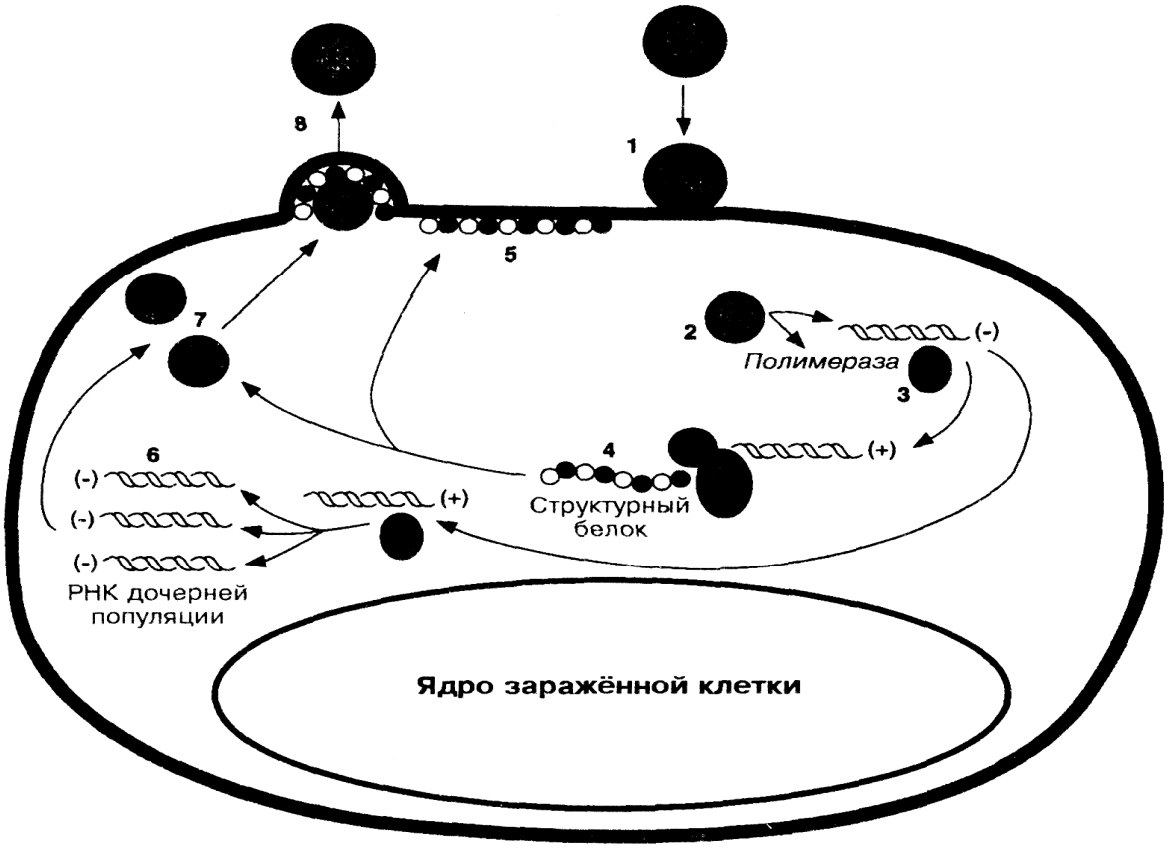


Рисунок 53 – Репликативный цикл -РНК-содержащих вирусов на примере репродукции рабдовирусов

Проникновение вируса осуществляется после адсорбции и слияния с клеточной оболочкой (1). После *раздевания* (2) вирусная -РНК трансформируется в плюс-цепь РНК-зависимой РНК-полимеразой, входящей в состав вириона (3), что приводит к образованию полных и коротких цепей. Короткие +РНК-цепи обусловливают синтез ферментов и белков для дочерних популяций (4), среди последних особую значимость имеет гликопротеин оболочки (5), встраивающийся в клеточную стенку на этапах, предшествующих отпочковыванию. Полная цепь +РНК служит матрицей для синтеза молекул -РНК дочерних популяций (6). Нуклеокапсиды (образуются из синтезированных белков) и -РНК прикрепляются к модифицированным участкам клеточной стенки (7), отщепляют фрагмент липидного слоя (что завершает процесс сборки) и отделяются почкованием (8).

Циторабдовирусы почкуются через внутрицитоплазматические мембраны, ассоциированные с виропламами. Нуклеорабдовирусы почкуются через внутреннюю ядерную мембрану и накапливаются в перинуклеарном пространстве.

В зависимости от вируса и клетки-хозяина, может наблюдаться ингибирование синтеза клеточных макромолекул, однако механизм этого не ясен.

Шесть родов были идентифицированы на основе значительных различий в организации генома, аминокислотных сиквесов структурных протеинов, очагов репликации и по спектру восприимчивых хозяев. Анализ филогенетического родства на основе доступных сиквенсов протеинов N, G и L позволяет отнести тот или иной вид в один из родов.

Антигенные свойства. Протеин G участвует в нейтрализации и определяет серотип вируса. Протеин N проявляет свойства комплементсвязывающего антигена с перекрестной активностью. Между вирусами, относящимися к разным родам, может проявляться слабая перекрестная серологическая активность. Защита может быть достигнута с использованием вакцин на основе аттенуированного или инактивированного вируса, субъединиц, имеющих протеин G (один или в комплексе с рибонуклеопротеидом), или векторов, экспрессирующих протеины G или N.

Биологические особенности. Виды вирусов данного семейства инфицируют млекопитающих, рыб, членистоногих и других беспозвоночных. Некоторые представители имеют как позвоночных, так и беспозвоночных хозяев. Отдельные вирусы инфицируют растения и определимые виды растительноядных насекомых. Некоторые вирусы позвоночных имеют широкий спектр восприимчивых хозяев. Многие культуры клеток из тканей позвоночных и беспозвоночных восприимчивы к рабдовирусам позвоночных *in vitro.* Вирусы растений обычно имеют узкий спектр хозяев среди высших растений, некоторые реплицируются в насекомых (векторах) и накапливаются в культурах клеток насекомых. Вирус сигма *(Sigma virus,* SIGMAV) впервые был идентифицирован как агент, вызывающий конгенитальную инфекцию у дрозофил *(Drosophila).* Вертикальной передачи рабдовирусов не наблюдается. Некоторые вирусы растений переносятся механически. В качестве векторов могут быть москиты, мухи, клещи, комары, тля, прыгунки и т.п. Некоторые вирусы могут пере-

даваться механически с жидкостями инфицированного организма. Распространение вирусов позвоночных может быть контактным, аэрозольным, через укус или при половом контакте.

Род: *Vesiculovirus*

Типовой вид: *Vesicular stomatitis Indiana virus* (VSIV) (вирус везикулярного стоматита Индиана).

Характерные особенности. Везикуловирусы имеют 5 мажерных полипептидов (L, G, N, P и M). Геном (11,2 kb) включает лидерную последовательность (50 нуклеотидов) предшествующую N, нетранслируемый участок (60 нуклеотидов), следующий за L, и межгенные последовательности. Некоторые вирусы, например, вирус летучих мышей Mount Elgon (*Mount Elgon bat virus*, MEBV) и вирус Kwatta (*Kwatta virus*, KWAV), значительно крупнее типового.

Биологические особенности. Вирусы данного рода были выделены от различных животных, включая млекопитающих, рыб и членистоногих (насекомых). Везикулярный стоматит лошадей, КРС, свиней является одной из давно известных болезней (впервые была описана и дифференцирована от ящура в начале 19 века). Вспышки болезни периодически отмечаются в западном полушарии. Болезнь проявляется хромотой у лошадей и свиней, и потерей молочной продуктивности – у коров. Ряд везикуловирусов (*Chandipura virus,* CHPV; *Cocal virus,* COCV; *Isfahan virus,* 1SFV; *Piry virus,* PIRYV; *Vesicular stomatitis Alagoas virus,* VSAV; *Vesicular stomatitis Indiana virus,* VSIV; *Vesicular stomatitis New Jersey virus,* VSNJV) также инфицируют человека. В районах, где данные вирусы эндемичны, часто обнаруживаются антитела к ним у людей, живущих в сельской местности. Естественное или лабораторное инфицирование сопровождается гриппоподобными симптомами. Многие везикуловирусы, инфицирующие млекопитающих, были выделены от естественно инфицированных членистоногих (*phlebotomine sandfly*), что предполагает их арбовирусную природу. Некоторые везикуловирусы вызывают эпизоотии среди рыб и могут передаваться их эктопаразитами.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Представители данного рода проявляют перекрестную активность в реакции связывания комплемента и реакции

иммунофлюоресценции; перекрестная нейтрализация проявляется слабо или не проявляется. Сравнение сиквенса геномов показало их сходство. Гомология сиквенсов протеина N между видами составляет 49 % (HCPIV и VSNJV) и 68,9 % (VSIV и VSNJV). Официально зарегистрировано 9 основных и 19 предполагаемых видов.

Род: *Lyssavirus*

Типовой вид: *Rabies virus* (RABV) (вирус бешенства).

Характерные особенности. Лиссавирусы (например, вирус бешенства) имеют 5 мажерных полипептидов: L (Mr 190×10^3), G (Mr от 65×10^3 до 80×10^3), N (Mr от 58×10^3 до 62×10^3), P (Mr от 35×10^3 до 40×10^3) и M (Mr от 22×10^3 до 25×10^3). Протеин G вируса бешенства может быть гликозилирован только по двум из трех сайтов для N-связанных гликанов. N и P – фосфопротеины. Геном вируса бешенства (11,9 kb) включает 3'-концевую последовательность (60 нуклеотидов) предшествующую N; нетранслируемый участок (70 нуклеотидов), следующий за L; межгенные ди- или пентануклеотиды, или спейсер (423 нуклеотида) между G и L штамма PV вируса бешенства. Межгенные сиквенсы лиссавирусов сходны с таковыми везикуловирусов. В инфицированных нейронах вирус бешенства индуцирует образование телец Негри.

Биологические особенности. Бешенство энзоотично во всех регионах мира кроме Антарктики. Великобритания, Ирландия и Япония свободны от бешенства. Резервуаром инфекции в природе являются многие виды летучих мышей, скунсы, мангусты, еноты, лисы, волки, шакалы, собаки и др. Во многих регионах важной проблемой остается передача инфекции от собак человеку. Передача вируса происходит, как правило, при укусе со слюной (описаны случаи передачи инфекции при трансплантации роговицы). Вирус бешенства нейротропен, репродуцируется в нейронах, и клетках других органов (например, слюнных желез) позвоночных. В клетках, инфицированных вирусом бешенства, не ингибируется синтез клеточных макромолекул.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Антигенные сайты протеина N проявляют перекрестную активность в реакции связывания комплемента и реак-

ций иммунофлюоресценции, и дают возможность идентифицировать представителей данного рода. Антигенные сайты протеина G, распознаваемые в реакции нейтрализации, позволяют идентифицировать вид изолята. Перекрестная нейтрализующая активность антител, специфичных вирусу бешенства, может быть средней (в отношении *European bat lyssavirus 1,* EBLV-1; *European bat lyssavirus 2,* EBLV-2; *Duvenhage virus,* DUVV) или очень низкой (в отношении *Lagos bat virus,* LBV; *Mokola virus,* MOKV). Эти данные, вместе с данными, полученными на основе моноклональных антител, позволяют подразделить род на 4 серотипа (1 – *Rabies virus* (RABV), 2 – *Lagos bat virus,* LBV, 3 – *Mokola virus,* MOKV и 4 – *Duvenhage virus,* DUVV) и 2 биотипа лиссавирусов европейских летучих мышей (EBLV-1 и EBLV-2). Генетический анализ некоторых участков генома (N, P и G) в совокупности с данными по антигенным свойствам, позволил подразделить представителей рода на 7 геногрупп (1 – RABV, 2 – LBV, 3 – MOKV, 4 – DUVV, 5 – EBLV-1, 6 – EBLV-2, 7 – ABLV). Гомология по аминокислотному сиквенсу протеина M варьирует от 78 % (MOKV и EBLV-2) до 93 % (DUVV и EBLV-1).

Вирусы Kotonkon и Obodhiang, входившие ранее в состав рода, теперь считаются как неклассифицированные, так как данные, полученные на основе серологических и молекулярно-биологических исследований свидетельствуют об их родстве с представителями рода *Ephemerovirus*. Официально зарегистрировано 7 видов и 1 предполагаемый вид *Rochambeau virus* (RBUV)

Род: *Ephemerovirus*

Типовой вид: *Bovine ephemeral fever virus* (BEFV) (вирус эфемерной лихорадки крупного рогатого скота).

Характерные особенности. Вирион пуле- или конусовидной формы (длина от 140 нм до 200 нм, диаметр от 60 нм до 80 нм); плавучая плотность в CsCl 1,19 г/см^3. Вирион наиболее стабилен при pH от 7 до 8, чувствителен к кислой и щелочной среде.

Частицы вируса эфемерной лихорадки КРС (BEFVJ содержат не менее 5 структурных протеинов: L (Mr 180 × 10^3), G (Mr 81 × 10^3), N (Mr 52 × 10^3), P (Mr 43 × 10^3) и M (Mr 29 × 10^3). Протеин G может быть гликозилирован по пяти сайтам N-

связывания. Протеины N и M -фосфорилированы. В клетках, инфицированных BEFV, обнаружен дополнительный, не входящий в состав вириона, сильно гликозилированный протеин G_{NS} (Mr 90×10^3). Между протеинами G и G_{NS} обнаруживается гомология, проявляющаяся в меньшей степени с протеином G других рабдовирусов позвоночных.

Геном BRMV (14,9 kb) содержит 10 генов и межгенные участки от 26 до 53 нуклеотидов.

Протеин G BEFV имеет 4 сайта вирусной нейтрализации. Очищенный или рекомбинантный протеин G защищает КРС от инфекции. Протеин G_{NS} не индуцирует образование вируснейтрализующих антител и не обладает протективной активностью.

Биологические особенности. Эфемерная лихорадка КРС является экономически значимой болезнью КРС и водяных буйволов (water buffalo) в тропических и субтропических регионах Африки, Австралии, Среднего Востока и Азии. Инфекция, вызванная BEFV, проявляется внезапной лихорадкой и рядом других клинических признаков, таких как хромота, анорексия, нарушение моторики рубца, и длительным снижением молочной продуктивности. Хотя уровень смертности низок (от 1 % до 2 %), он выше у высокопродуктивных пород КРС. BEFV – арбовирус (распространяется кровососущими членистоногими, в которых может репродуцироваться), выделен от комаров и москитов.

Другие вирусы рода не ассоциируются с патологией животных, хотя некоторые были выделены от КРС (ARV и BRMV) и насекомых (Kimberley virus, KIMV; Malakal virus, MALV; Puchong virus, PUCV).

Критерии подразделения на виды внутри рода. Между видами перекрестная активность в реакции нейтрализации проявляется слабо или не проявляется вовсе. Сильная перекрестная активность наблюдается в реакции связывания комплемента и реакции иммунофлюоресценции. В реакции непрямой иммунофлюоресценции может отмечаться слабая перекрестная активность с лиссавирусами. Однако сравнительный анализ сиквенсов вирусов данного рода и других рабдовирусов показал наибольшую эволюционную близость эфемеровирусов с везикуловирусами. Анализ

аминокислотных сиквенсов BEFV и ARV показал высокую степень гомологии многих соответствующих протеинов, с наибольшей гомологией у протеинов L и N, и несколько меньшей – у G. По протеину N идентичность составляет 48 %. Для других вирусов данных по аминокислотным сиквенсам нет. Только вирусы, кодирующие гликопротеины G-G_{NS}, считаются официально идентифицированными. Официально зарегистрировано 3 основных и 3 предполагаемых вида.

Род: ***Novirhabdovirus***

Типовой вид: *Infectious hematopoietic necrosis virus* (IHNV) (вирус инфекционного гематопоэтического некроза).

Характерные особенности. Род включает одну из двух подгрупп рабдовирусов, инфицирующих хозяев, обитающих в воде. Представители другой подгруппы (представляемой Spring viremia of carp virus), на основе доступных данных по сиквенсам, получили статус предполагаемых видов рода *Vesiculovirus*.

Температура, необходимая для репродукции, обычно от 15 °C до 28 °C, а температура инактивации значительно ниже, чем для других рабдовирусов, что связано с особенностью хозяев, являющихся пойкилотермными животными, и их географическим распространением.

Вирионы содержат 5 структурных протеинов: L (Mr от 150×10^3 до 225×10^3), G (Mr от 63×10^3 до 80×10^3), N (Mr от 38×10^3 до 47×10^3), P (Mr от 22×10^3 до 26×10^3), обозначаемый ранее как Ml, и M (Mr от 17×10^3 до 22×10^3), обозначаемый ранее как M2. Определен один небольшой неструктурный протеин NV (Mr от 12×10^3 до 14×10^3), экспрессируемый инфицированными клетками, но отсутствующий в очищенных вирионах, Между видами уровень гомологии данного протеина значительно меньше, чем других.

Геном (11,1 kb) содержит 6 генов (в порядке: 3'-N-P-M-G-NV-L-5'). Для IHNV известно, что геном содержит лидерный участок (около 60 нуклеотидов), предшествующий участку начала транскрипции гена N. и участок, следующий за сайтом терминации транскрипции гена L. Гены начинаются либо с предполагаемого консервативного сигнала начала транскрипции 3'-CCRWG, либо с сигнала 3'-UUGU, который

также найден у большинства генов выше сайта инициации трансляции. Сигнал терминации транскрипции -3'-ACURUC(U)7, а длина межгенных участков – 1 нуклеотид (G или A).

Биологические особенности. Новирабдовирусы инфицируют многие виды рыб. Спектр естественных хозяев отдельных видов достаточно широк, часто включая несколько разных видов рыб (например, лососевых и сельдевых). Передаются горизонтально (через воду). Отмечены случаи распространения вируса через контаминированную икру. Естественными резервуарами вирусов считаются рыбы, живущие в естественных условиях. Предполагается о существовании беспозвоночных переносчиков, но их роль пока не ясна. Показано вирусоносительство рыб, после переболевания, вызванного IHNV, но значимость данного феномена тоже не ясна.

Новирабдовирусы имеют широкое географическое распространение. IHNV энзоотичен на западе Северной Америки, однако случайная транспортировка контаминированной вирусом икры и инфицированной рыбы привели к распространению вируса в Европе, Корее, Японии и Китае. VHSV энзоотичен в Западной Европе, Северо-Восточной части Тихого океана, Балтийском и Северном морях. *Hirame rhabdovirus* (HIRRV) выделен только в Японии.

Виды данного рода вызывают экономически значимые болезни у культивируемых рыб. Вспышки болезней, обусловленных IHNV и VHSV, сопровождались гибелью от 50 % до 100 % поголовья лососевых, разводимых в искусственных условиях. Сообщалось об эпизоотиях, вызванных IHNV, среди дикоживущих лососевых. IHNV и VHSV вызывают болезнь, сопровождающуюся геморрагическими петехиями на внешней поверхности и внутренних органах.

При гистопатологическом исследовании наибольшие дегенеративные изменения и некрозы обнаруживаются в почках, и гематопоэтической ткани.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Внутри рода виды могут быть определены серологически, на основе перекрестной нейтрализации с использованием поликлональной кроличьей антисыворотки. Штаммы внутри вида нейтрализуются одной антисывороткой. IHNV и HIRRV представляют собой отдельные серотипы, а VHSV имеет один мажерный серотип с небольшим числом штаммов.

Вирусы разных видов не проявляют перекрестной нейтрализующей активности, хотя при анализе в Western-blot слабая активность может проявляться со специфическими протеинами. Анализ нуклеотидных сиквенсов совпадает с разделением на виды на основе серологических данных. Для штаммов одного вида различая по нуклеотидному сиквенсу составляют от 3 % до 4 % для генов G и NV IHNV и 18 % для гена G Европейских и Северо-Американских VHSV. Идентичность по аминокислотному сиквенсу протеина N между IHNV и VHSV составляет примерно 34 %. Официально зарегистрировано 3 основных и 3 предполагаемых вида.

Род: *Cytorhabdovirus*

Типовой вид: *Lettuce necrotic yellow virus* (LNYV) (вирус желтого некроза салата-латтука).

На основе локализации мест созревания вирусов (в цитоплазме или в ядре) определено 2 рода рабдовирусов растений (*Cytorhabdovirus u Nucleorhahdovirus,* соответственно). Однако существуют исключения и значимость данного признака не ясна. К рабдовирусам растений восприимчивы многие виды растений, хотя некоторые вирусы инфицируют узкий спектр хозяев. Распространение вирусов происходит посредством травоядных членистоногих (в которых также могут репродуцироваться) или контаминированного сока. Циторабдовирусы репродуцируются в цитоплазме в ассоциации с массами нитевидных структур (вироплазм). Предполагается существование ядерной фазы. Официально зарегистрировано 8 видов.

Род: *Nucleorhabdovirus*

Типовой вид: *Potato yellow dwarf virus* (PYDV) (вирус желтой карликовости картофеля).

Инфицируют растения. Репродуцируются в ядре, формируя крупные гранулярные включения. Морфогенез происходит на внутренней ядерной мембране, а оболочечные вирусные частицы скапливаются в перинуклеарном пространстве. Есть переносчики. В настоящее время официально зарегистрировано 7 видов.

Неклассифицированные виды семейства.

Известно 6 серогрупп рабдовирусов животных (всего 20 видов), не включенных в данные роды, а также ряд негруппированных вирусов (37 вирусов животных и

58 вирусов растений).

Филогенетическое родство внутри семейства. Для протеинов G показана относительно низкая идентичность сиквенсов разных представителей семейства, что не позволяет их использовать для универсального определения филогенетического родства. Сиквенс протеина L наиболее консервативен. Универсальное определение филогенетического родства, основанное на анализе сиквенса протеина N (119 аминокислот), показало, что наибольшее родство имеют везикуло- и эфемеровирусы.

Сходство с другими таксонами. Рабдовирусы имеют общие признаки с представителями семейств *Filoviridae* и *Paramyxoviridae* порядка *Mononegavirales:* геном представлен РНК (несегментированная, одноцепочечная, с негативной полярностью, неинфекционная**),** спиральный нуклеокапсид, первичная транскрипция инициируется вирусной РНК-зависимой РНК полимеразой, сходная организация генома, один 3'-промотор с коротким концевым нетранскрибируемым участком, межгенные участки. Вирионы представляют собой крупные оболочечные структуры с характерной бахромой выступов. Реплицируются в цитоплазме, почкование происходит в основном через плазматическую мембрану, за исключением вируса бешенства, который иногда почкуется через внутренние мембраны, и рабдовирусов растений из рода *Nucleorhabdovirus,* которые почкуются через внутреннюю ядерную мембрану.

14.2.4 Семейство: *Orthomyxoviridae*

Род: *Influenzavirus A, Influenzavirus B, Influenzavirus C, Thogolovirus*

Морфология. Вирион сферический (диаметр от 80 нм до 120 нм) или плеоморфный, встречаются также нитевидные (филаментозные) формы до нескольких мкм в длину. Имеется липопротеидная оболочка, в состав которой входят от 1 до 3 вирусных гликопротеина и от 1 до 2 негликозилированных протеинов. На поверхности имеются спайко-подобные выступы (отростки) длиной от 10 нм до 14 нм и диаметром от 4 нм до 6 нм. Нуклеокапсид сегментирован, имеет спиральную симметрию, длина от 150 нм до 130 нм, с петлями на одном конце.

Mr (вирион) 250×10^3, плавучая плотность в сахарозе 1,19 г/см^3.

Геном. РНК односпиральная, линейная, с негативной полярностью, сегментированная. Размер генома от 10,0 kb до 14,6 kb. Представители разных родов имеют в своем составе разное количество сегментов: 8 сегментов – *Influenza A virus* (FLUAV) и *Influenza B virus* (FLUBV), 7 сегментов – *Influenza C virus* (FLUCV) и *Dhori virus* (DHOV), 6 сегментов – *Thogoto virus* (THOV). Длина сегментов от 900 до 2350 нуклеотидов. Сегменты имеют консервативные и частично комплементарные 5'- и 3'-концевые сиквенсы с промоторной активностью, Могут встречаться дефектные вирусные РНК (более короткие, иногда химерные).

Другие вирусные компоненты. Структурными протеинами, встречающимися у вирусов всех родов, являются: три полимеразных протеина (например, PA, PB1, PB2 – у FLUAV); нуклеокапсидный протеин (NP), обладающей групповой специфичностью и ассоциированный с каждым сегментом геномной РНК в форме рибонуклеопротеина; гемагглютинин (HA, HEF или GP) – интегративный мембранный гликопротеин 1-го типа, участвующий в прикреплении вируса, слиянии оболочек и в нейтрализации; негликозилированный мембранный матриксный протеин. ПА FLUAV ацилирован и имеет несколько N-связанных гликанов. Кроме гемагглютинирующей активности и способности к слиянию, HEF FLUCV обладает эстеразной активностью, функционирующий как рецептор-разрушающий энзим. GP THOV отличается от протеинов инфлюэнцавирусов, но проявляет гомологию по сиквенсу с бакаловирусным поверхностным гликопротеином. В зависимости от рода вирусы могут иметь интегративный оболочечный гликопротеин 2-го типа (нейраминидаза, NA) и интегративный мембранный протеин 3-го типа (M_2, NB или CM_2), который может быть гликозилированным и функционировать как ионный тоннель. Кроме того, вирусами могут быть кодированы 2 неструктурных протеина (NSi и NSa). Вирусные энзимы, также различающиеся у представителей разных родов, представлены транскриптазой (PB1 у инфлюенцавирусов A, B, C и тоготовирусов), эндонуклеазой (PB2 у вирусов гриппа A, B, C) и рецептор-разрушающим энзимом (нейраминидаза у FLUAV и FLUBV или 9-O-ацетилнейраминилэстераза в случае протеина HEF FLUCV).

Липиды оболочки вириона, имеющие происхождение от клеточной плазматической мембраны составляют от 18 % до 37 % веса частицы.

Углеводы в составе гликопротеинов, гликолипидов и мукополисахаридов составляют около 5 % веса частицы.

Организация генома и репликация. Геном кодирует до 10 протеинов (Mr от 14×10^3 до 96×10^3). Пять крупных геномных сегментов кодируют по одному протеину, тогда как более мелкие сегменты часто кодируют дополнительные продукты за счет сплайсинга или бицистронных мРНК. Обычно 3 самых крупных сегмента геномной РНК кодируют протеины Р, четвертый и пятый сегменты кодируют протеины НА (HEF или GP) и NP. В зависимости от вируса мелкие сегменты кодируют протеин NA (FLUAV NA и FLUBV NA, NB: 6-й сегмент), мембранные протеины (FLUAV Mi и M_2, FLUBV Mi и BM_2: 7-й сегмент; FLUCV M1 и CM_2, и DHOV M1: 6-й сегмент) и протеины NS (FLUAV и FLUBV NS, и NS_2: 8-й сегмент; FLUCV NSi и NS_2: 7-й сегмент; предполагаемый 7-й сегмент DHOV – неизвестно). Реассортация генов может происходить при смешанной инфекции, обусловленной вирусами одного рода.

Проникновение вируса в клетку происходит при участии НА (HEF, GP) посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза. Рецепторной детерминантой для инфлюэнцавирусов является сиаловая кислота, связанная с гликопротеинами или гликолипидами. В эндосомах происходит слияние вирусной и клеточной мембран. У инфлюэнцавирусов слияние (и инфекционность) зависит от расщепления вирусного НА (FLUAV и FLUBV: HA_1 и HA_2; FLUCV: HEF1 и HEF2). Активность данного протеина зависит от пост-трансляционного разрезания клеточными протеазами. Помимо других факторов возможность разрезания обусловлена количеством основных аминокислот по сайту разрезания. Они образуют гидрофобные аминоконцевые молекулы HA_2. У тоготовирусов нет необходимости в разрезании GP. Интегративные мембранные протеины мигрируют через аппарат Гольджи к определенным участкам плазматической мембраны. Новые вирионы образуются при почковании, которому предшествует ассоциация матриксных протеинов и вирусных нуклеокапсидов с участками плазматической мембраны, содержащей вирусные оболочечные протеины.

Почкование происходит с поверхности апикальной части поляризованных клеток.

Вирусные нуклеокапсиды транспортируются в ядро клетки, где вирионный транскриптазный комплекс синтезирует мРНК. У инфлюэнцавирусов синтез мРНК праймируется кэпированными фрагментами мРНК, длиной от 10 до 13 нуклеотидов, образующимися из клеточных гетерогенных ядерных РНК за счет вирусной эндонуклеазной активности протеина. Тоготовирусы отличаются тем, что содержат кэпированные вирусные мРНК без последовательностей клетки по 5'-концу. Вирус-специфические мРНК полиаденилированы по 3'-концу и не имеют последовательности, соответствующей нуклеотидам (примерно 16) 5'-конца сегмента вирусной РНК. Отмечается сплайсинг некоторых мРНК, приводящий к образованию альтернативного продукта. Синтез протеинов происходит в цитоплазме. Однако протеины; NP, M и NS1 накапливаются в ядре клетки во время первых часов репликации, а затем мигрируют в цитоплазму. Протеин NS1 может образовывать цитоплазматические включения.

Антигенные свойства. Наиболее хорошо изучены антигены протеинов NP, M1, HA и NA FLUAV FLUBV. Протеины NP и M1 инфлюэнцавирусов родоспецифичны. Значительные вариации встречаются у антигенов HA и NA FLUAV, меньше у FLUBV и FLUCV. THOV и DHOV не проявляют перекрестной активности в стандартных серологических реакциях, тогда как DHOV *Balkan virus* – проявляет. Антитела к HA, HEF и GP обладают нейтрализующей активностью.

Инфлюэнцавирусы агглютинируют эритроциты многих видов животных. Серотипспецифические антитела могут блокировать агглютинацию. NA или HEF прикрепившихся вирионов гриппа могут разрушать клеточные рецепторы эритроцитов, содержащие сиаловые кислоты, что приводит к элюции вируса. Гемолизис эритроцитов может быть обусловлен HA при кислом значении pH. Тоготовирусы проявляют лишь ограниченную гемагглютинацию с эритроцитами определенных видов животных.

Биологические особенности. Определенные вирусы гриппа А инфицируют в естественных условиях человека и могут вызывать респираторные болезни. Некоторые вирусы гриппа А инфицируют другие виды млекопитающих и птиц. Возможна

межвидовая передача. Штаммы вируса гриппа В инфицируют только человека и часто вызывают эпидемии. Вирусы гриппа С вызывают более ограниченные вспышки болезни среди людей, и инфицируют свиней. Вирусы гриппа А и В накапливаются в амниотической полости куриных эмбрионов, а после адаптации они также накапливаются в аллантоисной полости. Вирусы гриппа С репродуцируются только в амниотической полости. Репродукция FLUAV и FLUBV поддерживается в первичных культурах клеток почек обезьян, человека, КРС, свиней и цыплят. Спектр восприимчивых перевиваемых клеточных линий может быть расширен путем добавления трипсина в ростовую среду. Клинические образцы от пациентов, инфицированных вирусом гриппа, часто содержат субпопуляции с минорными различиями по сиквенсам протеина НА. Эти популяции могут различаться по рецепторной специфичности или предрасположенности к репродукции в клеточных линиях разного происхождения.

Естественный путь распространения вирусов гриппа – аэрозольный или водный (для уток). Вирусы Thogoto и Dhori распространяются клещами и способны к репродукции, как в клещах, так и различных органах и тканях млекопитающих, так же как в культурах клеток млекопитающих. У некоторых видов животных, используемых в лабораторных исследованиях, инфекция может иметь фатальный исход (например, инфекция, вызванная THOV у хомяков). В отличие вирусов гриппа, эти вирусы не вызывают респираторных болезней и не репродуцируются в куриных эмбрионах. Все известные ортомиксовирусы имеют в своем репродуктивном цикле MX_1-чувствительный этап.

Род: *Influenzavirus A*

Типовой вид: *Influenza A virus* (FLUAV) (вирус гриппа А).

Характерные особенности. Вес представители данного семейства имеют 8 сегментов генома. Гемагглютинин и нейраминидаза (рецептор-разрушающий энзим) являются разными гликопротеинами. Консервативными последовательностями вируса гриппа А являются 5'-AGUAGAAACAAGG... и 3'-UCG(U/G)UUUCGUCC... Профиль электрофоретической миграции сегментов РНК варьирует в зависимости от штамма и условий электрофореза.

На основе нуклеотидного сиквенса генов вируса гриппа А определены следующие значения молекулярных масс протеинов PB_1, PB_2 и PA, кодируемых сегментами РНК-1-3: Mr ± 87 × 10^3 (наблюдаемая: ± 96 × 10^3), Mr ± 84 × 10^3 (наблюдаемая: ± 87 × 10^3), Mr ± 83 × 10^3 (наблюдаемая: ± 85 × 10^3), соответственно. Протеин НА, кодируемый сегментом РНК 4 (негликозилированный) имеет Mr ± 63 × 10^3. Протеин NP, кодируемый сегментом РНК 5, имеет Mr ± 56 × 10^3 (наблюдаемая: ± от 50 × 10^3 до 60 × 10^3). Протеин NA, кодируемый сегментом РНК 6, имеет Mr ± 50 × 10^3 (наблюдаемая: ± от 48 × 10^3 до 63 × 10^3). Протеины M_1 иM_2, кодируемые сегментом РНК 7, имеют Mr ± 28 × 10^3 (наблюдаемая: ± 25 × 10^3) и Мг ± 11 × 10^3 (наблюдаемая: ± 15 × 10^3), соответственно. Протеины NS и NS_1, кодируемые сегментом РНК 8, имеют Mr ± 27 × 10^3 (наблюдаемая: ± 25 × 10^3) и Mr ± 14 × 10^3 (наблюдаемая: ± 12 × 10^3), соответственно.

Антигенные свойства. Антигенные вариации антигенов НА и NA вирусов гриппа А изучены детально. Идентифицировано 15 субтипов НА и 9 субтипов NA, с минимальной перекрестной активностью (между субтипами) в серологических реакциях. Внутри субтипов также могут быть вариации. Традиционно, вновь выделенные изоляты обозначаются на основе следующих критериев: серотип / хозяин / место выделения / обозначение штамма / год выделения и (НА [H] и NA [N] субтип), например, A / tern / South Africa / 1 / 61(H5N3) (А / крачка / Южная Африка / 1 / 61 (H5N3)). Постоянный эволюционный процесс циркулирующих среди людей штаммов, приводит к появлению новых и, вероятно, к исчезновению старых штаммов. Антитела к НА обладают нейтрализующей активностью. Антитела к NA, присутствующие на протяжении многих циклов репродукции, ингибируют высвобождение вируса и снижают его накопление. Антитела к аминному концу M_2 снижают накопление вируса в культуре клеток.

Биологические особенности. В 20-м веке эпидемии респираторных болезней среди людей были вызваны вирусами гриппа А с антигенными композициями H1N1, H2N2, H3N2. Ограниченные вспышки респираторных болезней среди людей, вызванные антигенно новыми вирусами, наблюдались в 1976 в Fort Dix (New Jersey),

когда классический вирус свиней H1N1 вызвал инфекцию у военнослужащих; в 1997 в Гонконге, когда вирусы H5N1, вызвали вспышки болезней у промышленных птиц и одновременно болезни, иногда со смертельным исходом, у людей; и в 1998 и 1999 в Китае, когда вирусы H9N2, встречающиеся в популяциях промышленных птиц, вызывали болезнь у людей. Субтипы вируса гриппа А H7N7 и H3N8 (обозначаемые прежде «вирус лошадей 1» и «вирус лошадей 2») вызывали вспышки респираторных болезней среди лошадей. Вирус гриппа А (H1N1 и H3N2) часто выделялся от свиней. Выделен в последние годы от свиней вирусы субтипа H1N1 могут быть подразделены на 3 категории: 1) близкие классическим вирусам «гриппа свиней», и вызывающие спорадические случаи заболеваний у людей; 2) впервые выделенные из проб от птиц, но которые вызывали вспышки болезней среди свиней в Европе и Китае; 3) сходные вирусы, выделенные во время эпидемий от людей с 1977. Вирусы H3N2, выделенные от свиней, содержат гены HA и NA, близкородственные таковым штаммов, выделенных во время эпидемий среди людей. Вирус гриппа А (H7N7 и H4N5) вызывали вспышки болезней среди тюленей, сопровождавшихся распространением вируса в ткани нереспираторных органов. В двух отдельных случаях вирусы H7N7 были выделены при конъюнктивальной инфекции лабораторных работников и фермеров в 1980 и 1996, соответственно. Сообщалось об инфицировании вирусом гриппа А (H1N1) китов в Тихом Океане. Другие субтипы вируса гриппа были выделены из образцов легких китов Атлантического Океана в Северной Америке. Вирус гриппа А (H10N4) вызывал вспышки болезней у норок. Все субтипы HA и NA, в различных комбинациях, были выделены из образцов, взятых от птиц, в частности от многих видов диких водоплавающих птиц, кур, индеек и уток. Патология у птиц варьирует от инаппараптной инфекции (часто с вовлечением в процесс репродукции и распространения вируса пищеварительного тракта), до тяжелопротекающей инфекции (наблюдалось для субтипов H5 и H7), сопровождающейся генерализацией процесса и высоким уровнем смертности.

Ключевыми параметрами, определяющими спектр восприимчивых хозяев и тропизм вируса, являются структура протеина HA, в частности, его рецептор-связывающего сайта, и его предрасположенность к разрезанию тканевыми протеа-

зами. Кроме этого, исход болезни определяют взаимодействия генных продуктов. В ряде случаев межвидовая передача происходила без генетической реассортации (например, H1N1 – от свиней людям и наоборот, H3N2 – от людей свиньям, H5N1 и H9N2 – от птиц людям). В других случаях, межвидовая передача сопровождалась реассортацией сегментов РНК у хозяев, инфицированных более чем одним штаммом вируса, каждый из которых имеет определенных естественных хозяев или эпидемические характеристики (например, в 1968 изолят вируса H3N2 очевидно произошел при реассортации между вирусом человека H2N2 и вирусом, содержащим гемагглютинин H3; вирус тюленей H7N7 вероятно произошел при реассортации двух или более вирусов гриппа птиц; реассортация вирусов человека H1N1 и H3N2 в 1978 и 1989 привела к возникновению у людей инфекции, вызванной вирусом, имеющим поверхностные протеины H1N1 или H1N2 и от 4 до 6 других генов, происходящих от вирусов H3N2). В лабораторных условиях вирусом гриппа А могут быть инфицированы хорьки, мыши, хомяки, морские свинки и мелкие приматы.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Идентифицирован только один вид. Данный род состоит из кластера штаммов, которые способны к непрерывной репродукции с сохранением наследственных признаков и реассортации между собой. Поэтому, хотя среди вирусов гриппа А, инфицирующих птиц, идентифицировано около 15 различных субтипов HA и 9 субтипов NA, определение их в отдельные виды не соответствует требованиям межвидового подразделения.

Род: *Influenzavirus B*

Типовой вид: *Influenza B virus* (FLUBV) (вирус гриппа В).

Характерные особенности. Все представители данного семейства имеют 8 сегментов генома. Гемагглютинин и нейраминидаза (рецептор-разрушающий энзим) являются разными гликопротеинами. Консервативными последовательностями вируса гриппа В являются 5'-AGUAG(A/U)AACAA... и 3'-UCGUCUUCGC... Размер протеинов вируса гриппа В сходен с таковыми вируса гриппа А. Второй продукт сегмента РНК 6 вируса гриппа В имеет Mr 11×10^3 (гликозилированный – 18×10^3).

Антигенные свойства. Антигенные вариации антигенов HA и NA вируса гриппа В также изучены детально. В отличие от вируса гриппа А, у вируса гриппа В

не найдено антигенных субтипов; однако было показано, что вирусы антигенно и генетически различающиеся по HA и NA (например, вирусы подобные B / Victoria / 2 / 87 и вирусы подобные B / Yamagata / 16 / 88) коциркулировали среди людей в течение десятилетий. Вирусы гриппа B обозначаются по серотипу/месту выделения/обозначению штамма/года выделения. Антитела к HA обладают нейтрализующей активностью.

Биологические особенности. Вирусы гриппа B непрерывно циркулируют среди людей с момента их первого выделения в 1940 г и вызывают рекуррентные эпидемии респираторной болезни. Хотя антигенные изменения (антигенный дрейф) случаются более редко, чем у вирусов гриппа A, вирусы гриппа B вызывают эпидемии каждые 3-5 лет, характеризующиеся высоким уровнем заболеваемости среди людей молодого возраста (от 18 до 25 лет).

Критерии подразделения на виды внутри рода. Идентифицирован только один вид. Данный род состоит из кластера штаммов, которые способны к непрерывной репродукции с сохранением наследственных признаков и реассортации между собой. Хотя между вирусами данного рода существуют значительные антигенные и генетические различия, они недостаточны для выделения отдельных видов.

Род: *Influenzavirus C*

Типовой вид: *Influenza C virus* (FLUCV) (вирус гриппа C).

Характерные особенности. Представители данного рода инфицируют только человека. Имеют 7 сегментов генома. Не имеют нейраминидазы. Гемагглютинин (HEF) имеет также функцию протеина слияния (fusion protein) и рецептор-разрушающего энзима, который является 9-O-ацетилнейраминилэстеразой. Консервативными последовательностями вируса гриппа C являются 5'-AGCAGUAGCAA... и 3'-UCGU(U/C)UUCGUCC... Сегменты РНК 1-3 кодируют протеины P (Mr $87{,}8 \times 10^3$, 86×10^3, $81{,}9 \times 10^3$). Сегмент РНК 4 кодирует HEF (негликозилированный: Mr $72{,}1 \times 10^3$), сегмент РНК 5 кодирует NP (Mr $63{,}5 \times 10^3$), сегмент РНК 6 кодирует CM_2 (Mr 27×10^3 и 18×10^3), сегмент РНК 7 кодирует NS_1 и NS_2 (Mr $27{,}2 \times 10^3$ и 21×10^3, соответственно).

Антигенные свойства. Антигенный дрейф, характеризующийся появлением последовательных вариантов, происходящих от циркулировавших ранее, у вирусов гриппа С не отмечается; однако, антигенные вариации между коциркулирующими вирусами разного происхождения, могут быть идентифицированы в реакции ингибиции (подавления) гемагглютинации (с использованием как поли-, так и моноклональных антител). Перекрестной антигенной активности между вирусами гриппа С и вирусами гриппа А и В не наблюдается, хотя гомология HEF с HA вирусов гриппа А и В была найдена в амино- и карбоксиконцевых областях. Антитела к HEF обладают нейтрализующей активностью.

Биологические особенности. Вирусы гриппа С обычно вызывают инфекцию у детей. Отмечались отдельные вспышки, но не эпидемии. Сообщалось об инфицировании в Китае свиней вирусом, сходным со штаммами вируса гриппа С человека.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Идентифицирован только один вид. Данный род состоит из кластера штаммов, которые способны к непрерывной репродукции с сохранением наследственных признаков и реассортации между собой. Хотя между вирусами данного рода существуют значительные антигенные и генетические различия, они недостаточны для выделения отдельных видов.

Род: *Thogotovirus*

Типовой вид: *Thagoto virus* (THOV) (вирус Тогото).

Характерные особенности. Морфология и морфогенез сходны с таковыми инфлюэнцавирусов. Вирионы содержат 6 (THOV) или 7 (DHOV) сегментов геномной РНК. Общий размер генома около 10 kb. Сиквенс концов РНК частично комплементарен и напоминает таковые инфлюэнцавирусов. Консервативными последовательностями РНК THOV являются 5'-AGAGA(U/A)AUCAAAGC... и 3'-UCGUUUUUGUUC...; DHOV – 5'-AGUAGACAUCAA... и 3'-UCGUU(A/U)UUGUUCG... Ген сегмента РНК 1 не известен. 2-й (DHOV) и 3-й (THOV) сегменты РНК кодируют протеины (Мг 69×10^3 и 69×10^3, соответственно), проявляющие гомологию с протеинами Р вирусов гриппа. 4-й сегмент РНК кодирует гликопротеин (GP, DHOV: Mr 65×10^3; THOV: Mr 75×10^3), не имеющий родства с протеинами вирусов гриппа, но имеющего сходство по сиквенсу с гликопротеином

(gp64) бакуловирусов. 5-й сегмент РНК DHOV кодирует протеин NP (Mr 54×10^3), гомологичный NP вирусов гриппа. 6-й сегмент РНК DHOV кодирует протеин M_1 (Mr 30×10^3) и может кодировать другой протеин M_2 (Mr 15×10^3, протеин не выявляется) с неясной функцией. Ген 7-го сегмента РНК DHOV не известен.

Антигенные свойства. Антигенное родство между THOV и DHOV не четкое, с вирусами гриппа антигенного родства нет; однако в серологических реакциях отмечается перекрестная активность между DHOV и *Batken virus.* Для THOV и DHOV известно по нескольку изолятов, однако их родство с прототипными вирусами не известно.

Биологические особенности. THOV и DHOV передаются между позвоночными через клещей. Сравнительно низкий уровень гемагглютинации наблюдается при кислом значении pH, и отсутствует при нейтральном. Рецептор-разрушающий энзим не обнаружен. Слияние инфицированных клеток происходит при кислом значении pH, и ингибируется моноклональными антителами, специфичными GP, что свидетельствует о проникновении вируса в клетку путем эндоцитоза, как у инфлюэнцавирусов. Нуклеопротеин накапливается на ранних этапах репликации в ядре. GP синтезируется в цитоплазме и аккумулируется на клеточной поверхности. Экспериментально показана возможность реассортации между температурочувствительными мутантами THOV при коинфекции у клещей и позвоночных.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Тоготовирусы были выделены от клещей *Boophilus* sp. и *Rhipicephalus* sp. в Кении и Сицилии, от клещей *Ambliomma variegatum* в Нигерии и *Hyalomma* sp. в Нигерии и Египте. Тоготовирусы также были выделены в Центрально-Африканской Республике. Камеруне, Уганде, Эфиопии и Южной Европе. Вирус Дхори распространен в Индии, на Востоке Российской Федерации, Египте и на Юге Португалии. Вирус Дхори был выделен от клешей *Hyalomma* sp. Между DHOV и THOV серологического родства не выявлено. Идентифицированы структурные различия (THOV имеет 6 сегментов РНК, а DHOV – 7 сегментов) и дивергенция 37 % и 31 % по сиквенсам нуклеопротеина и оболочечного протеина, соответственно, что дает основания для определения им статуса разных видов. Вирус Баткен (Batken), выделенный от москитов и клещей в

Российской Федерации, перекрестно реагирует в серологических реакциях с DHOV и проявляют 98 % идентичности по части нуклеопротеина и 90 % по части оболочечного протеина. Эти данные дают основание полагать, что вирус Баткен, хотя и был выделен от москитов и клещей, является близкородственным вирусу Дхори. Официально зарегистрировано 2 вида.

14.2.5 Семейство: *Bunyaviridae*

Род: *Bunyavirus, Hantavirus, Nairovirus, Phlebovirus, Tospovirus*.

Морфология. Вирион сферический или плеоморфный (диаметр от 80 нм до 120 нм) имеет липидную оболочку (толщиной 5 нм), от которой отходят поверхностные гликопротеиновые выступы длиной от 5 нм до 10 нм. Оболочка вириона происходит из мембран аппарата Гольджи (или, реже, поверхностной мембраны клетки). Рибонуклеокапсид спиральный, диаметром от 2 нм до 2,5 нм и длиной от 200 нм до 3000 нм.

Mr (вирион) от 300×10^6 до 400 с 10^6. плавучая плотность в сахарозе от 1,16 г/см^3 до 1,18 г/см^3, в CsCl от 1,20 г/см^3 до 1,21 г/см^5. Вирионы чувствительны к нагреванию, воздействию жирорастворителей, детергентов и формальдегида.

Геном. РНК, односпиральная, 3 уникальные молекулы, негативная (или обеих полярностей); общий размер от 11 kb до 19 kb, Mr от $4{,}8 \times 10^3$ до $8{,}0 \times 10^3$, от 1 % до 2 % массы вириона. Концевые нуклеотиды каждого геномного сегмента комплементарно спарены, что обеспечивает формирование нековалентно закрытых циркулярных РНК (и рибонуклеокапсидов). Сегменты геномной РНК обозначаются, в зависимости от размера. L (large-крупный), M (medium-средний) и S (small-мелкий). Концевые последовательности нуклеотидов консервативны в пределах рода. Геномная РНК немодифицирована по 5'-концу. мРНК неполиаденилированы и усечены относительно геномных РНК по 3'-концу; имеют 5'-метилированный кэп и от 10 до 18 нематричных нуклеотидов, которые берут свое происхождение от клеточных мРНК.

Другие компоненты вириона. Все вирусы имеют 4 структурных протеина: 2

внешних гликопротеина (G1 и G2), нуклеокапсидный протеин (N) и крупный транскриптазный протеин (L). Неструктурные протеины, функций которых не ясны, кодируются сегментом РНК S (у бунья-, флебо- и тосповирусов), M (у бунья-, найро-, тоспо- и некоторых флебовирусов). В отношении хантавирусов данных о кодировании ими неструктурных протеинов нет.

Липиды составляют от 20 % до 30 % массы вириона; клеточного происхождения; представлены фосфолипидами, стеролами, жирными кислотами и гликолипидами.

Углеводы составляют от 2 % до 7 % массы вириона. Аспарагин-связанные сахара протеинов G1 и G2. в основном, высокоманнозного типа, если вирус репродуцируется в клетках позвоночных.

Организация генома и репликация. Сегменты геномной РНК L, M и S кодируют, соответственно, вирусную РНК полимеразу (протеин L), оболочечные гликопротеины (G1 и G2) и нуклеокапсидный протеин (N), Протеин L кодируется мРНК, которая комплементарна геномной РНК. Продукты первичной трансляции единственной ORF сегмента РНК M, котрансляционно разрезаются (за исключением найровирусов) с образованием зрелых G1 и G2. Хантавирусы дополнительных протеинов в сегменте M не кодируют. Буньявирусы и другие флебовирусы кодируют неструктурный протеин (NSm) в смысловой РНК, комплементарной геномной. Найровирусы кодируют не менее 2-х неструктурных протеинов, которые являются предшественниками вирусных гликопротеинов. Тосповирусы кодируют протеин NSm в ORF, имеющей стратегию трансляции с обеих комплементарных цепей (ambisense ORF), no 5'-концу вирионной смысловой РНК. Ханта- и найровирусы дополнительных протеинов в сегменте S не кодируют. Буньявирусы кодируют неструктурный протеин NSs в ORF, перекрывающей рамку считывания N, в 3'-части смысловой вирионной S РНК. Флебо- и тосповирусы кодируют протеин NSs в ORF, имеющей стратегию трансляции с обеих комплементарных цепей (ambisense ORF), по 5'-части вирионной смысловой S РНК. Нет данных, свидетельствующих об одинаковых функциях одноименных неструктурных протеинов вирусов, относящихся к разным родам.

Все этапы репликации происходят в цитоплазме. Выделяют 9 основных этапов.

1 Прикрепление, опосредованное взаимодействием одного или обоих интегративных вирусных протеинов с клеточными рецепторами.

2 Этап проникновения и раздевания происходит по принципу эндоцитоза вириона с последующим слиянием вирусных и эндосомальных мембран.

3 Первичная транскрипция, включающая синтез мРНК, комплементарных геномным матрицам, посредством вирион-ассоциированной полимеразы, с использованием кэпированных праймеров клеточного происхождения.

4 Трансляция первичных мРНК сегментов L, S свободными рибосомами и мРНК сегмента M мембрано-связанными рибосомами с первичным гликозилированием поверхностных протеинов. Котрансляционное разрезание протеина-предшественника с образованием протеинов G1 и G2, и, для некоторых вирусов, NSm.

5 Синтез и инкапсидация антигеномных РНК, служащих матрицами для геномной РНК или, в некоторых случаях, для субгеномных мРНК.

6 Репликация генома.

7 Вторичная транскрипция, включающая амплифицированный синтез мРНК и транскрипцию в обоих направлениях (ambisense transcription).

8 Морфогенез, включающий аккумулирование протеинов G1 и G2 в аппарате Гольджи, терминальное гликозилирование, приобретение модифицированной мембраны клетки (обычно путем почкования внутрь цистерн аппарата Гольджи). Почкование через клеточную мембрану встречается у вирусов лихорадки Долины Рифт *(Rift Valley fever virus, Phlebovirus)* и Син Номбре *(Sin Nombre virus, Hantavirus),* репродуцирующихся в поляризованных эпителиальных клетках.

9 Слияние цитоплазматических везикул с плазматической мембраной и высвобождение зрелых вирионов.

Антигенные свойства. Один или оба оболочечных гликопротеина несут антигенные детерминанты, участвующие в гемагглютинации и нейтрализации. Антигенные детерминанты, участвующие в связывании комплемента обнаруживаются у

нуклеокапсидного протеина.

Биологические особенности. Вирусы родов *Bunyavirus, Nairovirus* и *Phlebovirus* способны к репродукции в позвоночных и членистоногих и, обычно, обладают цитолитической активностью для клеток позвоночных, тогда как при репродукции в клетках членистоногих переносчиков цитопатогенность проявляется слабо или не наблюдается совсем. Вирусы распространяются москитами, клещами, кровососущими мухами и др. Некоторые вирусы имеют очень узкий круг хозяев, особенно переносчиков. Для хантавирусов членистоногих переносчиков не найдено. Для некоторых вирусов, передающихся москитами показана трансовариальная и половая передача. Для некоторых вирусов показана возможность аэрозольной передачи, тогда как для других такой путь является основным, например, для хантавирусов. Некоторые вирусы вызывают снижение синтеза компонентов в клетках позвоночных. Для хантавирусов данное свойство не показано, и в восприимчивых клетках инфекция протекает персистентно, без цитолитического эффекта, что наблюдается при бессимптомном носительстве у их естественных хозяев – грызунов. При естественной инфекции у млекопитающих отмечается тропизм вирусов к определенным органам или типам клеток. Некоторые вирусы обусловливают слияние клеток при низких значениях pH. Некоторые вирусы проявляют ионозависимую гемагглютинирующую активность. Генетическая реассортация была показана для некоторых вирусов как *in vitro,* так и *in vivo.*

Род: *Bunyavirus*

Типовой вид: *Bunyamwera virus* (BUNV) (вирус Буньямвера).

Характерные особенности. Консенсусными терминальными нуклеотидными последовательностями сегментов генома L, M и S являются UCAUCACAUGA... по 3'-концу и AGUAGUGUGCU... по 5'-концу. Протеины N и NSs кодируются в перекрывающейся рамке считывания сегмента РНК S и транслируются с соответствующей комплементарной мРНК с альтернативных инициирующих кодонов AUG. Оба гликопротеина и протеин NSm (Mr от 15×10^3 до 18×10^3) кодируются как полипротеин-предшественник сегментом РНК M. Генетическая реассортация была показана между вирусами одного вида, но не между вирусами разных видов.

С вирусами других родов серологического родства не выявлено. Большинство вирусов переносится москитами, хотя некоторые (например, группы Tete) переносятся клещами. Некоторые вирусы передаются у членистоногих трансовариально.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Подразделение буньявирусов на виды затруднено, так как для большинства вирусов нет данных по биохимическим характеристикам. Поэтому, виды различаются на основе серологических критериев (реакция перекрестной нейтрализации и перекрестной ингибиции гемагглютинации). Аминокислотные сиквенсы протеина N различаются более чем на 10 %. Всего описано 178 буньявирусов, из которых официальный статус вида имеют 47. Предполагаемых видов описано 4.

Род: *Hantavirus*

Типовой вид: *Hantaan virus* (HTNV) (вирус Хантаан).

Характерные особенности. Консенсусными терминальными нуклеотидными последовательностями сегментов генома L, M и S являются AUCAUCAUCUG... по 3'-концу и UAGUAGUA... по 5'-концу. Неструктурные полипептиды не кодируются ни одним из сегментов. С вирусами других родов серологического родства не выявлено. Отдельные хантавирусы являются этиологическими агентами геморрагической лихорадки с почечным синдромом ГЛПС) или хантавирусного пульмонарного синдрома (ХПС). Естественными хозяевами являются грызуны; генетически различные хантавирусы обычно ассоциируются с определенными видами грызунов. У человека хантавирусная инфекция является тупиковой в распространении возбудителя, за исключением недавно описанного случая передачи *Andes virus* от человека человеку. В отличие от других вирусов семейства хантавирусы не передаются членистоногими, а распространение инфекции у людей и грызунов происходит через контакт (воздушно-капельным путем) с секретами и экскретами инфицированных грызунов (реже при укусах). В культурах клеток позвоночных хантавирусы не вызывают детектируемой цитопатологии, а у грызунов обусловливают персистентную латентно протекающую инфекцию.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Виды занимают уникальные экологические ниши (то есть естественными хозяевами и резервуарами вируса в

природе являются определенные виды или подвиды грызунов). Виды различаются более чем на 7 % по аминокислотному сиквенсу предшественника гликопротеинов и по нуклеокапсиду. Виды проявляют не меньше, чем четырехкратные различия в реакции перекрестной нейтрализации (друг с другом). В естественных условиях вирусы одного вида не образуют реассортантов с вирусами другого вида, однако, в экспериментальных условиях такие факты отмечались.

Всего описано 63 вируса, относящихся к данному роду, из которых официальный статус вида имеют 22. Предполагаемых видов не описано.

Род: *Nairovirus*

Типовой вид: *Dugbe virus* (DUGV).

Характерные особенности. Морфологические характеристики вириона сходны с таковыми других представителей семейства, мелкие поверхностные выступы (длиной 7 нм) образуют периферическую бахрому. Сегмент РНК L (размер 12,2 kb) значительно больше по размеру, чем аналогичный сегмент вирусов других родов. Консенсусными терминальными нуклеотидными последовательностями сегментов генома L, M и S являются AGAGUUUCU... по 3'-концу и UCUCAAAGA... по 5'-концу. Сегмент РНК S неструктурные протеины не кодирует. Сегмент M кодирует один продукт, который процессируется в структурные гликопротеины. Идентифицировано не менее трех неструктурных протеинов, два из которых являются предшественниками гликопротеинов. Протеин L (пока еще не идентифицирован) имеет значительно больший расчетный размер, чем у аналогичных протеинов вирусов других родов. С вирусами других родов серологического родства не выявлено. Большинство вирусов передается клещами: вирусы групп CCHF, NSD и SAK передаются, в основном, иксодовыми клещами, тогда как вирусы групп DGK, HUG и QYB – аргасовыми. Некоторые вирусы передаются у членистоногих трансовариально.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Ввиду недостаточности биохимических данных найровирусы подразделяются только на основе серологических характеристик. Всего официально идентифицировано 8 видов вирусов, представленных 35 штаммами (изолятами).

Род: *Phlebovirus*

Типовой вид: *Rift Valley fever virus* (RVFV) (вирус лихорадки Долины Рифт).

Характерные особенности. Поверхностная структура флебовирусов отличается наличием мелких округлых субъединиц с центрально расположенной ямкой (отверстием). Консенсусными терминальными нуклеотидными последовательностями сегментов генома L, M и S являются UGUGUUUC... по 3'-концу и ACACAAAG... по 5'-концу. Сегмент РНК S имеет стратегию кодирования по цепям любой полярности (ambisense coding strategy), то есть транскрибируется вирусной полимеразой в субгеномную комплементарную смысловую РНК, кодирующую протеин N, и из полноразмерной антигеномной S РНК в субгеномную смысловую вирусную мРНК, кодирующую неструктурный протеин (NSs). Сегмент M вирусов группы песчаных лихорадок, но не вирусов группы Уукуниеми *(Uukuniemi virus,* UUKV), имеют участок, кодирующий прегликопротеин, в котором закодирован неструктурный протеин (-ы) (NSm). Одинаковый размер протеинов G1 и G2 объясняется различным порядком G1, G2 s сегменте M у разных вирусов. С вирусами других родов серологического родства не выявлено, но между вирусами данного рода прослеживается перекрестная активность, проявляющаяся в разной степени. Вирусы группы песчаных лихорадок передаются флеботомусами, москитами, кератопогонидами рода *Culicoides;* вирусы группы Уукуниеми – клещами.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Ввиду недостаточности биохимических данных флебовирусы подразделяются только на основе анализа серологического родства и не менее чем 4-х кратного различия в реакции перекрестной нейтрализации (между собой). Официально зарегистрировано 9 видов и 16 предполагаемых видов.

Род: *Tospovirus*

Типовой вид: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV).

Характерные особенности. Консенсусными терминальными нуклеотидными последовательностями сегментов генома L, M и S являются UCUCGUUA... по 3'-концу и AGAGCAAU... по 5'-концу. Сегменты РНК M и S имеют стратегию кодирования по цепям любой полярности (ambisense coding strategy): протеины G1 и G2

кодируются комплементарной смысловой M РНК, а NSs – геномной смысловой РНК; нуклеокапсидный протеин кодируется комплементарной смысловой S РНК, а неструктурный протеин NSs кодируется геномной смысловой S РНК. Протеин NSm играет роль в распространении вируса от клетке к клетке, а протеин NSs образует паракристалические или нитевидные включения в инфицированных клетках растений.

Инфицируют растения. Тосповирусы переносятся как минимум 8-ю видами переносчиков (thrips). Гликопротеины G1 и G2 участвуют во взаимодействии вируса и переносчика. Распространение вирусов может быть и через инфицированный сок растений. К типовому виду *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) восприимчивы более 925 видов растений, относящихся к 70 ботаническим семействам, тогда как к другим тосповирусам восприимчиво значительно меньшее количество видов растений.

Виды подразделяются на основе различий в спектре переносчиков, видов растений-хозяев, по серологическому родству (по протеину N). Идентичность тосповирусов по аминокислотному сиквенсу протеина N составляет менее 90 %. Официальный статус имеют 8 видов, статус предполагаемых – 5.

Неклассифицированные вирусы семейства: 7 групп (19 вирусов) и 22 негруппированных вируса. Недостаток данных не дает возможности отнести их к уже известным родам данного семейства.

Филогенетическое родство внутри семейства. Аналогичные гены и продукты генов вирусов, относящихся к разным родам данного семейства, значительно отличаются по размеру и общего сходства по нуклеотидному или аминокислотному составу не наблюдается. Анализ показал, что все вирусы данного семейства можно подразделить на 2 группы, каждая из которых имеет свою эволюционную историю: к одной группе относятся бунья-, ханта- и тосповирусы, к другой - найро- и флебовирусы. Необходимо отметить, что филогенетический анализ по протеину L не приемлем, если учитывать стратегию кодирования с комплементарных цепей.

Сходство с другими таксонами. Тенуивирусы растений проявляют некоторое сходство с представителями семейства *Bunyaviridae,* особенно с представителями рода *Phlebovirus.* Тенуивирусы имеют геном, представленный 4-5 сегментами

односпиральных РНК, кодирующими протеины с использованием стратегий кодирования по негативным или комплементарным цепям. Консервативные последовательности РНК тенуивирусов по 3'- и 5'- концам проявляют инвертированную комплементарность; консервативная последовательность 3'-участка UGUGUUUCAG... сходна с консенсусной последовательностью флебовирусов. Тенуивирусы используют механизм приобретения кэпа для праймирования синтеза вирусных мРНК аналогичный таковому членов семейства *Bunyaviridae.* Незначительная гомология по сиквенсу была отмечена между протеином 94К *Rice stripe virus* и флебовирусными гликопротеинами, и между нуклеокапсидными протеинами тенуи- и флебовирусов.

14.2.6 Семейство: *Arenaviridae*

Род: *Arenavirus, Deltavirus.*

Род: *Arenavirus*

Типовой вид: *Lymphocytic choriomeningitis virus* (LCMV) (вирус лимфоцитарного хориоменингита).

Морфология. Вирион сферический или плеоморфный. Диаметром от 50 нм до 300 нм (в среднем от 110 нм до 130 нм), с плотной липидной оболочкой, поверхность которой покрыта булавовидными выступами длиной от 8 нм до 10 нм. Внутри вирусных частиц обычно присутствует различное количество электроноплотных рибосомальных частиц, имеющих размер от 20 нм до 25 нм. Выделенные нуклеокапсиды, освобожденные от клеточных рибосом, организованы в виде замкнутых окружностей различного размера (от 450 нм до 1300 нм), образованных суперскрученными структурами, и имеют линейный порядок нуклеосомных субъединиц.

Mr вириона не определена, плавучая плотность в сахарозе составляет от 1,17 г/см^3 до 1,18 г/см^3, в CsCl – от 1,19 г/см^3 до 1,20 г/см^3, в амидотризоате – от 1,14 г/см^3. Вирионы относительно нестабильны *in vitro* и быстро инактивируются при значениях pH ниже 5,5 и выше 8,5, а также при 56 °C, воздействии органических растворителей, УФ облучении.

Геном. РНК: 2 односпиральных молекулы (L и S, имеющих размер 7,5 kb а 3,5

kb, соответственно), имеющих амбисенс-стратегию кодирования (ambisense coding strategy; трансляция может проводиться с обоих комплементарных цепей РНК – геномной и комплементарной ей). 3'-участок неполиаденигирован. 3'-концевые последовательности (от 19 до 30 нуклеотидов) обеих цепей РНК имеет высокую степень идентичности и комплементарны 5′-концевой последовательности. Хотя считается, что геномные РНК представлены в вирионе в виде циркулярных нуклеокапсидов, геномная РНК ковалентно не замкнута. В препаратах вирусов обнаруживается различное количество полноразмерных комплементарных вирусным РНК (преимущественно S), и субгеномных вирусных мРНК. Препараты очищенного вируса также могут содержать РНК клеточного происхождения с коэффициентом седиментации 28S, 18S и 6S, включая рибосомальные РНК. Предполагается, что вирусные РНК ассоциированы с инкапсидированными рибосомами. Соотношение S и L РНК не эквимолярно, что вероятно связано с упаковыванием в один вирион многих видов РНК.

Другие компоненты вириона. Мажерным является структурный протеин - нуклеопротеин (N или NP) – негликозилированный полипептид (Mr 63×10^3**),** тесно ассоциированный с вирусной геномной РНК в форме рибонуклеопротеинового комплекса или нуклеокапсидной структуры. Протеин L (РНК полимераза, Mr – 200×10^3, является минорным компонентом. Предполагаемый цинк-связывающий протеин (Z или p11, Мг от 10×10^3 до 14×10^3) также является структурным компонентом вируса. У всех представителей семейства обнаруживаются два гликозилированных протеина (GP1 или Gl, GP2 или G2; Mr от 34×10^3 до 44×10^3), образующиеся при пост-трансляционном разрезании предшественника (GPC, Mr от 75×10^3 до 76×10^3). Другие минорные протеины и энзиматическая активность, ассоциируемые с вирионами, включают поли-U и поли-А полимеразы и протеинкиназу, но, вероятно, они не являются кодируемыми вирусом.

Липиды составляют 20 % сухого веса вирионов и по составу сходны с плазматической мембраной клетки.

Углеводы составляют 8 % сухого веса вириона и входят в форме гликанов в

состав GP1 (5-6 сайтов у LCMV) и GP2 (2 сайта у LCMV).

Организация генома и репликация. Оба сегмента геномной РНК (L и S) имеют амбисенсную стратегию кодирования (обе комплементарные цепи транслируемы). РНК, комплементарная вирусному сегменту РНК L, кодирует протеин L, а 5'-концевая область вирусной смысловой РНК кодирует протеин Z. мРНК протеина Z имеет небольшой размер (менее 0,5 kb). Протеин N кодируется последовательностью, комплементарной 3'-части геномной РНК S, тогда как гликопротеин-предшественник (GPC) кодируется последовательностью 5'-области вирусной смысловой РНК S. Два протеина образуются после трансляции субгеномных мРНК, транскрибируемых с вирусных (для N мРНК) или полноразмерных, комплементарных вирусным, S РНК (для GPC мРНК)**.** Межгенные участки S и L РНК содержат нуклеотидные последовательности, способные образовывать одну или более шпилевидных конфигураций. Такая вторичная структура может иметь функцию терминирования транскрипции мРНК вирусных и комплементарных им S РНК. мРНК кэпированы, неполиаденилированы и содержат по 5'-концу от 1 до 5 нематричных гетерогенных нуклеотидов. Механизм транскрипции изучен недостаточно, Для инициации транскрипции может быть использован механизм захвата кэпа (cap-snatching). 3'-концы мРНК картированы по локализации межгенных участков.

Инфекционный процесс включает прикрепление к клеточным рецепторам, проникновение внутрь клетки эндосомальным путем, раздевание и транскрипцию мРНК в цитоплазме инфицированных клеток. Из-за стратегии кодирования по комплементарным цепям, с геномных РНК с помощью вирусной полимеразы перед трансляцией синтезируются только мРНК N и L. Предполагается, что продукты этих мРНК участвуют в синтезе полноразмерных, комплементарных вирусным, РНК, которые служат матрицами для синтеза GPC и Z мРНК и синтеза полноразмерных вирусных РНК.

Процесс репликации РНК, в который может быть вовлечен механизм переноса инициации и сплошного считывания сигналов терминации транскрипции, изучен недостаточно.

Вирусные оболочечные гликопротеины синтезируются в клетках в виде одно-

го, богатого маннозой, предшественника, который протеолитически разрезается и процессируется во время транспортировки к плазматической мембране, приобретая сложные гликаны. Созревание вирионов происходит при почковании в определенных сайтах клеточной поверхности, где также обнаруживаются рибосомы.

Показана возможность межштаммовой реассортации, включая диплоидные или мультиплоидные виды в соответствии с сегментами геномной РНК. Есть свидетельства о межвидовой реассортации между вирусами Ласса и Мопеа *(Lassa virus* (LASV) и *Mopea virus* (MOPV)), Репликация *in vitro* ряда аренавирусов ингибируется различными антивирусными агентами, такими как амантадин, сс-аманитин, глюкозамин и тиосемикарбазоны. Рибавирин ингибирует репликацию некоторых аренавирусов *in vitro* и эффективен при лечении людей и приматов, инфицированных LASV.

Антигенные свойства. Анализы с использованием моно- и поликлональных антител показали наличие у аренавирусов нескольких различных антигенных детерминант. Антигены GP1 LCMV участвуют в нейтрализации вируса. Они типоспецифичны, но в реакции перекрестной нейтрализации проявляют антигенное родство с вирусами Такарибе *(Tacaribe virus,* TCRV) и Юнин *(Junin virus,* JUNV). Также была показана перекрестная защита от заражения вирусом JUNV на фоне перенесенной прежде инфекции, вызванной вирусом TCRV, и от LASV на фоне перенесенной прежде инфекции, вызванной вирусом MOPV. Мажерный комплементсвязывающий протеин ассоциируется с вирусным протеином N, который был использован для идентификации ареновирусов комплекса Такарибе. С использованием моноклональных антител идентифицированы общие для всех аренавирусов эпитопы у протеинов N и по одному высоко консервативному – у трансмембранных гликопротеинов GP2.

Исследования с использованием моно- и поликлональных антител показали различия между африканскими и американскими (New World) аренавирусами. В реакции иммунофлюоресценции показано, что антитела, специфичные американским вирусам, также как и африканским, реагируют с LCMV. В отношении нуклеопротеина и гликопротеинов LCMV идентифицированы эпитопы для цитотоксических

Т-лимфоцитов. Количество и локализация эпитопов варьирует в зависимости от штамма вируса и молекул главного комплекса гистосовместимости I класса клеток организма-хозяина. Гемагглютинин не идентифицирован.

Биологические особенности. Резервуарами в природе практически всех аренавирусов являются грызуны. Африканские вирусы обнаруживаются в основном, у грызунов *Mastomys* и *Praomys* подсемейства *Murinae.* Американские вирусы в основном обнаруживались у грызунов семейства Sigmodonline (*Calomys, Neacomys, Neotoma, Oryzomys* и *Sigmodon*). Исключение составляет TCRV, выделенный от летучих мышей, питающихся фруктами *(Artibeus* spp.), но последующие попытки выделения данного вируса от летучих мышей или других потенциальных хозяев были безуспешными. Необходимо отметить, что географическое распространение аренавирусов значительно более ограничено, чем распространение их естественных хозяев. Большинство вирусов вызывают у своих естественных хозяев персистентную, бессимптомную инфекцию, которая в некоторых случаях инфекция может сопровождаться хроническим вирусоносительством и вирусовыделением. Такое течение инфекции возникает из-за слабого или недостаточного иммунного ответа хозяина. В обычных условиях большинство аренавирусов не инфицируют других млекопитающих или человека, Однако LASV является этиологическим агентом широко распространенной в Западной Африке (Нигерия, Сьерра Лионе, Либерия, Гвинея) болезни человека (Лихорадка Ласса), а JUNV вызывает Аргентинскую геморрагическую лихорадку у сельских жителей этих стран. Вирус Мачупо *(Machupo virus,* MACV) вызывал ограниченные вспышки сходной болезни в Боливии, а *Guanarito virus* (GTOV) был выделен при болезни людей в Венесуэлле. В Бразилии от погибших в результате болезни людей был выделен *Sabia virus* (SABV). Инфекция, вызванная LCMV, может встречаться у людей сельских и городских районов, характеризующихся высокой численностью популяции грызунов; отмечены случаи заражения от домашних хомяков. Описаны случаи тяжело протекающего фатального гепатита у содержащихся в неволе приматов *Callitrichid*, возникающего при заражении LCMV от мышей. Тяжелые инфекции, связанные с лабораторными исследованиями, были описаны в отношении LCMV, LASV, IUNV, MACV, SABV и *Flexal virus*

(FLEV). Имеются сообщения о бессимптомной инфекции, обусловленной вирусом Пичинде *(Pichinde virus,* PICV).

Течение экспериментальной инфекции у лабораторных животных (мышей, хомяков, морских свинок, крыс, макак резус, мартышек) зависит от вируса и вида животного. Обычно, американские вирусы патогенны для мышей-сосунов, но не для прыгунков; LCMV и LASV вызывают противоположный эффект. Вирусы хорошо накапливаются во многих культурах клеток из тканей млекопитающих. LCMV может репродуцироваться в культуре мышиных Т-лимфоцитов.

Среди естественных хозяев наблюдается вертикальный и горизонтальный пути распространения вирусов (включая внутриутробное заражение, заражение при прохождении плода через родовые пути, а также при контакте с секретами молочных и слюнных желез, мочой). Горизонтальная передача вирусов между животными одного или разных видов происходит аэрозольно или через контаминацию. Об участии членистоногих в переносе вирусов данных нет.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Отнесение штамма (изолята) вируса к тому или иному виду основано на следующих критериях:

1) ассоциация с определенным видом (или группой видов) хозяина;

2) географическая приуроченность;

3) сведения об инфицировании людей;

4) значительные антигенные различия в перекрестной активности, включая отсутствие перекрестной нейтрализации, где это возможно;

5) значительные различия по аминокислотным сиквенсам.

Например, хотя оба вируса *Pirital virus* (PIRV) и GTOV циркулируют в одной и той же области Венесуэлы, они отличаются по видам грызунов, являющихся их естественными хозяевами *(Sigmodon alstony* и *Zygodontomys brevicuada,* соответственно). Кроме этого, в ELISA с использованием асцитных жидкостей гипериммунизированных мышей, титры различались не менее чем в 64 раза, а анализ аминокислотных сиквенсов части нуклеокапсидного протеина показал менее чем 55 % гомологии.

В качестве другого примера можно привести LASV и MOPV, имеющих общих

естественных хозяев (род *Mastomys)*. Однако они различаются по географическому распространению, различному профилю реактивности с панелью моноклональных антител и дивергенции в 26 % по аминокислотным сиквенсам по протеину N. Кроме того, LASV является этиологическим агентом, вызывающим геморрагическую лихорадку у людей, тогда как MOPV не ассоциируется с болезнями человека и не вызывает болезнь при экспериментальном инфицировании приматов. Официально зарегистрировано 18 видов.

Род: *Deltavirus*

Типовой вид: *Hepatitis delta virus* (HDV) (вирус гепатита дельта).

Морфология. Вирион сферический (диаметр от 36 нм до 43 нм), поверхностных выступов не идентифицировано. Внешняя оболочка содержит липиды и все 3 оболочечных протеина коинфицирующего гепаднавируса-помощника. Внутренний капсид (19 нм) включает геномную РНК и примерно 70 копий единственного вирусного протеина, известного под названием антиген дельта (HDAg). HDAg существует в двух формах (большой HDAg (L-HDAg, p27) и малый HDAg (S-HDAg, p24), которые отличаются только по удлинению на 19 аминокислотных остатков С-концевой области. Вирион содержит примерно эквимолярное количество L и S форм HDAg, тесно связанных с вирусной РНК. Симметрия нуклеокапсида точно не определена. Нуклеокапсиды могут быть получены при обработке вируса неионными детергентами и дитиотрейтолом. Физико-химические свойства вириона не известны.

Геном. РНК: 1 молекула, циркулярная, односпиральная, с негативной полярностью (размер 1,7 kb). Из-за высокой степени (70 %) внутримолекулярного спаривания комплементарных оснований молекула РНК имеет структуру компактного стержня (стержнеподобной структуры; rod-like structures). Геномные и антигеномные РНК могут функционировать как рибосомы в процессах саморазрезания и самолигирования. Это свойство отличает геном данного вируса от всех других известных вирусов животных.

Другие компоненты вириона. РНК HDV кодирует один известный протеин HDAg. Две разновидности HDAg образовываются вследствие редактирования РНК, обусловленного клеточным ферментом dsРНК-аденозиндеаминазой, приводящего к

тому, что стоп-кодон UAG для S-HDAg конвертируется в UGG, приводя к сплошному считыванию и образованию L-HDAg. Обе разновидности HDAg многофункциональны и имеют домены, участвующие в:

1) в димеризации путем суперскручивания;

2) ядерной локализации через двусторонний сигнал;

3) связывании РНК по аргинин-богатому мотиву.

Кроме этого L-HDAg имеет домен, включающий сайт, отвечающий за упаковку. Таким образом, два вида HDAg играют в репликации разные роли: S-HDAg необходим для репликации HDV, тогда как L-HDAg ингибирует репликацию, но участвует в сборке.

Остальные структурные протеины вириона HDV, локализованные в его оболочке, являются поверхностными протеинами и гликопротеинами гепаднавируса-помощника.

Организация генома и репликация. Считается, что прикрепление, проникновение и раздевание вируса (HDV) происходит по тем же этапам, что и у гепаднавируса-помощника. Репликация генома включает РНК-зависимый синтез РНК, проводимый клеточной РНК полимеразой II в ядре клетки. Это происходит по дублирующему круговому механизму (double rolling circule mechanism).

Идентифицирован только 1 вид мРНК HDV, колирующий HDAg. В трансфицированных клетках первично образуется только S-HDAg, а затем, после событий редактирования РНК, последовательно образуется L-HDAg. Аналогичное редактирование было обнаружено в клетках инфицированных шимпанзе и Североамериканских сурков.

Для ассемблирования HDV необходимы оболочечные протеины хелперного гепаднавируса, что, вероятно, определяет сходный с ним механизм сборки. В клетках, инфицированных обоими вирусами, для формирования антиген-содержащих частиц необходимо присутствие L-HDAg, тогда как S-HDAg (если присутствует в клетке) может быть упакован в вирион, но не является существенным в процессе формирования частиц. Полноразмерные или делетированные молекулы РНК HDV инкорпорируются, если присутствуют в клетке, столь долго, сколько они остаются

способными к образованию стержнеподобной структуры (rod-like structures). В клетках, в которых происходит процесс репликации РНК HDV, этот процесс высокоспецифичен для геномной РНК, тогда как в клетках только экспрессирующих, но не реплицирующих РНК HDV, могут быть ассемблированы РНК любой полярности.

Биологические особенности. Для полной репликации HDV необходимо присутствие хелперного гепаднавируса (вируса-помощника), предоставляющего оболочечные протеины, и он, поэтому, может считаться субвирусным сателлитным вирусом. Естественная HDV-инфекция обнаруживается только у людей, инфицированных вирусом гепатита В (HBV) (имеющих HBV – вируса-помощника). Однако инфекция может быть вызвана у шимпанзе, если параллельно передается HBV или у Северо-Американских сурков, при наличии у них соответствующего вируса гепатита В. Независимая от вируса-помощника HDV-инфекция наблюдалась у пациентов с имплантированной печенью и при экспериментальной инфекции у сурков. Сообщалось о передаче HDV лабораторным мышам, что сопровождалось только одним раундом репликации генома HDV в гепатоцитах, что, вероятно, связано с отсутствие вируса-помощника.

Передача HDV человеку происходит теми же путями, что и HBV, хотя существует много данных о преобладании парентерального пути распространения HDV (при многоразовом использование игл для взятия крови), чем вертикального или при половом контакте. Если вирус передается индивиду с хронической HBV-инфекций (суперинфекция), то обычно развивается персистентная HDV-инфекция. Однако если HBV и HDV передаются одновременно здоровому хозяину (коинфекция), то обе инфекции обычно кратковременные. HDV распространен повсеместно, но соотношение носителей HBV, имеющих также хроническую HDV-инфекцию варьирует от 0 % до 60 % в зависимости от региона.

Клинические осложнения острой и хронической HDV-инфекции различны и могут проявляться как спектр патологии, вызванной одним HBV, включая острые гепатиты, хронические активные гепатиты, циррозы, молниеносные острые гепатиты и гепатоцеллюлярную карциному. Однако частота тяжелых осложнений и их темп прогрессирования значительно выше при хронической HDV-инфекции, чем

при одной хронической HBV-инфекции. Подострая быстро прогрессирующая форма HDV-суперинфекции наблюдалась у носителей HBV в Венесуэле, а другие формы тяжелых остропротекающих и хронических гепатитов D, часто с фатальным исходом, отмечались среди людей из категории малообеспеченных в Венесуэле, Колумбии, Бразилии и Перу.

В состав данного рода входит только один вид. При исследовании 14 независимых изолятов HDV была выявлена вариабельность по нуклеотидному сиквенсу до 40 %, в зависимости от географического распространения. Анализ гомологии нуклеотидного состава позволил идентифицировать (в соответствии с географическим распространением) 3 генотипа: 1 (США, Европа, Китай), 2 (Япония) и 3 (Южная Америка).

Сходство с другими таксонами. Некоторые особенности HDV (структура генома, РНК-РНК транскрипция с использованием РНК полимеразы II, аутокаталитические сайты РНК) имеют общее с вироидами. Однако в отличие от вироидов, HDV имеет крупный геном, кодирует функциональный протеин, и требует присутствия гепаднавируса-помощника.

HDV имеет также ряд признаков, общих с односпиральными РНК-сателлитами растений, включая мРНК-сателлиты типа B и сателлиты типа D с циркулярной РНК(«вирусоиды»), а также (в терминах сателлит-хелперного взаимодействия) с сателлитными ssРНК-вирусами-сателлитом, ассоциированным с вирусом хронического паралича пчел, и сателлитом вируса некроза табака.

14.2.7 Семейство: *Picornaviridae*

Род: *Enterovirus, Rhinovirus, Cardiovirus, Aphthovirus, Hepatovirus, Parechovirus*

Характеристика вириона. Вирион безоболочечный, состоит из капсида, окружающего кор из ssРНК. Диаметр нативных частиц от 22 нм до 30 нм. Вирион не имеет поверхностных выступов и похож на простую сферу. Капсид состоит из 60 единиц (протомеров), каждая из которых образована тремя поверхностными протеинами 1B, 1C и ID, имеющими Mr от 24×10^3 до 41×10^3 и, у большинства пикор-

навирусов, внутренним протеином 1A (Mr от 5,5 × 10^3 до 13,5 × 10^3). Общая Mr протомера от 80 × 10^3 до 97 × 10^3. Протеины 1A, 1B, 1C и ID также, обычно, называются VP4, VP2, VP3 и VP1, соответственно. Протеины 1B, 1C и ID обладают коровой структурой, составляя восьмицепочечный «бета-сэндвич» или «бета-цилиндр» («beta-sandwich», «β-barrel»). Бета-цилиндры упаковываются в капсид с T = 1 псевдоикосаэдральной симметрией (эти структурные особенности встречаются у определенных вирусов растений, имеющих T = 3 или псевдо T = 3 симметрию, например, *Sobemovirus* или *Comoviridae,* соответственно). Роды различаются по внешним петлям, которые соединяют между собой р-цепи. Эти петли определяют различия поверхности представителей разных родов и толщину капсидной стенки. Сборка осуществляется через пентамерные промежуточные формы (пентамер = пять протомеров). Протеины, входящие в состав пентамера объединены между собой внутренней сетью (решеткой), образованной N-концами трех мажерных капсидных протеинов (CP), C-концы которых лежат на внешней поверхности капсида. Пустые капсиды, образуемые некоторыми пикорнавирусами, очень напоминают вирионы, за исключением того, что 1A и 1B обычно замещены неразрезанным предшественником 1AB.

Mr (вирион) от 8 × 10^6 до 9 × 10^6, плавучая плотность в CsCl от 1,33 г/см^3 до 1,45 г/см^3. Некоторые вирусы нестабильны при pH ниже 7; многие менее стабильны при низкой ионной силе, чем при высокой. Вирионы нечувствительны к воздействию эфира, хлороформа и неионных детергентов. Вирусы инактивируются на свету, если культивируются в присутствии фотодинамических красителей (нейтральный красный или профлавин). Вирионы стабилизируются бивалентными катионами. Термостабильность у представителей разных родов различается.

Геном. РНК: 1 молекула, односпиральная, линейная, с позитивной полярностью, инфекционная; размер от 7 kb до 8,5 kb, одна ORP. Поли(A)-участок, различной длины, расположен после 3'-концевой гетерополимерной последовательности. Мелкий протеин VPg (Mr ± 2,4 × 10^3) ковалентно связан с 5'-концом. Нетранслируемые области (NTR) по обоим концам содержат участки, имеющие вторичную струк-

туру, существенную для функционирования генома. Очень длинный 5'-NTR (от 0,6 kb до 1,5 kb) содержит 5'-концевой домен, участвующий в репликации (например, у полиовирусов «листок клевера» («clover-leaf»)), и внутренний сайт входа рибосомы (internal ribosorae entry site, IRES), расположенный на 400-450 нуклеотидов выше сайта начала трансляции. Все пикорнавирусные lRES-элементы могут быть представлены 1-2 типами, в соответствии с их вторичной структурой. Между 5'-концевым доменом и IRES может быть один или более псевдоузлов и /или поли(С)-тракт. Длина 3'-NTR, который также может содержать псевдоузлы, может варьировать от 40 до 165 нуклеотидов. Идентичность по полному сиквенсу между вирусами различных родов обычно меньше 40 %.

Организация генома и репликация. Вирусная РНК инфекционна и может выполнять функции как геномной, так и мРНК. Инициация синтеза протеинов стимулируется IRES. Результатом трансляции единственной ORF является полипротеин (Mr от 240×10^3 до 250×10^3), являющийся предшественником структурных (соответствует участку Р1 генома) и неструктурных (Р2 и Р3 участки) протеинов. У некоторых вирусов протеин Р1 дает начало лидерному протеину (L). Полипротеин разрезается до функциональных протеинов специфическими протеазами, содержащимися среди них. Промежуточные формы обозначаются комбинациями букв (например, 3CD – неразрезанный предшественник 3С и 3D). Вирусная протеазы – протеаза 3СР, серино-подобная цистеиновая протеаза, кодируемая всеми пикорнавирусами, осуществляет большинство разрезаний. У вирусов большинства родов 2А также ассоциируется с протеолитической активностью. Лидерный протеин афтовирусов имеет протеолитическую активность, хотя для кардиовирусов это не характерно. Некоторые промежуточные формы стабильны и имеют функции, отличающиеся от функций продуктов разрезания. Разрезание 1АВ, сопровождаемое инкапсидацией РНК, считается утокаталитическим процессом.

Репликация вирусной РНК происходит в комплексах, ассоциированных с цитоплазматическими мембранами. Эти комплексы содержат протеины, берущие свое происхождение от участка 2ВС-Р3 полипротеина, включая полимеразу ($3D^{pol}$, энзим, удлиняющий цепь РНК) и 2С (АТФаза, содержащая мотив нуклеотидного свя-

зывания). Показано, что полиовирусный $3C^{pr0}$ компонент необходим для связывания с 5'-концевыми РНК-структурами («clover-leaf»). Описано много соединений, ингибирующих репликацию. Сообщалось о мутантных формах вируса, устойчивых или зависимых от химиопрепаратов. Описаны факты генетической рекомбинации, комплементации и фенотипического смешивания. Дефектные частицы, несущие делеции в CPs или L, были получены экспериментально, но в естественных популяциях вирусов такого не наблюдалось.

Антигенные свойства. Серотипы классифицируются на основе тестов перекрестной защиты, нейтрализации инфекционности, связывания комплемента, ELISA и иммунодиффузии. Некоторые серотипы могут быть идентифицированы по гемагглютинации. На каждом протомере идентифицировано по 3-4 антигенных сайта, участвующих в нейтрализации. Антительная нейтрализация имеет кинетику первого порядка.

Биологические особенности. Большинство пикорнавирусов специфичны одному или небольшому количеству видов-хозяев. Исключение составляют вирус ящура (FMDV) и вирус энцефаломиокардита(EMCV). Большинство видов могут культивироваться в культуре клеток. Клетки резистентных хозяев (например, клетки мышей в отношении полиовирусов приматов) могут быть инфицированы (один раунд) путем трансфекции свободной (naked) инфекционной РНК. Распространение инфекции происходит горизонтально – алиментарно или аэрозольно. Сведений о существовании членистоногих переносчиков (векторов) нет, хотя EMCV выделялись от клещей и москитов.

Обычно инфекция цитолитическая, однако персистентная инфекция также часто встречается. Клетки, инфицированные полиовирусом, сильно вакуолизируются, так как мембраны реорганизуются в комплексы вирусной репликации. Инфекция может сопровождаться быстрым ингибированием кэп-зависимой трансляции клеточных мРНК ($2A^{pr0}$ полиовирусов и L^{pr0} афтовирусов являются сильными ингибиторами), синтеза мРНК и секреторных функций клетки (в этом могут участвовать полиовирусные 2B и 3A).

Определение вида. Вид пикорнавирусов представляет собой политетический

класс родственных серотипов или штаммов, которые должны быть сходными по таким общим признакам, как:

1) ограниченный спектр хозяев и используемых клеточных рецепторов;

2) значительная степень совместимости по протеолитическому процессингу, репликации, инкапсидации и генетической рекомбинации;

3) существенно идентичные геномные карты.

Род: *Enterovirus*

Типовой вид: *Pohovirus* (PV) (полиовирус).

Характеристика вириона. Энтеровирусы характеризуются одними из самых крупных по размеру капсидными протеинами 1B, 1C (у энтеровирусов человека, длина цепи VP1-3 составляет от 238 до 302 аминокислотных остатка), что отражается в наличии типично длинных петель между (3-цепями; более толстой капсидной стенки (46 А); характерным поверхностным рельефом вириона. Округлые возвышенные области по пятиосным вершинам (fivefold axis) являются бороздками (глубиной 25 А) или «каньонами» внутри которых (у полиовирусов) происходит связывание с клеточными рецепторами. Сайт связывания для покет-фактора («poket factor») лежит ниже дна этого «каньона» внутри ID (3-цилиндра. Вирионы могут быть изменены под воздействием разных факторов (незначительное нагревание, прикрепление к рецепторам или некоторым нейтрализующим антителам), приводящих к образованию «А»-частиц (135S), лишенных VP4 и обладающих измененной антигенностью.

Вирионы стабильны при кислых значениях pH. Плавучая плотность в CsCl от 1,30 г/см^3 до 1,34 г/см^3. В препаратах вируса часто наблюдаются пустые капсиды и (до 1 % популяции) тяжелые частицы (плотность 1,43 г/см^3).

Геном не имеет поли(С)-тракта; TRES 1 типа. Идентичность сиквенсов разных энтеровирусов и между энтеро- и риновирусами составляет более 50 % по полному геному.

Организация генома и репликация. Геном кодирует только VPg (не кодирует протеин L). Протеиназа 2A^{pra}, близкая семейству мелких бактериальных сериновых протеаз, разрезает полипротеин по N-концу. Определенные гидрофобные молекулы,

которые связываются с капсидом в конкуренции с покст-фактором, проявляют сильную антивирусную активность путем интерференции за связывание с рецептором и/или раздевание (рисунок 54).

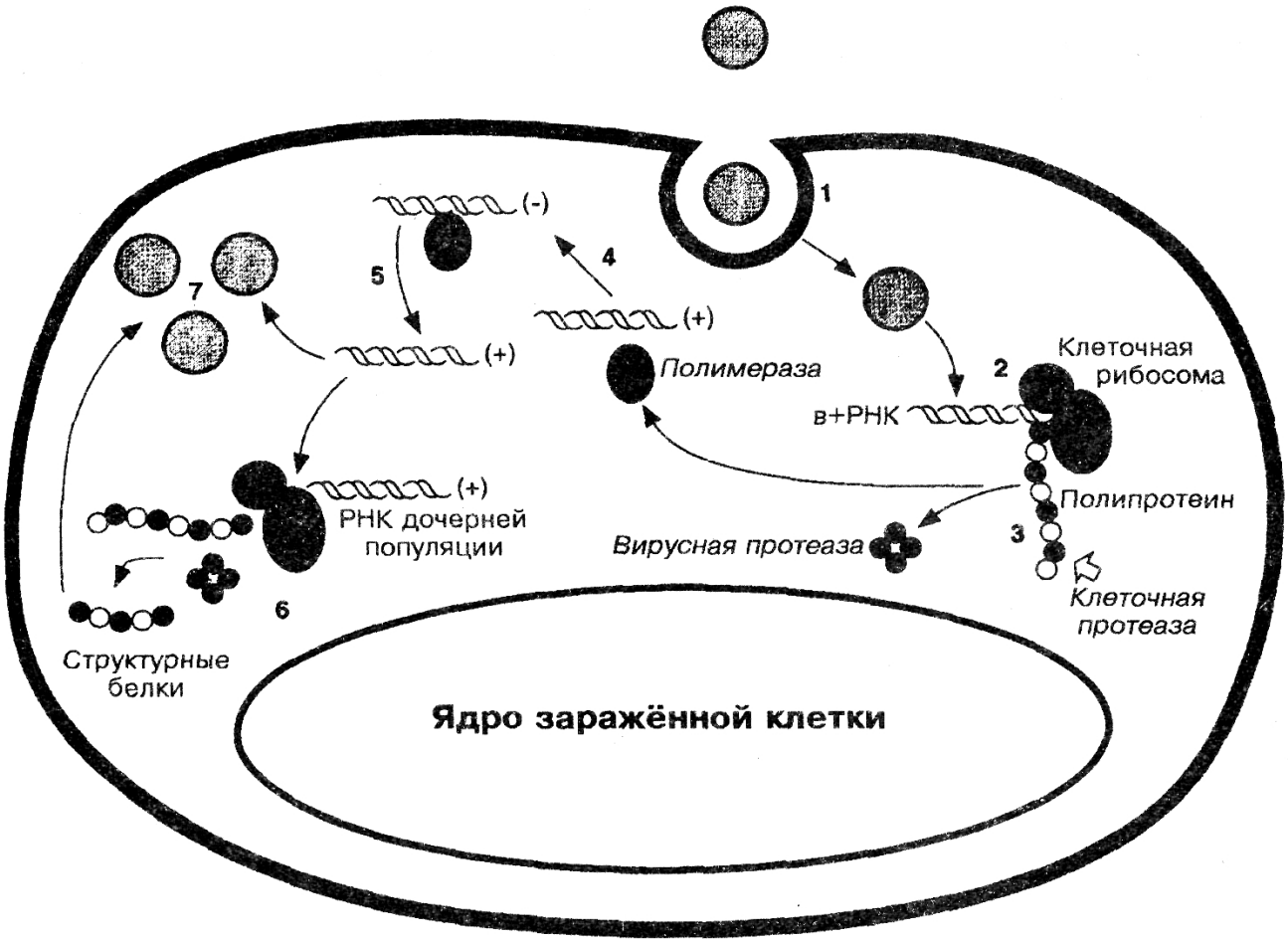


Рисунок 54 – Репликативныи цикл +РНК-содержащих вирусов на примере репродукции полиовирусов

После адсорбции вирус проникает в клетку посредством пиноцитоза (1). Репликативныи цикл начинается после высвобождения вирусного генома в цитоплазме, т.к. молекулярная симметрия вирусной РНК (+РНК) аналогична мРНК и она может непосредственно распознаваться и транслироваться рибосомами (2). Клеточные протеазы трансформируют образующийся вирусный полипротеин (3) в РНК-зависимую РНК-полимеразу, вирусную протеазу и различные структурные белки. Полимераза копирует +РНК-цепь в виде -РНК (4), служащую матрицей для синтеза молекул +РНК (5), используемых в синтезе вирусных белков (6) либо входящих в состав генома дочерних популяций вирусов (7).

Антигенные свойства. Нативные вирионы в антигенном отношении проявляют серотипоспецифичность (обозначаются как «N» или «D» для полиовирусов) тогда как «А»-частицы проявляют групповую специфичность (обозначаются как «Н» или «С» для полиовирусов).

Биологические особенности. Вирусы репродуцируются, в основном, в клетках желудочно-кишечного тракта, но также могут накапливаться и в других тканях, например, нервной, мышечной и др. Часто инфекция может протекать бессимптомно. Клиническое проявление может характеризоваться менингитами (средней тяжести), энцефалитами, миелитами, миокардитами и конъюнктивитами. Кэп-зависимая трансляция клеточных мРНК ингибируется $2A^{pr0}$, которая разрезает эукариотический фактор инициации 4G (eIF-4G). В качестве рецепторов для вирусов могут служить многие клеточные рецепторы (многие из которых не идентифицированы).

Критерии подразделения на виды внутри рода. Представители видов энтеровирусов характеризуются следующими признаками:

- идентичность по аминокислотам более 70 % по протеину P1;
- идентичность по аминокислотам более 70 % по протеинам 2C + 3CD;
- специфичность к ограниченному спектру клеточных рецепторов;
- ограниченный спектр естественных хозяев;
- геномная композиция (G + C), различающаяся не более чем на 1 %;
- значительная степень совместимости по протеолитическому процессингу, репликации, инкапсидации и генетической рекомбинации. Официально зарегистрировано 8 основных и 5 предполагаемых видов.

Род: *Rhinovirus*

Типовой вид: *Human rhinovirus A* (HRV-A) (риновирус человека А).

Характеристика вириона. Риновирусы, также как и энтеровирусы человека, имеют сравнительно неровную поверхность с характерными каньонами вокруг пятиосных вершин (fivefold axis) (сайт прикрепления молекулы-1 (1CAM-1) рецептора межклеточной адгезии), толстостенный капсид, и ямку связывания покет-фактора. Плавучая плотность вириона в CsCl от 1,38 г/см^3 до 1,42 г/см^3. Вирионы не стабиль-

ны при pH от 5 до 6.

Геном. 5'-NTR короче, чем у энтеровирусов и составляет 0,65 kb (из-за делении примерно 100 нуклеотидов между IRES и сайтом начала трансляции). IRES типа 1. Идентичность сиквенсов полных геномов внутри рода или между энтеро- и риновирусами составляет более 50 %, хотя для отдельных участков генома это значение может быть выше или ниже. Вирусные протеины сходны по размеру с протеинами энтеровирусов человека.

Организация генома и репликация сходны с таковыми энтеровирусов человека. Описаны антивирусные препараты, связывающие «pocket», аналогичные таковым, действующим против энтеровирусов.

Антигенные свойства. Антигенные свойства, включая N-D-конверсию, аналогичны энтеровирусам человека.

Биологические особенности. Риновирусы человека могут быть подразделены на мажерную и минорную группы, в зависимости от используемых рецепторов. 89 серотипов (мажерная группа) использует в качестве рецептора ICAM-1, 10 серотипов (минорная группа) связывается с рецепторами семейства липопротеиновых рецепторов низкой плотности (LDLR) и 1 серотип (HRV-87) использует пока еще не идентифицированный сталированный мембранный протеин. У человека клиническое проявление инфекции, вызванной риновирусами, обусловлено патологией верхних и нижних дыхательных путей. Кэп-зависимая трансляция клеточных мРНК ингибируется $2A^{pro}$, которая разрезает клеточный фактор инициации eIF-4G.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Представители видов риновирусов характеризуются следующими признаками:

- идентичность по аминокислотам более 70 % по протеину P1;
- идентичность по аминокислотам более 70 % по протеинам 2C + 3CD.

Сходная чувствительность рецепторного прикрепления к ингибиции антивирусными агентами, связывающими «pocket» («ингибиторы группы A или B»). Официально зарегистрировано 2 основных вида и 82 (серотипы, еще не обозначаемые как виды) предполагаемых вида.

Род: *Cardiovirus*

Типовой вид: *Encephalomyocardiils virus* (EMCV) (вирус энцефаломиокардита)

Характеристика вириона. Пустые капсиды встречаются редко. По толщине капсидной стенки, рельефу поверхности вириона и длине цепей мажерных протеинов, кардиовирусный капсид занимает промежуточное положение между энтеро- и афтовирусами. В месте циркулярного каньона, наблюдаемого у энтеровирусов, находится ямка (fivefold repeated pit). Нет покет-фактора («pocket factor»).

Плавучая плотность вириона в CsCl от 1,33 г/см^3 до 1,34 г/см^3. Вирионы обладают умеренной стабильность при кислых значениях pH.

Геном. EMCV имеет поли(C)-тракт различной длины (от 80 до 250 нуклеотидов) на расстоянии 150 нуклеотидов от 5'-конца вирусной РНК, тогда как *Theilovirus* такой особенностью не обладает. IRES типа 2. Идентичность сиквенсов полных геномов внутри рода составляет более 50 % (например, между вирусом Тейлера энцефаломиелита мышей (TMEV) и EMCV).

Организация генома и репликация. Вирусный геном кодирует лидерный протеин L, который, в отличие от L афтовирусов, не обладает протеолитической активностью; L отрезается от P1 вирус-кодируемой протеазой 3C. Протеин 2A вызывает разрезание, или прерывание полипептидной цепи, между P1-2A и нижележащей последовательностью -NPGP-.

Антигенные свойства. Описано 4 независимых антигенных сайта. Нет данных о N-D-конверсии и A-частицах.

Биологические особенности. Вирус энцефаломиокардита был выделен от более чем 30 видов животных, включая млекопитающих, птиц и членистоногих. Клиническая картина у мышей и других животных характеризуется энцефалитами и миокардитами. TMEV могут быть подразделены на 2 биологические подгруппы, которые инфицируют мышей. Одна группа вирусов вызывает острый и фатальный полиоэнцефаломиелит, а другая – хроническую персистентную инфекцию, сопровождающуюся демиелинизацией белого вещества. Вирус Вилюйского энцефалита (VHEV) является этиологическим агентом дегенеративной неврологической болезни человека, наблюдаемой в регионе Вилюйской долины в Сибири. Кардиовирусная

инфекция не сопровождается разрезанием клеточной eIF-4G. Клеточный рецептор, используемый EMCV для прикрепления к эндотелиальным клеткам мышей, идентифицирован как VCAM-1. Однако в клетках из тканей человека обнаружены, но пока не идентифицированы, сиалогликопротеины. EMCV прикрепляется к эритроцитам человека посредством гликопротеина А.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Представители видов кардиовирусов характеризуются следующими признаками:

- идентичность по аминокислотам более 70 % по протеину P1;
- идентичность по аминокислотам более 70% по протеинам 2C+3CD;
- общие естественные хозяева;
- сходная организация генома.

Официально зарегистрировано 2 вида.

Род: ***Aphthovirus***

Типовой вид: *Foot-and-mouth disease virus* (FMDV) (вирус ящура).

Характеристика вириона. Капсид FMDV тонкостенный с необычно гладкой поверхностью. Длинная (от 17 до 23 аминокислоты), мобильная петля (G-H-петля) выдается с поверхности от ID. По пятиосной вершине находится канал (роге), в котором представлена часть протеина 1C, лежащего ниже. Для некоторых серотипов FMDV характерно накопление пустых капсидов. Плавучая плотность вириона в CsCl от 1,43 г/см^3 до 1,45 г/см^3.

Вирионы не устойчивы в кислой среде. Частицы FMDV нестабильны при pH ниже 6,8; вирус ринита лошадей А (ERAV) нестабилен ниже pH 5,5.

Геном. Поли(C)-тракт, длина которого составляет от 100 до более чем 400 нуклеотидов, расположен в 5'-концевой области генома. У FMDV он локализован примерно на расстоянии 360 нуклеотидов от конца. Поли(C)-тракт у ERAV короче (около 40 нуклеотидов) и ближе к 5'-концу. У FMDV РНК имеет вид серии псевдоузлов в области 3'-стороны от поли(C); соответственно, 5'-NTR очень длинный. Различие по нуклеотидному сиквенсу полного генома ERAV и FMDV составляет примерно 50 %.

Протеины. Мажерные CPs FMDV имеют наиболее короткую длину цепи (от 208 до 220 аминокислот), по сравнению со всеми остальными пикорнавирусами; у ERAV они чуть длиннее. На конце ГО G-H-петли РМБУ находится консервативный мотив, распознающий интегрин (RGD).

Организация генома и репликация. Трансляция начинается с двух альтернативных внутренних (in-frame) сайтов, что приводит к образованию двух форм протеина L (Lab и Lb). Полипептид 2A очень короткий (около 18 аминокислот у FMDV), участвует в NPGP-зависимом прерывании полипептидной цепи по С-концу, как у кардиовирусов. Геном FMDV кодирует 3 вида VPg, тогда как у ERAV – только 1.

Антигенные свойства. Для FMDV типа О идентифицировано 5 независимых антигенных сайтов, два из которых имеют детерминанты в G-H-петле протеина ID. Нет данных о N-D-конверсии и А-частицах.

Биологические особенности. FMDV инфицирует, в основном, парнокопытных животных, но также был выделен не менее чем от 70 видов млекопитающих. Клиническое проявление инфекции, вызванной FMDV, характерно для ящура (везикулярные поражения), иногда в ассоциации с острым фатальным миокардитом у молодых животных. Инфекция, обусловленная ERAV, сопровождается поражением верхних дыхательных путей у лошадей. Оба вида вирусов могут вызывать персистентную инфекцию верхних дыхательных путей. FMDV инфицирует клетки путем прикрепления к интегративным мембранным протеинам, относящимся к семейству интегринов, посредством D-H-петли ID; в качестве рецептора также могут служить гепарансульфат простогликаны. Кэп-зависимая трансляция клеточных мРНК ингибируется L^{pra}, которая разрезает клеточный фактор инициации eIF-4G.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Представители видов афтовирусов характеризуются следующими признаками:

- идентичность по аминокислотам более 50 % по протеину PL;
- идентичность по аминокислотам более 70 % по протеинам 2C + 3CD;
- общие естественные хозяева;
- сходная нуклеотидная композиция генома (различия не более 1 %);

- сходная организация генома.

Официально зарегистрировано 2 вида.

Род: *Hepatovirus*

Типовой вид: *Hepatitis A virus* (HAV) (вирус гепатита А).

Характеристика вириона. Плавучая плотность в CsCI от 1,32 г/см^3 до 1,34 г/см^3. Вирион очень стабилен, устойчив при кислых значениях pH и повышенной температуре (60 °С – 10 мин).

Геном. Между сиквенсом генома гепатовирусов и другими пикорнавирусами отмечается очень слабое сходство, хотя IRES отдаленно напоминает IRES 2-го типа. 5'-NTR содержит 5'-концевую шпильку, два предполагаемых псевдоузла и короткий (около 40 нуклеотидов), богатый пиримидинами, участок, но чисто поли(С)-тракта выше IRES нет. Идентичность по нуклеотидному сиквенсу разных штаммов HAV превышает 80 %. РНК вируса энцефаломиелита птиц (AEV) содержит самый короткий (из всех пикорнавирусов) 5'-NTR (494 нуклеотида).

Протеины. В отличие от других пикорнавирусов, протеин А1 чрезвычайно мал, по-видимому, не миристилирован по N-концу, и не является компонентом зрелой вирусной частицы. Незрелый HAV может содержать неразрезанный 1D2A (PX) протеин-предшественник.

Организация генома и репликация. Полипротеин содержит только одну протеиназу (3С^{pro}). Нет точных данных о наличии протеина L, и протеин 2А не имеет протеолитической активности. Первичное разрезание полипротеина происходит по месту соединения 2A/2B и катализируется 3С^{pro}. Разрезание по сайту 1D/2A может быть осуществлено пока неизвестной клеточной протеазой, или протеином VP1 может быть предметом С-концевого процессинга (тримминга), как у кардиовирусов.

Репликация происходит медленно с незначительным проявлением ЦПЭ и с относительно низким уровнем накопления вируса. IRES отличается от такового других, пикорнавирусов тем, что его активность зависит от интактного eIF-4G.

Антигенные свойства. Вирусы гепатита А сильно консервативны по своим антигенным свойствам. Большинство антител имеют специфичность к одному, конформационно зависимому иммунодоминантному антигенному сайту, состоящему из

аминокислотных остатков протеинов VP3 и VP1 на поверхности вириона.

Биологические особенности. HAV инфицирует эпителиальные клетки тонкого кишечника и гепатоциты приматов. Вирус репродуцируется преимущественно в печени, экскретируясь с желчью, и присутствует в фекалиях в высоких титрах. Вирусовыделение очень непродолжительно и происходит до начала проявления клинических признаков гепатита, который, вероятно, обусловлен иммунопатологическими процессами. Клинически болезнь проявляется лихорадкой, желтухой, нарушением пищеварения, брюшными болями, иногда диареей. При заражении разных культур клеток приматов *in vitro* гепатовирусы обычно вызывают персистентную инфекцию, однако этого не наблюдается *in vivo* и вирусы не ассоциируются с хроническими гепатитами.

HAV могут быть подразделены на 2 биотипа, различающихся филогенетически, и имеющих разных хозяев (все виды приматов; человек, шимпанзе, обезьяны, мартышки – для одного биотипа, и зеленые обезьяны и обезьяны циномольгус – для другого). Эти 2 биотипа имеют антигены, дающие перекрестные реакции, но имеют и биотипспецифические эпитопы, которые могут быть идентифицированы моноклональными антителами.

AEV вызывает энцефаломиелит у молодняка кур, фазанов, перепелов и индеек. Он может передаваться вертикально и горизонтально (алиментарно); полевые штаммы энтеротропны.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Представители видов гепатовирусов характеризуются следующими признаками:

- идентичность по аминокислотам более 70 % по протеину P1;
- идентичность по аминокислотам более 70 % по протеинам 2C + 3CD;
- идентичность по сиквенсу генома в целом более 75 %;
- определенный тканевой тропизм и спектр восприимчивых животных;
- сходная нуклеотидная композиция генома (различия не более 1 %);
- сходная организация генома.

Официально зарегистрирован 1 основной и 1 предполагаемый вид.

Род: *Parechovirus*

Типовой вид: *Human parechovirus (HPeV)* (парэховирус человека).

Характерные особенности. Данных по морфологии вириона и геному нет.

Расчетный сиквенс протеинов парэховирусов очень дивергентный. При сравнении с другими пикорнавирусами уровень идентичности по протеинам не превышает 30 %. В отличие от большинства других пикорнавирусов, протеин 1AB парэховирусов, по-видимому, не разрезается, и его N-конец не миристилирован (что тоже необычно).

Вирусы первично накапливаются в клетках желудочно-кишечного тракта, что сопровождается диареей и, часто, с признаками поражения респираторного тракта. Инфекция встречается, в основном, среди детей раннего возраста. Цитопатология, наблюдаемая при электронной микроскопии, характеризуется гранулярностью и распределением хроматина в ядре. Официально зарегистрирован 1 вид.

Неклассифицированные виды семейства.

Equine rhinitis B virus (formeiy – Equine rhinovirus 2) Вирус ринита лошадей В

Характерные особенности. Плавучая плотность ERBV в CsCl от 1,41 г/см^3 до 1,45 г/см^3. Вирус не стабилен при pH ниже 5. 3'-NTR обычно длинный (167 нуклеотидов). Считается, что по 5'-концу присутствует поли(C)-тракт. Идентифицированы псевдоузлы. IRES 2-го типа. Идентичность по протеинам CP между ERAV, FMDV и EMCV 25 % и 47 %, соответственно. Данных о наличии альтернативных сайтов инициации трансляции нет. Протеин L, вероятно, протеиназа, но имеет только 23 % и 18 % идентичности с протеинами L FMDV и ERAV, соответственно. Протеины 2B и 3C имеют исключительно большую длину цепей (283 и 251 аминокислота). Протеин 2A имеет длину цепи 18 аминокислот, заканчивающейся в NPGP; только 1 VPg. ERBV вызывает болезнь верхних дыхательных путей у лошадей, что сопровождается виремией и рассеиванием вируса с фекалиями. Инфекция может быть кратковременной.

Aichi virus Вирус Аичи

Характерные особенности. В отличие от других пикорнавирусов, вирус Аичи (AiV) имеют икосаэдральную поверхностную структуру (при электронно-

микроскопическом исследовании). Вирионы стабильны при pH 3,5. Геном богат по G + C составу (примерно 59 %) и имеет очень длинный 3'-NTR (240 нуклеотидов). Протеин 1AB вероятно не разрезается. Лидерный протеин, функция которого не ясна, имеет расчетную длину 170 аминокислот (тогда как у EMCV и FMDV она составляет 67 и 217 аминокислот, соответственно). AiV репродуцируется в культурах клеток (BS-C-1, Vero). AiV считается этиологическим агентом гастроэнтеритов у людей.

Porcine teschovirus Тесковирус свиней

Характерные особенности. Вирион стабилен при кислых значениях pH. Плавучая плотность в CsCi 1,33 г/см^3. В препаратах вируса часто наблюдаются пустые капсиды. Геном кодирует один VPg и лидерный (L) протеин. Полипептид 2A очень короткий и заканчивается в NPGP. Клиническое проявление может характеризоваться полиоэнцефаломиелитами, которые могут различаться по тяжести течения.

Сходство с другими таксонами. «Суперсемейство» пикорнавирусов включает такие семейства, как *Picornaviridae, Sequiviridae, Comoviridae* и *Potyviridae,* характеризующиеся общими признаками, приведенными ниже.

1 *Геном*, состоит из 1-й или 2-х (в случае вирусов двудольных растений) молекул (сегментов) односпиральной РНК с позитивной полярностью. Каждый сегмент существует как эксклюзивная мРНК (т.е. нет субгеномных РНК), содержащая 1 ORF, и связанная своим 5'-концом через О-фосфатно-эфирный мостик с остатком тирозина или серина геном-связываеющего протеина (VPg).

2 *Экспрессия генов*. Каждым геномным сегментом кодируется один полипротеин, который подвергается протеолитическому процессингу с образованием функциональных протеинов, вирус-кодируемыми протеазами.

3 *Гены*. Все члены «суперсемейства» кодируют, кроме VPg, 2C-подобный протеин, имеющий мотив связывания с нуклеотидным сиквенсом, 3C^{pro}-подобную протеазу и 3D^{po}-подобную полимеразу.

4 *Генетическая карта*. Порядок генов, 2C-VPg-3C^{liro}-3D^{po1}, общий для всех членов «суперсемейства», ген 3D^{po} всегда расположен по 3'-концу соответствующей ORF. Ген(ы) CP всегда расположены в 5'-области ORF.

5 *Структура вириона*. Отмечается значительная морфологическая вариабельность членов «суперсемейства», включающего как икосаэдральные, так я палочковидные (rod-shaped) вирусы. Однако известно 2 икосаэдральных представителя с кристаллической структурой – Picornaviridae и Comoviridae, проявляющие одинаковую, псевдо T = 3 организацию протеиновых субъединиц, которые сами имеют одинаковую р-цилиндрическую четвертичную структуру.

Значимость перекрестного реагирования между *Cricket paralysis virus* и EMCV пока не известна.

14.2.8 Семейство: *Caliciviridae*

Род: *Lagovirus,* «Norwalk-like viruses», «Sapporo-like viruses», *Vesivirus,* «Hepatitis E-like viruses»

Характеристика вириона. Вирион безоболочечный икосаэдральной симметрии. Диаметр от 27 нм до 40 нм (негативное контрастирование) или от 35 нм до 40 нм (электронная криомикроскопия). Капсид состоит из 90 димеров мажерного структурного протеина, организованных в T = 3 икосаэдральную решетку. Характерной структурной особенностью капсида является наличие 32-х чашеобразных углублений на месте пяти- и трехосных вершин (fivefold and threefold axes).

Mr (вирион) 15×10^6; плавучая плотность составляет в CsCl от 1,33 г/см^3 до 1,41 г/см^3 и 1,29 г/см^3 в глицеринтрартрате калия. Физико-химические особенности изучены не у всех представителей семейства.

Вирус геморрагической болезни кроликов (RHDV), относящийся к роду *Lagovirus*. стабилен при широком спектре значений pH (от 4,5 до 10,5). Вирусы рода «Norwalk-like viruses» (*Norwalk virus,* NV) устойчивы к воздействию кислых сред, эфира и относительно стабильны при нагревании. Штаммы рода *VesMrus* инактивируются при значениях pH от 3 до 5, термоинактивация ускоряется при высокой концентрации ионов Mg^{2+}; устойчивы к воздействию эфира, хлороформа и средних детергентов.

Геном. РНК: 1 молекула, односпиральная, линейная, позитивной полярности,

инфекционная; размер от 7,4 kb до 8,3 kb. 5'-конец геномной РНК ковалентно связан с протеином VPg (Mr от 10×10^3 до 15×10^3), а 3'-конец полиаденилирован. Субгеномная РНК (от 2,2 kb до 2,4 kb) вируса геморрагической болезни кроликов (RHDV) и калицивируса кошек (FCV) синтезируется в клетках и связана с VPg.

Протеины. Вирионы состоят, преимущественно, из одного мажерного капсидного протеина (CP, Mr от 58×10^3 до 60×10^3). У вирионов RHDV обнаружен второй минорный структурный протеин (Mr 10×10^3), аналога которому у других калицивирусов не идентифицировано. Неструктурные протеины гомологичны таковым пикорнавирусов и включают домены хеликазы 2C, цистеиновой протеазы 3C и РНК-зависимой РНК полимеразы. Калицивирусный VPg ковалентно связан с вирусной РНК и соответствует участку генома калицивирусов, аналогичному участку 3B пикорнавирусов, хотя четкой гомологии по аминокислотному сиквенсу не просматривается. Данных о наличии в составе вирионов липидов и углеводов нет.

Организация генома и репликация. Геномная РНК, имеющая позитивную полярность, имеет 2 или 3 мажерные ORFs. Неструктурные протеины кодируются в 5'-области генома, тогда как структурные – в 3'-области.

Репликация происходит в цитоплазме; в инфицированных клетках идентифицировано 2 вида мажерных РНК с позитивной полярностью. Полноразмерная позитивная РНК служит матрицей для трансляции крупного полипротеина, который, затем, подвергается разрезанию вирус-кодируемой протеазой, с образованием зрелых неструктурных протеинов. Субгеномная позитивная РНК, соответствующая 3'-области геномной РНК, является матрицей для трансляции мажерного вирусного CP и 3'-концевого продукта ORF. В клетках, инфицированных FCV или вирусом морских львов Сан Мигель (SMSV), обнаруживается двуспиральная РНК, соответствующая по размеру геномной РНК, что свидетельствует об осуществлении репликации через промежуточные негативные формы цепей.

Антигенные свойства. Изучение перекрестной активности в естественных условиях и в экспериментах с использованием моноклональных антител показало, что RHDV и вирус синдрома европейских коричневых зайцев *(European brown hare*

syndrom virus, EBHSV) антигенно различны. Антигенные типы определялись на основе исследований по перекрестному заражению, иммуноэлектронной микроскопий или твердофазной иммуноэлектронной микроскопии для некультивируемых штаммов родов «Norwalk-like viruses» и «Sapporo-like viruses». Много серотипов определено для штаммов вируса везикулярной экзантемы свиней (VESV) и SMSV**.** Для штаммов FCV описан 1 серотип, имеющий значительные антигенные вариации. Рекомбинантные вирусоподобные частицы были получены при экспрессии мажерного структурного СР калицивирусов в бакуловирусных и растительных экспрессионных системах. Такие VLPs очень иммуногенны и сходны в антигенном отношении с нативными вирионами.

Биологические особенности. Калицивирусы инфицируют широкий спектр животных, включая лошадей, КРС, свиней, кроликов, кошек, скунсов, ластоногих, китовых, шимпанзе и человека. Хотя калицивирусы имеют довольно определенный круг хозяев, VESV, относящийся к роду *Vesivirus,* является исключением и инфицирует широкий круг хозяев. Например, VESV-подобные вирусы были выделены от ряда морских животных (включая рыб), птиц, рептилий и наземных млекопитающих. Географическое распространение каждого вида калицивируса отражает распространение хозяина.

Передача вируса происходит алиментарно через контаминированный корм, воду, выделения, реже аэрозольно. Векторы в распространении вируса, как правило, не участвуют, хотя описана возможность механического распространения RHDV членистоногими.

Калицивирусы ассоциируются с рядом патологических процессов. RHDV ассоциируется с генерализованной инфекцией, сопровождающейся некрозом печени, который запускает механизм диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови и быстрой гибели кроликов возраста старше 3-х месяцев. Описан невирулентный штамм RHDV. Калицивирусы человека, относящиеся к родам «Norwalk-like viruses» и «Sapporo-like viruses», обычно вызывают кратковременные гастроэнтериты, сопровождающиеся такими симптомами, как тошнота, диарея, рвота, абдоминальные спазмы (колики), лихорадка и общее недомогание. У свиней, инфицированных

VESV, клиническая картина часто не отличимая от таковой при ящуре и включает появление везикул во рту, на языке, губах, носовом зеркале, конечностях. Кроме этого инфекция может сопровождаться развитием энцефалита, миокардита, лихорадкой, диареей, абортами и отставанием в развитии. SMSV сходен с VESV, однако данные о естественном инфицировании морских животных очень ограничены. Калицивирусная инфекция у приматов сопровождается везикулярной сыпью на слизистых; иногда протекает персистентно. FCV ассоциируется у кошек с конъюнктивитом, ринитом, пневмонией, везикулярным поражением слизистых, диареей и парезами и может вызывать развитие персистентной инфекции с сохранением вируса в миндалинах.

Род: *Lagovirus*

Типовой вид: *Rabbit hemorrhagic disease virus* (RHDV) (вирус геморрагической болезни кроликов).

Характерные особенности. Штаммы данного рода образуют внутри семейства отдельную филогенетическую группу. Геном имеет две мажерные ORFs. ORF1 кодирует неструктурный полипротеин и мажерный структурный протеин CP (VP60). ORF2 перекрывает ORF1 на 5 и 8 нуклеотидов у RHDV и EBHSV, соответственно. ORF2 кодирует небольшой протеин (VP10), который был идентифицирован как минорный структурный компонент вириона RHDV. Эти вирусы ассоциируются с инфекцией кроликов и зайцев (lagomorphs) и могут вызывать эпизоотии с высоким уровнем смертности данных животных.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Виды вирусов рода *Lagovlrus* характеризуются следующими признаками:

- составляют большую филогенетическую ветвь внутри рода;
- одинаковая организация генома;
- идентичность по аминокислотам более 75 % по CP;
- спектр естественных хозяев.

Официально зарегистрировано 2 вида.

Род: «Norwalk-like viruses»

Типовой вид: *Norwalk virus* (NV) (вирус Норволк).

Характерные особенности. Штаммы данного рода образуют внутри семейства отдельную филогенетическую группу. Геном имеет 3 мажерные ORFs. ORF1 кодирует неструктурный полипротеин. ORF2 кодирует мажерный структурный протеин CP и перекрывает ORFlHa 14 нуклеотидов, у штаммов Норволк и Саутгемптон, и на 17 нуклеотидов у штамма Лордсдэйл. ORF3 перекрывает на 3 нуклеотид ORF2 и кодирует протеин, функция которого не известна. Члены рода часто, но не всегда, имеют менее определенную поверхностную структуру (при негативном контрастировании).

Для подразделения вирусов данного рода на виды необходимы дополнительные характеристики. Официально зарегистрирован 1 основной и 1 предполагаемый вид.

Род: «Sapporo-like viruses»

Типовой вид: *Sapporo virus* (SV) (вирус Саппоро).

Характерные особенности. Штаммы данного рода образуют внутри семейства отдельную филогенетическую группу. Сиквенс полноразмерного генома определен только для вируса Манчестер. Геном данного вируса имеет 3 мажерные ORFs. ORF1 кодирует неструктурный полипротеин и мажерным структурным протеином CP. ORF2 перекрывает ORF1 и кодирует расчетный небольшой протеин, функция которого не известна. ORF3 начинается на 11 нуклеотидов ниже расчетного стартового кодона CP и кодирует расчетный протеин длиной 160 аминокислот. Однако, у некоторых штаммов ORF3 отсутствует. Вирусы данного рода ассоциируются со спорадическими вспышками гастроэнтеритов у людей и часто (но не всегда), при негативном контрастировании, имеют чашеобразные поверхностные структуры, морфологически отличающиеся от таковых других калицивирусов.

Для подразделения вирусов данного рода на виды необходимы дополнительные характеристики. Официально зарегистрирован 1 вид.

Род: *Vesivirus*

Типовой вид: *Vesicular exanthema of swine virus* (VESV) (вирус везикулярной экзантемы свиней).

Характерные особенности. Штаммы данного рода образуют внутри семей-

ства отдельную филогенетическую группу. Геном имеет 3 мажерные ORFs. ORF1 кодирует неструктурный полипротеин с мажерным структурным протеином CP (VP60). Характерным для данного рода является то, что ORF2 кодирует мажерный структурный CP, который транслируется как протеин-предшественник, а затем разрезается до образования зрелого CP. ORF1 и ORF2 вирусов данного рода раделяются на 2 нуклеотида (GC – у штаммов FCV). ORF3 отличается от ORF2 на 1 нуклеотид и кодирует небольшой основной протеин, функция которого не известна. Продукт ORF3 обнаруживается в клетках, инфицированных FCV. Большинство членов данного рода хорошо накапливаются в культурах клеток, что отличает их от представителей других 3-х родов калицивирусов, которые не культивируются ни в одной обычной культуральной системе. FCV наиболее хорошо накапливается в культурах клеток кошачьего происхождения; *in vivo* первичным местом репликации является респираторный тракт. Изоляты VESV накапливаются во многих культурах клеток и инфицируют широкий спектр хозяев, у которых инфекция, как правило, сопровождается везикулярным поражением кожи. Геномная РНК VESV, RHDV и FCV инфекционна.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Виды вирусов рода *Vesivirus* характеризуются следующими признаками:

- составляют большую филогенетическую ветвь внутри рода;
- одинаковая организация генома;
- идентичность по аминокислотам более 60 % по CP.

Официально зарегистрировано 2 вида.

Сходство с другими таксонами. Калицивирусы имеют некоторые признаки, общие с представителями семейств *Picornaviridae, Potyviridae* и *Comoviridae:* геном представлен односпиральной позитивной РНК, связанной 5'-концом с VPg и имеющей поли(А)-тракт по 3'-концу. Предполагаемый вирусный RgRp калицивирусов проявляет гомологию по сиквенсу с пикорнавирусами.

Род: «Hepatitis E-like viruses»

Типовой вид: *Hepatitis E virus* (HEV) (вирус гепатита Е).

Характеристика вириона. Вирион безоболочечный икосаэдральной симмет-

рии. Диаметр от 27 нм до 34 нм. Плавучая плотность составляет 1,35 г/см^3 и 1,29 г/см, в CsCl и глицеринтрартрате калия, соответственно.

Геном. РНК: 1 молекула, односпиральная, позитивной полярности; размер 7,2 kb; 3'-конец полиаденилирован.

Протеины. Вирионы образованы мажерным капсидным протеином (CP, расчетная Mr 71 × 10^3). Обнаруживается минорный иммунореактивный протеин (расчетная Mr 1,5 × 10^3), функция которого не известна. Неструктурные протеины имеют незначительное сходство с таковым супергруппы «альфа-подобных» вирусов и включают домены метилтрансферазы, РНК хеликазы, папаино-подобной цистеиновой протеазы и РНК-зависимой РНК полимеразы.

Организация генома и репликация. Геномная РНК вируса гепатита Е (HEV) имеет 3 ORFs, Неструктурные протеины кодируются по 5'-области генома, тогда как структурные – по 3'-области. ORF1 кодирует неструктурный полипротеин, ORF2 кодирует мажерный протеин CP. ORF3 перекрывает ORF1 и ORF2 и кодирует небольшой протеин (123 аминокислоты), функция которого не известна.

Антигенные свойства. Описан только один серотип, со значительной перекрестной реактивность между циркулирующими штаммами.

Биологические особенности. Вирус гепатита Е ассоциируется со вспышками или спорадическими случаями острого, распространяющегося алиментарно, гепатита у людей. Считается, что вирус эндемичен в странах тропиков и субтропиков Азии, Африки и в Мексике, однако исследования на наличие антител показали широкое (повсеместное) распространение данного вируса (вероятно непатогенных форм). Исследование на наличие антител в популяциях приматов и свиней показали вероятность циркулирования среди этих животных вируса гепатита Е или родственных ему. От свиней были выделены штаммы вируса гепатита Е, близкородственные антигенно и генетически вирусу гепатита Е человека.

Официально зарегистрирован 1 вид *Hepatitis E virus* (HEV) (вирус гепатита Е).

Сходство с другими таксонами. HEV имеет сходство с представителями семейства *Caliciviridae,* которое проявляется в морфологической структуре (наблюдаемой при электронной микроскопии) и организации генома. HEV проявляет наи-

большее, но ограниченное сходство по аминокислотам репликативных энзимов с вирусом краснухи, альфавирусами семейства *Togaviridae* и фуровирусами растений.

Неклассифицированные вирусы семейства (7 видов).

Amielosis chronic stunt virus, Bovine enteric caiicivirus, Canine calicivirus, Fowl calicivirus, Mink calicivirus, Porcine enteric calicivirus, Warlus calicivirus.

14.2.9 Семейство: *Astroviridae*

Род: ***Astrovirus***

Типовой вид: *Human astrovirus* (HAstV) (Астровирус человека).

Характеристика вириона. Вирион сферический, без оболочки; диаметр от 28 нм до 30 нм. На поверхности примерно 10 % вирионов можно различить структуры, напоминающие отдельные пяти, шести конечные звезды.

Mr (вирион) 8×10^3, плавучая плотность в CsCl от 1,36 г/см^3 до 1,39 г/см^3.

Вирионы устойчивы при pH 3, при температуре 50 °C сохраняют активность в течение 1 часа, при 60 °C – в течение 5 минут, резистентны к воздействию хлороформа, жирорастворителей, неионных и анионных детергентов.

Геном. РНК: 1 молекула, односпиральная, инфекционная, с позитивной полярностью; размер от 6,8 kb до 7,9 kb; имеет поли(A)-тракт по 3'-концу. Структура 5'-конца не известна.

Протеины. Белковая композиция вириона не известна, однако все изоляты имеют не менее 2-х, возможно 3-х, мажерных протеинов с Mr от 24×10^3 до 39×10^3. Некоторые изоляты также содержат более мелкие протеины (Mr от 13×10^3 до 36×10^3).

Организация генома и репликация. Организация генома и стратегия репликации определим для двух астровирусов человека. В цитоплазме инфицированных клеток обнаруживаются полиаденилированные субгеномные РНК. Актиномицин D не ингибирует репликацию. Предполагаемый предшественник капсидного протеина (CP) с Mr от 86×10^3 до 90×10^3 обнаруживается в цитоплазме инфицированных

клеток. Микросиквенс протеинов VP26 и VP29 астровируса человека 2 (HAstV-2) показал, что, вероятно, эти протеины перекрываются и образуются при альтернативном процессинге.

На ранней стадии инфекции, протеины выявляются в ядре клетки. В цитоплазме инфицированных клеток зрелый вирус часто виден в виде кристаллической структуры.

Антигенные свойства. На основе реакции нейтрализации и иммуноэлектронной микроскопии показано существование не менее 8 серотипов астровирусов человека. Они имеют, как минимум, 1 общий эпитоп, распознаваемый моноклональными антителами. Нейтрализующие эпитопы идентифицированы у протеинов VP26 и VP29 HAstV-1 и HAstV-2. Как минимум 2 серотипа бычьих астровирусов было идентифицировано с использованием реакции нейтрализации.

Биологические особенности. Астровирусы имеют определенный спектр естественных хозяев; были детектированы в пробах экскрементов от людей, кошек, КРС, оленей, собак, уток, мышей, свиней, овец и индеек. Распространяются алиментрано. Векторов передачи не описано. Астровирусы распространены повсеместно и ассоциируются с частотой от 2 % до 8 % острых небактериальных гастроэнтеритов у детей. Характерная особенность астровирусной инфекции у людей и животных – самоограничивающийся гастроэнтерит. У человека астровирусы детектируются при дуоденальной биопсии в эпителиальных клетках, локализованных в нижних частях ворсинок (villi). У телят астровирусная инфекция локализуется в специализированных М-клетках, расположенных над Пейеровыми бляшками. Как правило, фатальный гепатит отмечается у утят. Астровирус уток отличается от изолятов астровирусов индеек и цыплят при исследовании в тестах по протективной защите и межвидовой передаче.

Астровирусы человека, быков, кошек, свиней были выделены в первичных клетках почки эмбриона свиньи, но только вирусы человека и свиней были адаптированы к росту в созданных культурах клеток. Для серийного пассирования вируса, в ростовой среде необходим трипсин. Астровирус уток 1 накапливается в куриных эмбрионах после слепых пассажей в амниотическом мешке. Некоторые из инфици-

рованных эмбрионов погибают в течение первых 7 суток. Инфицированные эмбрионы останавливаются в развитии, а в печени, которая некротизируется и приобретает зеленоватый оттенок, обнаруживаются астровирусоподобные частицы.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Виды подразделяются на основе спектра естественных хозяев (вида животного, от которого был выделен вирус). Серотипы определяются по 20-ти кратной (или больше) разнице титров, полученных в перекрестной нейтрализации (two-way). Серотипы, определенные для конкретного вида, обозначаются номером (например, HAstV-1, HAstV-2 и т.д.). Определено не менее 8 серотипов астровирусов человека, 2 – астровирусов КРС и по 1 серотипу астровирусов уток, овец, свиней и индеек. Родство разных видов не определено. Официально зарегистрировано 7 видов.

14.2.10 Семейство: *Nodaviridae*

Род: *Alphanodavirus, Betanodavirus.*

Род: *Alphanodavirus*

Типовой вид: *Nodamura virus* (NoV) (Вирус Нодамура).

Характеристика вириона. Вирион безоболочечный; форма, ориентировочно, сферическая; симметрия икосаэдральная (T = 3); диаметр от 29 нм до 32 нм. При негативном контрастировании поверхностных структур не идентифицировано. Пустые оболочки редко встречаются в препаратах вируса.

Mr (вирион) 9×10^6, плавучая плотность в CsCl от 1,30 г/см^3 до 1,34 г/см^3. Инфекционность вирионов, суспендированных в воде, сохраняется при обработке хлороформом. Инфекционность вирусов Нодамура (NoV), *Black beetle virus* (BBV) и *Flock house virus* (FHV) стабильна при комнатной температуре в 1 %-ом SDS, но *Boolarra virus* (BoV) инактивируется. Вирионы стабильны при низких значениях pH.

Геном. РНК: 2 молекулы, односпиральные, позитивной полярности: РНК-1 (Mr $1{,}1 \times 10^6$) и РНК-2 (Mr $0{,}48 \times 10^6$). РНК составляет 16 % массы вириона. Инфекционность поддерживается обеими молекулами, которые инкапсидируются в одной вирусной частице. Обе молекулы копированы по 5'-концам (cap zero structures), по

3'-концам поли(А)-треков не имеют. 3'-конец не модифицируется даже после обработки денатурирующими агентами, что свидетельствует о нереактивности 3'-концевых ОН-групп.

Протеины. Капсид состоит из 180 белковых субъединиц (протомеров), организованных в поверхностную решетку (Т = 3). Каждый протомер состоит из одного капсидного протеина (СР, протеин а) или двух продуктов его разрезания (протеины р и у). У FHV эти протеины следующие: протеин а – Mr 44 × 10^3, 407 аминокислотных остатков; протеин р – Mr 40 × 10^3, аминокислотные остатки 363; протеин у – Mr 4 × 10^3, аминокислотные остатки от 364 до 407. Морфогенез включает образование неинфекционных провирионов, которые приобретают инфекционность за счет аутокаталитического разрезания протеина а с образованием протеинов р и у. Разрезание часто бывает неполным, и вирионы могут содержать остатки неразрезанного протеина а. N-концы протеинов а и 3 блокированы.

Организация и репликация генома. Альфанодавирусы репродуцируются в цитоплазме инфицированных клеток. Синтез РНК не ингибируется актиномицином D. Инфицированные клетки содержит 3 вида односпиральных РНК: РНК-1 (3,1 kb; Mr 1,1 × 10^6), РНК-2 (1,4 kb; Mr 0,48 × 10^6) и субгеномную РНК-3 (0,39 kb; Mr 0,13 × 10^6), нуклеотидный сиквенс которой соответствует 3'-концу РНК-1 (387 нуклеотидов, в случае FHV). РНК-3 в вирионы не упаковывается, ее 3'-конец химически не активен, как и у РНК-1 и 2. РНК-1 кодирует протеин А (Mr 112 × 10^3), который является каталитической субъединицей вирусной РНК-зависимой РНК полимеразы. РНК-2 кодирует протеин а, предшественник СР (Mr 44 × 10^3). В зависимости от вида вируса РНК-3 кодирует 1 или 2 малых протеина (В1 и В2, Mr 11 × 10^3), функции которых не известны. В1 кодируется в той же ORF, что и протеин А, тогда как В2 кодируется по перекрывающей ORF. РНК-3 BoV не кодирует протеин В1, но все известные альфанодавирусы кодируют протеин В2, который, по-видимому, существенен для продуктивной инфекции, но его роль в репликации РНК не ясна. В клетках, трансфицированных выделенной РНК-1, синтезируется РНК-1 и РНК-3, но не РНК-2. Репликация РНК-2 сильно ингибирует синтез РНК-3, а трансляция РНК-2 подав-

ляет трансляцию РНК-1.

Антигенные свойства. NoV, BBV, FHV и BoV перекрестно реагируют между собой в реакции преципитации (double-diffusion precipitin test), но все 4 члена представляют разные серотипы (титр нейтрализации каждой антисыворотки в гетерологичном перекресте менее 0,5 %).

Биологические особенности. Все виды альфанодавирусов были выделены, в естественных условиях, от насекомых, хотя данные серологических исследований дают основания полагать, что NoV также инфицирует свиней и, вероятно, цапель. По-видимому, NoV является единственным из нодавирусов, инфицирующий как позвоночных, так и беспозвоночных, вызывая их гибель. Другие альфанодавирусы не проявляют строгой специфичности в отношении хозяев-насекомых.

В лабораторных условиях большинство альфанодавирусов способны накапливаться в личинках большой восковой моли (*Galleria meUoneltct*), у которых они вызывают параличи и гибель. NoV, выделенный от москитов, также хороню накапливается у мышат-сосунов, но не в культуре клеток *Drosophila melanogaster.* FHV, BBV и BoV хорошо накапливаются в культурах клеток из тканей *Drosophila melanogaster,* в монослое которых образуют бляшки. Дефектные интерферирующие частицы легко часто образуются, если только вирус пассируется не с низкой множественностью заражения. Персистентная инфекция с последующей устойчивостью к суперинфекции часто наблюдается в культуре клеток *Drosophila melanogaster.* NoV плохо репродуцируется в культуре клеток, но может быть накоплен путем трансфицирования культур клеток насекомых или млекопитающих вирионной РНК при температуре около 34 °С.

NoV может быть передан мышатам-сосунам через москитов *Aedes aegypti.* При инъецировании данного вируса мышатам-сосунам у них развиваются параличи, после чего они погибают, однако у взрослых мышей болезнь не развивается. У своих естественных хозяев-насекомых, альфанодавирусы вызывают отставание в развитии, параличи и гибель.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Подразделение альфанодавирусов на виды проводится по критериям, приведенным ниже.

1 *Биологические свойства (спектр восприимчивых животных, переносчики, пути распространения).* Спектр естественных хозяев нодавирусов изучен недостаточно, но в некоторых случаях может быть довольно широким. Выделение вируса от новых хозяев, само по себе не является свидетельством выделения нового вида нодавируса.

2 *Антигенные свойства.* Антисыворотки, полученные против отдельных изолятов или штаммов одного вида нодавирусов, проявляют высокий уровень перекрестной активности в Вестерн-блоте или реакции нейтрализации. Низкий уровень перекрестной активности в этих тестах с использованием антисывороток к уже известным видам нодавирусов может свидетельствовать о новом виде вируса.

3 *Физико-химические характеристики вириона:*

а) *электрофоретическая мобильность вириона.* Интактные вирусные частицы данного вида мигрируют в агарозном геле в неденатурирующих условиях с характерной электрофоретической мобильностью;

б) *коэффициент седиментации и плавучая плотность.*

4 *Характеристики структурных протеинов.* Может быть использована электрофоретическая мобильность в SDS-PAGE предшественника CP или продуктов его разрезания.

5 *Молекулярная характеристика генома:*

а) *электрофоретическая мобильность РНК.* При отсутствии данных по сиквенсу может быть использована электрофоретическая мобильность вирусных геномных РНК;

б) *РНК гибридизация.* При отсутствии различий в электрофоретической подвижности, можно исследовать способность к РНК гибридизации.

6 *Особенности сиквенса генома.* Сравнительный анализ нуклеотидных сиквенсов 2-х геномных РНК с таковыми других нодавирусов. Так как геном нодавирусов сегментирован, может происходить реассортация, и сегменты генома могут иметь разное эволюционное происхождение.

Применение данных критериев. В практике, критерии 1-5 дают основания предполагать о новом виде, однако определяющим является анализ нуклеотидного

сиквенса вирусного гена CP. Два близких вида BBV и FHV проявляют идентичность по сиквенсу РНК-2 80 % на нуклеотидном уровне и 87 % на аминокислотном уровне. Однако их РНК-1 проявляют идентичность на 99 %. Официально зарегистрировано 7 основных и 1 предполагаемый (Pariacoto virus) вид.

Род: *Betanodavirus*

Типовой вид: *Striped jack nervous necrosis virus* (SJNNV).

Характеристика вириона. Вирион безоболочечный, сферический; диаметр от 25 нм до 30 нм. В отличие от большинства альфанодавирусов пустые частицы часто обнаруживаются при электронной микроскопии вирусных препаратов.

Плавучая плотность в CsCl от 1,31 г/см^3 до 1,36 г/см^3 *(Dicentrarchus labrax encephalitis virus,* DIEV), вирионы DIEV стабильны при pH от 2 до 9, устойчивы к нагреванию до 56 °C в течение 30 минут, резистентны к воздействию хлороформа.

Геном. РНК: 2 молекулы, односпиральные, позитивной полярности: РНК-1 (Mr 1,01 × 10^6) и РНК-2 (Mr 0,49 × 10^6). Обе молекулы не имеют по 3'-концам поли(A)-треков.

Протеины. Структурные протеины представлены двумя полипептидами с Mr 42 × 10^3 и 40 × 10^3, соответственно. Считается, что последний является продуктом процессинга первого, однако степень родства между ними не ясна.

Организация и репликация генома. Бетанодавирусы реплицируются в цитоплазме. Инфицированные клетки содержат 3 вида односпиральных РНК: РНК-1 (3,1 kb; Mr 1,01 × 10^6), РНК-2 (1,4 kb; Mr 0,49 × 10^6) и субгеномную РНК-3 (0,4 kb; Mr 0,13 × 10^6), нуклеотидный сиквенс которой соответствует 3'-концу РНК-1 (387 нуклеотидов, в случае FHV). РНК-3 в вирионы не упаковывается. РНК-1 кодирует протеин la (Mr 40 × 10^3), РНК-2 кодирует CPs: 2a (Mr 42 × 10^3) и предполагаемый продукт его процессинга (Mr 40 × 10^3). Протеины, кодируемые РНК-3 не идентифицированы.

Антигенные свойства. Данных по антигенным свойствам бетанодавирусов мало, однако известно, что SJNNV антигенно близок с *bates calcarifer encefalitis virus* (LcEV) и DIEV.

Биологические особенности. Все виды бетанодавирусов были выделены от молоди морских рыб, у которых они вызывают вакуолизирующую энцефалопатию, ассоциируемую с нарушением поведенческих реакций и высоким уровнем смертности. Эти болезни особенно часто отмечались на коммерческих инкубаторных станциях, и сопровождались серьезными проблемами в системе промышленного рыбоводства.

В лабораторных условиях D1EV реплицируется в культурах клеток личинок морского окуня и полосатых змееголовов (striped snakehead fish). Незначительное накопление вируса наблюдается в некоторых культурах клеток млекопитающих (COS-1 и HeLa).

Антитела к SJNNV были обнаружены в 65 % проб плазмы диких и, разводимых в искусственных условиях, полосатых щук (striped jack), что свидетельствует о широком распространении вируса. Вирусные антигены были обнаружены в икре, у личинок и в яичниках инкубаторных и диких рыб, откладывающих икру, что свидетельствует о горизонтальном и вертикальном путях распространения вируса.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Критерии подразделения бетанодавирусов на виды аналогичны таковым альфанодавирусов. Официально зарегистрировано 7 основных и 2 предполагаемых вида.

Филогенетическое родство внутри семейства. Между альфанодавирусами идентичность по аминокислотным сиквенсам CP соответствует от 38 % до 87 %, тогда как между бетанодавирусами – 80 % и выше. Между представителями альфа- и бетанодавирусами уровень гомологии по данным сиквенсам составляет примерно 10 %.

14.2.11 Порядок: *Nidovirales*

Семейство: *Coronaviridae, Arleriviridae*

Особенности вириона. Порядок включает два семейства вирусов, имеющих ряд характерных признаков.

1 Геном представлен линейной, несегментированной, односпиральной, пози-

тивной полярности РНК.

2 Организация генома в направлении от 5'- к 3'-концу предусматривает расположение гена репликазы перед генами структурных протеинов. Другие гены неструктурных протеинов, также расположенные ниже гена репликазы, различаются по количеству и взаимному расположению.

3 3'-котерминальный блок (3'-coterminaI nested set) четырех или более субгеномных РНК.

4 Геномная РНК функционирует как мРНК для трансляции репликазы.

5 Обычно транслируются только 5' уникальные участки мРНК, которых нет у следующих более мелких РНК.

6 Наличие вирионной оболочки.

7 Интегративный мембранный протеин, проникающий через мембрану не менее трех раз.

8 3'-полиаденилирование геномной РНК.

9 Ген 1 кодирует вирусную репликазу с двух больших ORFs: la и lb, с возможностью рибосомального сдвига для транслирования второй ORF.

10 ORF lb кодирует предполагаемые полимеразный и хеликазный домены, последний расположен ниже полимеразного. Каноническим полимеразным GDD мотивом является SDD.

Морфология. К порядку *Nidovirales* относятся оболочечные вирусы со структурой, проявляющей сходства и различия по внешним структурным особенностям или нуклеокапсиду вириона. Вирусы двух родов семейства *Coronaviridae (Coronavirus* и *Torovirus)* имеют крупные, проникающие сквозь оболочку, отростки (пепломеры), образуемые, у коронавирусов, гримерами спайк-протеина. Эти олигомеризованные структуры обеспечивают им характерный вид короны, наблюдаемый при электронной микроскопии, что я послужило основой для названия семейства. В противоположность этому, представители семейства *Arteriviridae* имеют более короткие, проходящие сквозь оболочку, спайк-протеины, не образующие видимых (различимых) пепломеров. Коронавирусы имеют коровую оболочку (shall), внутри которой заключен внутренний нуклеокапсид, имеющий спиральную симметрию. То-

ровирусный нуклеокапсид имеет необычную морфологию, напоминающую тороид, что легло в основу названия. У вирусов семейства *Arteriviridae* идентифицирована коровая оболочка, вероятно, икосаэдральная, содержащая геном.

Коронавирусные частицы имеют диаметр 145 нм (включая пепломеры), а внутренняя коровая оболочка, которая, вероятно, икосаэдральная – 65 нм. Внутри коровой оболочки коронавирусов находится спиральный нуклеокапсид. Размер вирионов торовирусов как у коронавирусов, тогда как размер вирионов артеривирусов значительно меньше: диаметр их вирионов составляет от 50 нм до 70 нм, а нуклеокапсида от 25 нм до 35 нм, отсутствуют поверхностные отростки (выступы). У артеривирусов обнаруживаются чашевидные структуры, диаметром от 10 нм до 15 нм.

Геном представителей порядка *Nidovirales* представлен инфекционной, линейной, позитивной полярности, полиаденилированной, односпиральной и, как минимум, у артери- и коронавирусов 5'-кэпированной, молекулой РНК. Размер генома варьирует в пределах от 27,6 kb до 31,0 kb *(Coronavirus),* от 20 kb до 25 kb *(Torovirus)* и от 13 kb до 16 kb *(Arlerivirus).* Геном коронавирусов является самым крупным нефрагментированным вирусным РНК-геномом. Определен полный сиквенс некоторых коронавирусов *(Murine hepatitis virus,* MHV; *Transmissible gastroenteritis virus,* TGEV; *Infectious bronchitis virus,* 1BV; *Human coronavirus 229E,* HCoV-229E) и артеривирусов *(Equine arteritis virus,* EAV; *Lactate dehydrogenase-elevating virus,* LDV; *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus,* PRRSV).

Протеины. Оболочка коронавирусов содержит 3-4 протеина. Спайк-протеины (S) корона- и торовирусов имеют сильно экспонированный глобулярный домен и стволовую часть, содержащую шестикратные повторы, свидетельствующие о суперскурченной структуре. Мембранные протеины (M) корона- и торовирусов различаются по сиквенсу, но сходны по размеру, структуре и функции. Протеины M сходны по признаку трех- или четырехкратного проникновения сквозь мембрану. Кроме этого, короновирусы имеют в оболочке малый структурный протеин (E) (примерно 20 молекул на вирион). У торовирусов, по-видимому, гомологичного протеина нет. Некоторые коронавирусы (MHV; *Human coronavirus OC43,* OC43; *Bovine coronavirus,* BCoV) и торовирусы содержат другой мембранный протеин с гемагглюти-

нин-эстеразной (HE) активностью,

Структурные протеины артеривирусов отличаются от таковых семейства *Coronaviridae.* У всех артеривирусов идентифицировано 3 оболочечных протеина: (1) негликозилированный мембранный протеин M (Mr от 16×10^3 до 20×10^3), проникающий через мембрану 3 раза и, таким образом, структурно напоминающий протеины M корона- и торовирусов; (2) гетерогенно N-гликозилированный, трехкратно проникающий через мембрану, различного размера протеин (обозначаемый у EAV, как большой гликопротеин GL); и (3) гликопротеин класса I (Mr от 25×10^3 до 30×10^3) (обозначаемый у EAV, как малый гликопротеин Gs), являющийся минорным компонентом вириона. Протеины GL и M ассоциируются в дисульфидносвязанные гетеродимеры и, вероятно, образуют чашевидные структуры на поверхности вириона.

Углеводы. Короновирусные протеины S и HE содержат N-связанные гликаны, протеин S сильно гликозилирован (от 25 до 35 гликанов). Протеин M коронавирусов содержит небольшое количество либо N-, либо O-связанных гликанов, что зависит от вида вируса. Эти боковые цепи расположены около аминоконца, но протеин M TGEV имеет потенциальный сайт гликозилирования и по карбоксильному концу. Данных о гликозилировании или фосфорилировании протеина E нет.

Торовирусный протеин S имеет 18 потенциальных сайтов гликозилирования. Их протеин HE *(Bovine torovirus,* BoTV) N-гликозилирован и связывает O-ацетилированные рецепторы, но протеин M не гликозилирован. У артеривирусов протеины Gs и Gi содержат N-связанные гликаны. GL (EAV) образуется при гетерогенном N-ацетиллактозаминном добавлении. Протеин M негликозилирован.

Организация генома и репликация. Несмотря на различия по сложности и композиции генома, его организация у корона-, торо- и артеривирусов имеет много общего. Две третьих генома кодируют две большие ORFs, обозначаемые ORFla и ORFlb. Расположенная ниже ORFIb экспрессируется только после смещения рамки за счет скользящего сиквенса и псевдоузловой структуры. Полипептиды, кодируемые данными ORFs протеолитически разрезаются вирускодируемыми протеиназами

с образованием зрелых протеинов, участвующих в синтезе вирусной РНК.

Нижележащая ORFlb имеет от 4 до 9 генов, кодирующих структурные протеины и, как минимум у коронавирусов, ряд неструктурных протеинов. Эти гены экспрессируются с 3'-котерминального блока (нестед-участка) субгеномных мРНК. Хотя эти мРНК структурно полицистронные, трансляция ограничена, за редким исключением, уникальными 5'-последовательностями, которых нет в следующих более мелких РНК.

Субгеномные РНК корона- и артеривирусов несут 5'-лидерные сиквенсы (от 55 до 92 нуклеотидов и от 170 до 221 нуклеотидов, соответственно), которые происходят из 5'-концов генома вирусов. Таким образом, синтез мРНК сопровождается постоянными транскрипционными событиями. Торовирусные мРНК, вероятно, не имеют больших лидерных последовательностей. Корона- и артеривирусы имеют консервативные AU-богатые последовательности, по сайтам слияния лидерных участков и участков мРНК. Эти сиквенсы обозначаются как межгенные у коронавирусов и как сайты соединения лидерной части с основной (leader-to-body junction sites, LBJ) у артеривирусов. В клетках, инфицированных корона- или артеривирусами обнаруживаются РНК негативной полярности, соответствующие мРНК. Имеются данные (относительно коронавирусов), свидетельствующие, что они являются репликативными формами (RFs), имеющими соответствующий размер, и участвующими в транскрипции в качестве матриц. Однако происходит ли транскрипция субгеномных РНК корона- и артеривирусов независимо от синтеза полноразмерных геномных РНК точно не ясно. Тем не менее, сплайсинг, как основной механизм образования субгеномных РНК у корона- и артеривирусов на поздних этапах инфекции, может быть исключен.

Ген репликазы. Перекрывающиеся ORFs la и lb, обнаруживаемые в 5'-области генома нодавирусов, часто обозначаются как «ген репликазы». Процессинг кодируемых полипротеинов приводит к появлению как протеинов, участвующих в синтезе РНК, так и ряда дополнительных продуктов, участвующих в других процессах вирусной репликации.

Сравнение особенностей стратегий репликации короно-, торо- и артеривиру-

сов позволяет точно различать представителей семейств порядка *Nidovirales* от альфа-, пикорна- и флавивирусов. Организация репликазы у представителей данного порядка в двух ORFs, экспрессия гена за счет перескока рибосомы по рамке и организация консервативных доменов внутри продуктов генов, являются уникальными.

Хотя гены репликазы артеривирусов значительно меньше (от 9,5 kb до 12 kb), чем у торо- и коронавирусов, они содержат ряд консервативных доменов, расположенных в относительно сходных позициях. Идентичность сиквенсов большинства этих доменов достигает 30 % (по аминокислотам). Консервативность двух из этих доменов (полимеразного и хеликазного), которые общие для всех вирусов, содержащих РНК с позитивной полярностью, не является удивительной; их наличие свидетельствует, что эти вирусы, вероятно, происходят от общего прототипа РНК-содержащего вируса. Однако необходимо отметить, что только у репликаз вирусов порядка *Nidovirales* хеликазный домен расположен ниже (по ходу) полимеразного мотива. Полимеразный мотив также имеет признак, характерный только для нидовирусов: замена в коровом домене классического GDD на SDD. Также, консервативность дополнительных репликазных доменов, например, домена по карбоксильному концу ORFlb, для которого не найдено гомологов среди других вирусных репликаз, ясно свидетельствует, что репликазы нидовирусов более близки между собой, чем других вирусов с позитивной РНК.

Экспрессия гена репликазы вирусов порядка *Nidovirales* приводит к образованию с ORFla/lb единого крупного протеина, Mr которого достигает у артеривирусов от 345×10^3 до 420×10^3, а у коронавирусов – от 740×10^3 до 810×10^3, и, вероятно, таких же значений у торовирусов. Наличие множества протеазных доменов у протеинов ORFla корона- и артеривирусов и их широкий протеолитический процессинг, играют важную роль в регуляции функций репликации нидовирусов. Преобладающая схема процессинга протеинов ORFla/lb нидовирусов охватывает от 10 до 20 продуктов разрезания протеолитическими ферментами разных супергрупп (папаино- и химотрипсиноподобных протеаз).

N-концевая часть протеина ORFla значительно различается по размеру и сиквенсу и определяет большие различия в размерах и структуре геномов корона- и ар-

теривирусов.

Сравнение аминокислотных сиквенсов показало, что полипротеины 1b корона-, торо- и артеривирусов существенно колинеарны. Консервативность сиквенсов между более близкородственными корона- и торовирусами кластирована по шести доменам, четыре из которых также обнаружены в ORFlb артеривирусов: «классические» домены РНК-зависимой РНК полимеразы и хеликазы, которые также присутствуют у полимераз большинства других вирусов; мотив цинкового пальца (zinc finger motif), и короткий участок от 80 до 100 аминокислотных остатков, который еще не идентифицирован у других вирусных полимераз и консервативен по С-концу у нидовирусов.

Антигенные свойства. Корона-, торо- и артеривирусу антигенно неродственны, хотя по некоторым доменам идентичность сиквенсов может достигать 30 %.

Короновирусы имеют 4 структурных протеина. (1) спайковый протеин (S), образующий тримеры и являющийся мажерным антигеном, который индуцирует образование вируснейтрализующих антител (на ряд доменов в аминоконцевой области). (2) мембранный протеин (M), имеющий 3-4 интрамембранных домена, экспонирующий на поверхности вириона аминоконаевую область одну или вместе с карбоксильным концом. Большинство антител, специфичных протеину M, имеют сродство к карбоксильной части. Поли- или моновалентные антитела к аминоконцевой части проявляют слабую вируснейтрализующую активность, но в присутствии комплемента они снижают инфекционность примерно в 100 раз. (3) нуклеопротеин (K) является доминантным антигеном, и экспрессируется на поверхности инфицированных клеток, индуцируя протективный Т-клеточный ответ. (4) оболочечный протеин (E) также экспонируется на поверхности вируса и инфицированных им клеток. В случае MHV, антитела, специфичные протеину E, нейтрализуют инфекционность вируса в присутствии комплемента.

Все четыре описанных торовируса (BoTV, EqTV, PoTV и HuTV) антигенно родственны. Они имеют 4 структурных протеина: (1) спайковый протеин (S, Mr 150×10^3) образует крупные спайки (выступы) длиной от 17 до 20 нм и индуцирует образование вируснейтрализующих и ингибирующих гемагглютинацию антител; (2)

интегративный мембранный протеин (M, Mr 26 × 10^3), трижды проходящий сквозь мембрану; (3) мембранный протеин класса I (HE, Mr 65 × 10^3), проявляющий ацетилэстеразную активность; у вирионов BoTV данный протеин формирует короткие поверхностные выступы (6 нм) и является мажерным антигеном; нуклеокапсидный протеин (N, Mr 19 × 10^3).

Известные артеривирусы (EAV, LDV, PRRSV и SHFV) инфицируют разные виды животных и перекрестно не реагируют. Артеривирусы имеют не менее 4 структурных протеинов: (1) гликопротеин G_s (Mr 25 × 10^3), индуцирующий образование вируснейтрализующих антител; (2) гликопротеин Gi. (Mr 30 × 10^3 и 42 × 10^3, в зависимости от сайта гликозилирования), также индуцирующий образование вируснейтрализующих антител; (3) негликозилированный трансмембранный протеин; и нуклеокапсидный протеин (N, Mr 12 × 10^3), тоже обладающий протективными свойствами.

Биологические особенности. Коронавирусы инфицируют много видов млекопитающих, включая человека. Основной мишенью являются эпителиальные клетки, что обусловливает поражение органов дыхания и пищеварения. Биологические векторы не известны. Распространение вируса происходит аэрозольно, алиментарно и механически. У свиней и домашней птицы может развиваться персистентная инфекция, обусловленная TGEV и 1BV, соответственно, и сопровождающаяся вирусовыделением через желудочно-кишечный тракт. Также описаны инфекции, сопровождающиеся гепатитами (MHV), поражением сердца и глаз *(Rabbit coronavirus,* RbCoV).

Торовирусы инфицируют копытных: лошадей (EqTV), КРС (BoTV) и свиней (PoTV). Человек и, вероятно, плотоядные (куньи, mustellids) также являются хозяевами для торовирусов (HuTV). Преобладает алиментарный путь распространения.

Артеривирусы инфицирую лошадей (EAV), мышей (LDV), обезьян (SHFV) и свиней (PRRSV). EAV вызывает некроз мышечных клеток мелких артерий, что приводит к проявления разнообразных клинических признаков. Фатальный исход болезни описан в естественных и экспериментальных условиях, однако в естественных

условиях инфекция протекает, как правило, подостро или субклинически. Макрофаги являются первичными клетками-мишенями. Часто формируется персистентная инфекция. Распространение, в основном, горизонтальное (аэрозольно или через укус), через родовые пути и инфицированную сперму (EAV) или репродуктивные органы (PRRSV). У персистентно инфицированных жеребцов вирусовыделение может происходить через репродуктивные органы. У беременных животных артеривирусы (PRRSV и EAV) могут вызывать аборты.

14.2.11.1 Семейство: *Coronaviridae*

Род: *Coronavirus, Torovirus*

Род: *Coronavirus*

Типовой вид: *Infectious bronchitis virus* (IBV) (вирус инфекционного бронхита).

Характеристика вириона. Вирион оболочечный, сферической формы, диаметр от 120 нм до 160 нм *(Coronavirus);* содержит внутренний, вероятно, икосаэдральный коровый чехол (диаметр 65 нм) и спиральный нуклеокапсид. Коронавирусы имеют большие поверхностные выступы, образованные гликопротеинами (пепломеры) с глобулярной и стволовой частями. Пепломеры (тримеры спайк-протеинов) примерно 20 нм в длину. У некоторых коронавирусов, таких как *Bovine coronavirus* (BoCV) и *Marine hepatitis virus* (MHV) обнаруживается второй слой пепломеров сформированный гемагглютинин-эстеразным протеином. При криоэлектронной микроскопии обнаруживается пространство между оболочкой и внутренним кором. Кор может быть освобожден после обработки детергентами. Разрушение кора приводит к высвобождению спирального нуклеокапсида, имеющего в своем составе протеин N.

Mr (вирион) 400 × 10^3; плавучая плотность в сахарозе от 1,15 г/см^3 до 1,20 г/см^3, в CsCl от 1,23 г/см^3 до 1,24 г/см^3. Вирионы чувствительны к нагреванию, воздействию жирорастворите-лей, неионных детергентов, формальдегида, окислителей и УФ облучению. После инкубирования при 37 °C в течение 24 часов наблюдалось десятикратное снижение инфекционности некоторых штаммов. Ионы магния

снижают степень термоинактивации у MHV. Некоторые вирусы обоих семейств стабильны при pH 3,0.

Геном. РНК: одна молекула, односпиральная, линейная, позитивная, инфекционная; размер от 27,6 kb до 31,0 kb (у коронавирусов). РНК коронавирусов имеет 5'-концевой кэп, предшествующий лидерному сиквенсу от 65 до 98 нуклеотидов и нетранслируемому участку (от 200 до 400 нуклеотидов). По 3'-концу нетранслируемый участок (от 200 до 500 нуклеотидов) предшествует поли(А). Вирионная РНК функционирует как мРНК и является инфекционной. Содержит от 7 до 10 функциональных генов, от 4 до 5 из которых кодируют структурные протеины. Сиквенс полных геномов определен для некоторых коронавирусов (MHV, TGEV, HCoV-229E).

Протеины. Вирионы имеют в своем составе крупный поверхностный гликопротеин (спайк-протеин, S, Mr от 180×10^3 до 220×10^3); интегративный мембранный протеин (M, Mr от 23×10^3 до 35×10^3), который интегрирует в оболочку вируса от 3 до 4 сегментов, малый мембранный протеин (E, Mr от 9×10^3 до 12×10^3) и нуклеокапсидный протеин (N, Mr от 50×10^3 до 60×10^3). Соотношение протеинов S/E/M/N для TGEV соответствует 20 : 1 : 300 : 100. Протеин S крупный (от 1160 до 1452 аминокислоты), у некоторых вирусов разрезается до S1 и S2. Данный протеин участвует в прикреплении к клетке, гемагглютинации, слиянии мембран и образовании вируснейтрализующих антител. Иммунизация одним протеином S способствует развитию протективного иммунитета против некоторых вирусов (TGEV, MHV). Карбоксиконцевая часть протеина имеет суперскрученную структуру. Протеин M образован от 225 до 260 аминокислотами и индуцирует образование а-интерферона. Коронавирусы содержат гемагглютинин-эстеразный протеин (HE, Mr 65×10^3), который формирует короткие поверхностные выступы. Этот, по-видимому, не играющий важной роли, протеин имеет рецептор-связывающий домен для 9-О-ацетилированной нейраминовой кислоты, обладает гемагглютинирующей и рецептор-разрушающей (нейраминат-О-ацетилэстераза) активностью. Протеин HE проявляет некоторую идентичность по аминокислотному сиквенсу с гемагглютинин-

эстеразным протеином вируса гриппа С. Протеин Е (от 80 до 109 аминокислот), вместе с протеином М, играет важную роль в процессе сборки вириона. Протеин N (от 377 до 455 аминокислот) сильно основный фосфопротеин, участвующий в регуляции синтеза РНК, связывается с вирусной РНК и образует спиральный нуклеокапсид.

Неструктурные протеины обычно несущественны для вирусной репликации в культуре клеток или *in vivo.* Один необходимый неструктурный протеин – репликаза, кодируемая геном 1, охватывающим 2/3 генома (от 18 kb до 22 kb). Предполагается, что репликазный ген кодирует протеин с Mr от 740×10^3 до 800×10^3, который подвергается котрансляционному процессингу. Для некоторых доменов внутри *pol* на основе гомологии по сиквенсу предполагают определенные функции; 2 папаиноподобных цистеиновых протеазы; химотрипсиновая пикорнавирусо-подобная 3С протеаза; цистеин-богатый протеин, связанный с ростовым фактором; РНК-зависимая РНК-полимераза; домен связывания с нуклеозидтрифосфатами.

Другие неструктурные протеины различаются у коронавирусов по названию и локализации. Локализация генов, кодирующих эти неструктурные протеины определена. Ген N обычно расположен по 3'-концу генома коронавирусов, за исключением TGEV, FCoV, CCoV, у которых этот ген предшествует 1-2 другим генам.

Другие компоненты вириона. Липидсодержащая оболочка вириона имеет клеточное происхождение Протеин S (MHV, BCoV) и E (MHV) также ацилирован.

Протеины S и HE содержат N-связанные гликаны, протеин S сильно гликозилирован. Протеин М содержит небольшое число N- или О-связанных гликанов, в зависимости от штамма.

Организация генома и репликация. Примерно 2/3 геномной РНК составляет полимеразный ген. Место перекрывания между участками ORFla и 1b является специфическим «скользящим» сиквенсом (7 нуклеотидов), имеющим псевдоузловую структуру (рибосомный сигнал перескакивания рамки) и необходимым для трансляции ORFlb. 3'-часть генома заключает гены, кодирующие структурные и неструктурные протеины. Организация генов неструктурных протеинов, которые расположены между генами структурных белков, различаются у разных коронавирусов.

Предполагается псевдоузловая структура и для 3'-конца вирусной РНК.

Синтез вирусной РНК проходит через процесс РНК-зависимого синтеза РНК, в котором мРНК транскрибируется с негативных цепей. Непосредственно перед большинством генов располагается консенсусная последовательность UCUAAAC для MHVJ или близкая ей у других коронавирусов. Этот сиквенс является сигналом для транскрипции субгеномных РНК. В зависимости от вида вируса и вида хозяина коронавирусные мРНК могут быть от 6 до 8 видов, различающихся по размеру. Наиболее крупная мРНК является геномной РНК, которая также служит в качестве мРНК для ORFla и 1b; остальные – субгеномные. Начиная с наибольшей, все мРНК обозначаются номерами с 1 по 7. мРНК имеют блок нестед-структуру (nested-set structure), напоминающие геномную структуру. За исключением самых мелких мРНК, все мРНК полицистронные. Обычно, транслируется только 5'-ORF каждой мРНК. Однако есть исключения: некоторые мРНК, например, мРНК-5 MHV, мРНК-3 1BV и нуклеокапсидная мРНК BcoV транслируются с внутренней инициации с образованием 2-3 продуктов.

Коронавирусные мРНК имеют и другие уникальные структурные особенности: их 5'-конец имеет лидерный сиквенс (примерно от 65 до 98 нуклеотидов), который образуется из 5'-конца геномной РНК. У вирусной геномной РНК по месту начала мРНК располагается короткий участок, который очень гомологичен 3'-концу лидерной РНК. Этот сиквенс составляет часть сигнала для транскрипции субгеномной РНК.

Синтез коронавирусной РНК происходит в цитоплазме с образованием промежуточных форм (негативных цепей). Обнаруживаются как полноразмерные, так и субгеномные негативные РНК, вид и число которых соответствует вирусспецифическим мРНК. Субгеномные негативные РНК являются зеркальным отражением позитивных субгеномных РНК. Предложено много моделей транскрипции, но наибольшее понимание нашли пока две: транскрипция с лидерным праймированием и транскрипция через синтез негативных цепей. Модель «транскрипции с лидерным праймированием» предполагает, что вирусная геномная РНК сначала транскрибируется по всей длине в негативную РНК, которая, в свою очередь, становится матри-

цей для последующего синтеза субгеномных РНК. Лидер транскрибируется с 3'-конца негативной РНК и диссоциируется от матрицы с последующей ассоциацией с матричной РНК по различным сайтам начала мРНК, играя роль праймера для транскрипции вирусных субгеномных РНК. Предполагается, что этап перемежающейся (прерывистой) транскрипции происходит во время синтеза позитивных РНК. В противоположность этой модели, модель «перемежающейся (прерывистой) транскрипции во время синтеза негативных РНК» предполагает, что этап перемежающейся транскрипции происходит во время синтеза негативных РНК, приводя к образованию субгеномных негативных РНК, которые, затем, служат матрицами для синтеза субгеномных РНК. В этой модели межгенные сиквенсы геномной РНК в местах (сайтах) начала мРНК служат в качестве сигналов, терминирующих или определяющих паузу, при синтезе негативных РНК, и затем, вновь образованные субгеномные негативные РНК перескакивают на лидерный РНК-сиквенс 5'-конца геномной РНК, который действует как праймер для трансляции.

Сигнал упаковки для РНК MHV локализован рядом с 3'-концом гена 1, Данный сигнал формирует шпилевидную структуру, определяющую упаковку дефектных или гетерологичных РНК внутрь вириона.

Коронавирусы претерпевают рекомбинации с высокой частотой во время репликации позитивных и негативных РНК. Это особенно верно в отношении MHV. Более низкая частота рекомбинации описана для IBV и TGEV.

Сборка вирусных частиц, вероятно, начинается с образования рибонуклеопротеина (RNP), взаимодействующего с компонентами корового чехла. Созревание вирионов происходит в цитоплазме путем почкования через эндоплазматический ретикулум и других пре-Гольджи мембран. Взаимодействие между протеинами M и E является ключевым событием в сборке вирусных частиц, Протеины S и HE не являются существенными для формирования вирусных частиц.

Антигенные свойства. Иммунный ответ определен в отношении 4-х структурных протеинов (S, M, N и HE, если имеется). Доминирующими антигенами, участвующими в нейтрализации вируса, являются протеины S и HE. Снижение инфекционности антителами, специфичными протеину M, происходит, обычно, в присут-

ствии комплемента. Защита от коронавирусных инфекций (MHV, TGEV) обеспечивается аффинно очищенным или рекомбинантным (экспрессируемым аденовирусом) протеином S. Антитела, специфичные протеинам M и N также обеспечивают некоторую защиту *in vivo*. Наиболее эффективная индукция образования вируснейтрализующих антител достигалась при использовании комбинации протеинов S и N. Глобулярная часть протеина S содержит много доминантных антигенных сайтов, участвующих в механизмах гуморального и Т-клеточного (цитотоксического) иммунного ответа. Другие важные эпитопы обнаруживаются также на стволовой части (например, у MHV). Сильный иммунный ответ индуцируют как амино-, так и карбоксиконцевые участки протеина M. Если нейтрализующие антитела, имеющиеся до заражения, предотвращают развитие болезни, то ответ со стороны цитотоксических Т-клеток важен для элиминации вируса. Гипервариабельные домены части S1 протеина S облегчают селекцию вирусных эскейп-мутантов, которые уклоняются как от гуморального, так и от клеточного иммунного ответа. Протеин N также участвует в развитии протективного клеточного иммунного ответа.

Иммунная система играет важную роль в патогенезе коронавирусных инфекций, участвуя в процессах демиелинизации (показано в экспериментальных условиях) и антителозависимого повышения инфекционности FCoV.

Биологические особенности. Короновирусы инфицируют птиц и млекопитающих, включая человека. Наиболее часто мишенями для коронавирусов являются респираторный и желудочно-кишечный тракт и ткани нервной системы, однако, могут поражаться и такие органы как печень, почки, сердце, глаза. Эпителиальные клетки являются основными мишенями коронавирусов. Широко распространенные клетки, такие как макрофаги, так же поражаются коронавирусами. Вирусы имеют относительно узкий круг восприимчивых хозяев, инфицируя только своих естественных хозяев и некоторые близкородственные им виды. Иногда может происходить межвидовая передача инфекции, как, например, инфекция у собак, вызванная TGEV. Биологические векторы не известны. Распространение происходит респираторно, алиментарно или механически.

Хотя коронавирусы могут связываться с клетками через убиквитарные ацети-

лированные формы гликопротеинов и липидов, для развития вирусной инфекции необходимо более специфическое связывание между вирусом и клеточными рецепторами. Коронавирусы подразделяются на 3 группы. Коронавирусы 2 группы, включая MHV, используют в качестве рецепторов членов подсемейства билиарных гликопротеинов (bgp), относящихся к семейству карциноэмбриональных антигенов.

Представители 1 группы коронавирусов (включая TGEV и HCoV-229E) используют в качестве рецептора для проникновения в клетку аминопептидазу N (APN или CD13). Поверхностными клеточными молекулами, необходимыми для инициации инфекции BCoV и HCoV-OC43, вероятно, являются гликопротеины, содержащие сиаловую кислоту (N-ацетил-9-О-ацетилнейраминовую кислоту). Тем не менее, связывание с bgp или APN не является достаточным для вирусной инфекции и не объясняет различий в тропизме коронавирусов. Помимо связывания с вышеупомянутыми рецепторами, тропизм коронавирусов определяется протеином S (вероятно имеющим сайт связывания со вторым рецептором).

Коронавирусные инфекции человека и животных регистрируются повсеместно (везде, где были проведены соответствующие вирусологические и серологические исследования).

Критерии подразделения на виды внутри рода. Подразделение на виды представителей рода *Coronavirus* проводится по следующим критериям:

1) организация и сиквенс генов неструктурных протеинов;

2) антигенные свойства;

3) процессинг протеина S до S1 и S2;

4) спектр восприимчивых животных.

Количество и локализация несущественных генов (часто кодирующих неструктурные протеины) значительно различаются. Такие гены расположены либо между генами Pol и S, S и M, M и N или после гена N. Например, коронавирусы 2 группы MHV и BCoV имеют ORF2 и 3-1, кодирующие протеин в 260 аминокислот и HE, соответственно, которые отсутствуют у коронавирусов 1 и 3 групп. Наличие ORFs между генами M и N является уникальным в отношении вида IBV, и только коронавирусы кошек и собак имеют две ORFs после гена N. В противоположность

этому, ген N является последним у MHV, BCoV, HCoV-229B, PEDV и IBV.

Серологический анализ коронавирусов 1 группы показал существование 3-х антигенных кластеров, один из которых представлен TGEV, CCoV и FCoV, тогда как два других – HCoV-229E и PEDV, соответственно.

Процессинг протеина S до S1 и S2 у коронавирусов 1 группы (TGEV, CCoV, FCoV, HCoV-229E и PEDV) не происходит, тогда как у вирусов 2 группы (MHV, BCoV, HCoV-OC43) и 3 группы (IBV) протеин S разрезается. Официально зарегистрировано 12 видов.

Род: *Torovirus*

Типовой вид: *Equine torovirus* (EqTV) (Торовирус лошадей).

Характерные особенности. Нуклеокапсид имеет вид трубки. Вирионы могут быть дисковидной, почкообразной или палочковидной (rod) формы. Наиболее изученными является торовирус лошадей (EqTV) штамм Berne, торовирус КРС (BoTV) штамм Breda. Идентифицировано 4 структурных протеина: N, M, S и HE. Протеин HE ответственен за репликацию *in vitro;* у EqTV (штамм Berne), ген HE почти весь делетирован, и имеется только 3'-концевая часть (426 нуклеотидов). Протеин HE торовирусов проявляет 30 % гомологии по сиквенсу с таковым коронавирусов и имеет сходную степень родства по сиквенсу с субъединицей 1 вируса гриппа C. В торовирусных мРНК лидерных сиквенсов не обнаружено.

Характеристика вириона. Вирионы оболочечные, плеоморфные; различают частицы сферической, овальной и почкообразной формы. К двум наиболее характерным признакам торовирусов являются наличие на оболочке спайков (выступов), напоминающих пепломеры коронавирусов, и тубулярный (трубкообразный) нуклеокапсид спиральной симметрии, определяющий форму вириона. В отличие от коронавирусов изометрический коровый чехол не идентифицирован.

Плавучая плотность в сахарозе 1,16 г/см^3, 1,18 г/см^3 и 1,14 г/см^3, соответственно для EqTV, BoTV (серотип 2) и HuTV.

Геном. РНК: одна молекула, односпиральная, линейная, позитивная, инфекционная; полиаденилированная; размер от 20 kb до 25 kb (у EqTV). РНК, вероятно, имеет 6 ORFs. 3'-нетранслируемая область охватывает 200 нуклеотидов, включая

поли(А)-участок. Процент гомологии по аминокислотам полимеразного и хеликазного доменов торо- и коронавирусов составляет от 40 % до 45 % (внутри рода *Coronavirus* – от 70 % до 90 %).

Протеины. У торовируса лошадей идентифицировано 4 структурных протеина: спайковый протеин S (спайк-протеин, Mr 180 × 10^3), состоящий из 1581 аминокислоты (который пост-трансляционно разрезается до S1 и S2); интегративный мембранный протеин (M, Mr 27 × 10^3). 233 аминокислоты; гемагглютинин-эстераза (HE, Mr 65 × 10^3); и нуклеокапсидный протеин (N, Mr 19 × 10^3), состоящий из 160 аминокислот. Протеин S имеет N-концевую сигнальную последовательность, предполагаемый С-концевой трансмембранный якорь, два предполагаемых домена с шестичленными повторами, и возможный сайт разрезания для трипсиноподобных протеаз. Протеин М не гликозилирован, составляет примерно 13 % массы вирусных протеинов и не содержит N-концевой сигнальной последовательности. Протеин HE относится к первому классу мембранных протеинов и проявляет 30 % идентичности по сиквенсу с гемагглютинин-эстеразой коронавирусов и вируса гриппа С. Протеин N составляет примерно 80 % массы протеинов вириона (EqTV), фосфорилирован и обладает способностью связывать РНК.

Другие компоненты вириона. Вирион содержит липидную двухслойную оболочку.

Протеин S (EqTV) имеет 18 потенциальных сайтов N-гликозилирования. Протеин М не гликозилирован. Протеин HE (BoTV) имеет 7 потенциальных сайтов гликозилирования.

Организация генома и репликация. Первые ORFs la и lb, транслирующиеся с 5'-области геномной РНК, кодируют вирусную репликазу. Инициирующий кодон ORFla локализован по геному в нуклеотидной позиции от 825 до 827. Четыре остальных ORFs 2, 3, 4 и 5 кодируют структурные протеины и экспрессируются путем образования 3'-котерминального блока.

Несмотря на то, что геном торовирусов содержит консервативные AU-богатые межгенные сиквенсы, данных о слиянии по этим позициям общего лидера с основой

мРНК нет. Это, по-видимому, является одним из существенных отличительных признаков торо- и коронавирусов. Однако в отношении транскрипции данное различие может быть ограничено: прямое связывание полимеразы с различными «коровыми промоторами» (у EqTV) матричных негативных цепей может, просто, заменить механизм лидерного праймирования.

Есть свидетельства о двух независимых событиях негомологичной рекомбинации в эволюции торовирусов. Первая предположительная рекомбинация связана с ORF4, геном HE. Вторым сайтом предполагаемой рекомбинации является С-концевая область ORFla (EqTV), которая содержит от 31 % до 36 % гомологии по аминокислотам при сравнении с N-концевыми 190 аминокислотами неструктурного коронавирусного протеина с Mr от 30×10^3 до 32×10^3.

Кроме продуктов ORF 2, 3, 4 и 5, которые, как считается, синтезируются при моноцистронной трансляции нестед-сета структурно полицистронных мРНК, 3'-часть генома EqTV может кодировать еще один протеин в ORF5, которая перекрывается на 264 нуклеотида с геном N, и, потенциально кодирует гидрофобный протеин (MR 10×10^3). Хотя такой протеин не идентифицирован в вирионах EqTV или в инфицированных им клетках, следует отметить, что сходная ситуация (мелкий гидрофобный протеин, экспрессируемый с ORF, перекрывающейся с геном протеина N) описана в отношении бычьего коронавируса (BCoV).

Композиция дефектных (интерферирующих) геномов размером 1 kb в составе способных к репликации вирусов, дает основания полагать, что минимальные сиквенсы, необходимые для репликации РНК EqTV (и также, вероятно, для упаковки), локализованы в двух мелких доменах, находящихся в конце геномной РНК.

Значительное N-гликозилирование и протеолитическое разрезание предшественника являются частью пост-трансляционного процессинга торовирусного протеина S. Протеин M EqTV аккумулируется во внутриклеточных мембранах и, как считается, играет роль в почковании через внутриклеточные мембраны.

Антигенные свойства. Протеин S распознается нейтрализующими и ингибирующими гемагглютинацию моноклональными антителами.

Биологические особенности. BoTV идентифицирован как патоген, вызываю-

щий гастроэнтериты у телят и, возможно, пневмонии у взрослого КРС. BoTV-инфекция обычно ограничена кишечником, хотя иногда может вовлекаться и респираторная система. EqTV с болезнью не ассоциируется. Серологические данные свидетельствуют, что данный вирус способен инфицировать копытных (лошадей, КРС, овец, коз, свиней), крыс, кроликов и некоторые виды полевых (feral) мышей. Методом электронной микроскопии торовирусы идентифицированы у человека, собак и кошек. Обнаруженные у человека торовирусоподобные частицы антигенно родственны BoTV и имеют сходство по сиквенсу. В сыворотке крови кошек антител к торовирусам не обнаружено. Инфекция, обусловленная BoTV обычно широко распространена среди молочного поголовья КРС. Наличие у телят материнских антител не предотвращает развитие инфекции, но может влиять на исход болезни. Инфекция, вызываемая BoTV встречается повсеместно (где проводились соответствующие исследования): Западная Европа, Северная Америка, Индия, Южная Африка.

Торовирусы инфицируют эпителиальные клетки тонкого и толстого кишечника, особенно в области тощей, подвздошной и ободочной кишок. В тонком кишечнике инфицируются эпителиальные клетки, расположенные в верхней трети крипт и над Пейеровыми бляшками, включая М-клетки. Торовирусные инфекции могут протекать хронически.

Критерии подразделения на виды внутри рода. EqTV, BoTV, PoTV и HuTV близкородственны как антигенно, так и генетически, но могут различаться по сиквенсу, спектру восприимчивых хозяев и патогенезу. У EqTV и BoTV гомология по сиквенсу в области 3-конца (3 kb) составляет 84 %. PoTV более отдален, что было показано по анализу сиквенса нуклеокапсидного протеина, который только на 68 % идентичен таковым EqTV и BoTV. PoTV может быть также дифференцирован от EqTV и BoTV на основе наличия у двух последних небольшой ORF, расположенной полностью внутри гена N. Эта ORF. кодирующая полипептид с приблизительной Мг 10×10^3, нарушается у PoTV терминирующим кодоном. Сиквенс ПЦР-продуктов С-концевой области гена N и 3'-нетранслируемой области показал более чем 93 % идентичности между HuTV, BoTV и EqTV. Тем не менее, незначительные, но четкие различия по сиквенсу были обнаружены между пятью изолятами HuTV и EqTV.

BoTV, PoTV и HuTV вызывают гастроэнтериты, а BoTV, в редких случаях, вызывает инфекцию респираторного тракта. Об ассоциации EqTV с какой-либо болезнью пока не известно. Официально зарегистрировано 4 вида.

Отличительные признаки между корона- и торовирусами. Коронавирусные мРНК содержат 5'-лидерный сиквенс, который не обнаружен у торовирусов. Коронавирусы имеют спиральный нуклеокапсид, окруженный коровым чехлом, тогда как торовирусы имеют трубчатый (тубулярный) нуклеокапсид. Вирусы обоих родов имеют хорошо различимые спайки (выступы), образованные крупными гликопротеинами, но протеины HE встречаются только у некоторых вирусов. Протеин N значительно крупнее у коронавирусов, чем у торовирусов; протеин M гликозилирован только у коронавирусов. Сиквенсы протеинов торо- и коронавирусов имеют незначительное сходство.

Филогенетическое родство внутри семейства. Сравнительный анализ сиквенсов протеинов S, N и M коррелирует с антигенными различиями. Вирусы, относящиеся к 1 группе, составляют один генетический кластер. Однако эти вирусы менее родственны между собой, чем вирусы 2 группы; и, особенно хорошо эволюционная дивергенция просматривается между HCoV-229-E и PEDV. Близкое родство между вирусами 2 группы (MHV, HCoV-OC43, BCoV, TCoV), формирующими генетический кластер, показано в отношении всех трех протеинов.

Ограниченное, но, в то же время, убедительное сходство сиквенсов некоторых продуктов генов между торо- и коронавирусами подкрепляют заключение, что оба рода относятся к одному семейству. Иммунологические данные свидетельствуют, что торовирусы лошадей и КРС антигенно родственны друг другу и торовирусоподобным частицам, обнаруженным в пробах, полученных от человека, но не другим вирусам животных, включая коронавирусов.

14.2.11.2 Семейство: *Arteriviridae*

Род: *Arterivirus*

Характеристика вириона. Вирионы сферические; диаметр от 45 нм до 60 нм;

состоит из изометрического нуклеокапсида диаметром от 25 нм до 35 нм, окруженного липидной оболочкой. Спайков (выступов) на поверхности вириона не обнаружено, однако наблюдается определенный поверхностный профиль.

Плавучая плотность в сахарозе от 1,13 г/см^3 до 1,17 г/см^3. Активность вирусов снижается при повышении температуры. Вирионы стабильны при хранении при температуре минус 70 °С. Вирус стабилен при значениях pH от 6,0 до 7,5. Артеривирусы инактивируются под воздействием жирорастворителей (эфир, бутанол, хлороформ) и детергентов. Непродолжительное инкубирование в присутствии неионных детергентов, приводит к эффективному разрушению вирусной оболочки (показано в отношении LDV).

Геном. РНК: 1 молекула, односпиральная, линейная, позитивная; размер от 12,7 kb до 15,7 kb. Геномная РНК имеет по 5'-концу кэп-структуру типа I (SHFV) и поли(А)-тракт по 3'-концу.

Протеины. Вирусный нуклеокапсид сформирован одним основным нуклеокапсидным протеином (N, Mr от 12 × 10^3 до 15 × 10^3). Этот протеин у всех артеривирусов кодируется 3'-конневой ORF. К оболочечным протеинам вириона относятся: негликозилированный, пронизывающий мембрану трижды, интегративный мембранный протеин (М) и мажерный вирусный гликопротеин, кодируемый ORF5 (ORF7 у SHFV), и также имеющий три потенциальных участка пронизывающих мембрану. Протеин М и протеин с ORP5 формируют гетеродимеры за счет дисульфидных связей. Минорный гликопротеин, кодируемый ORF2 относится к интегративным мембранным протеинам I класса. В вирионах также обнаруживаются гомодимеры из протеинов с ORF2. Гликопротеины, кодируемые ORF3 и 4, идентифицированы как минорные вирусные гликопротеины только у PRRSV. Клетки, инфицированные LDV или PRRSV, экспрессируют растворимый, неассоциированный с вирионом ORF3 гликопротеин. SHFV кодирует три дополнительных 3'-ORFs, которые могут быть дубликатами ORFs 2-4.

Артеривирусы кодируют 2 крупных неструктурных полипротеина: протеин ORFIa (Mr 187 × 10^3 до 260 × 10^3) и ORFlb (Mr от 345 × 10^3 до 421 × 10^3), которые разрезаются вирусными протеазами до зрелых протеинов nspla, nspip (nsp у EAV) и

nsp 2-12. Папаино-подобная цистеиновая протеаза (PCP) локализована в nspl. Полипротеин ORFIa SHFV содержит 3 копии PCP, PRRSV и LDV – по 2 копии, а EAV – одну. Цистеиновая протеаза (CP) с уникальными свойствами локализована в nsp2. Сериновая протеаза (SP), родственная членам семейства 3C-подобных протеаз, локализована в nsp4. Протеаза SP ответственна за разрезание 10 неструктурных протеинов. Nsp9 содержит мотив РНК-зависимой РНК полимеразы, а nsp 10 содержит металлсвязывающий мотив и нуклеозидтрифосат-связывающий / РНК-хеликазный мотив.

Другие компоненты вириона. Вирион имеет липидную оболочку клеточного происхождения.

Протеины, кодируемые ORFs 2-4 у EAV, LDV и PRRSV, также как ORFs 2-7 у SHFV, содержат предполагаемые сайты N-гликозилирования. Гликозилирование протеина ORF5 (EAV и, вероятно, LDV) может происходить при добавлении различного количества лакто-заминных повторов.

Организация генома и репликация. Организация генома и стратегия репликации артеривирусов сходна с таковой других нидовирусов. Вирусные неструктурные (репликазные) полипротеины, кодируемые ORFs la и lb, экспрессируются с геномной РНК и посттрансляционно процессируются вирусными протеазами. Протеин ORFlb экспрессируется только после переключения рамки считывания. Участок переключения рамки считывания содержит скользящий сиквенс выше псевдоузловой структуры РНК. Гидрофобные домены в ORFIa могут участвовать в ассоциации артеривирусного репликативного комплекса с мембранами. Идентифицировано 4 клеточных протеина, связывающихся с действующим участком по 3'-NTR, необходимых для синтеза позитивных цепей РНК с негативных матриц.

Вирусные структурные протеины кодируются с ORFs и экспрессируются с (блока nested set) 3'- и 5'-котерминальных субгеномных мРНК. Общий 5'-лидер субгеномных мРНК образуется из 5'-конца генома при перемежающейся (прерывистой) транскрипции. Блок комплементарных минус целей субгеномных РНК также идентифицирован в инфицированных клетках. Хотя с большинства субгеномных РНК, транслируется только 5'-концевая ORF. одна субгеномная РНК (мРНК2 у EAV,

PRRSV и LDV; и мРНК4 у SHFV) является бицистронной. Дополнительная бицистронная мРНК обнаружена у SHFV.

Показано, что проникновение PRRSV в клетку происходит путем эндоцитоза (зависимого от низких pH). Артеривирусы реплицируются в цитоплазме инфицированных клеток. Нуклеокапсид почкуется внутрь гладкого эндоплазматического ретикулума и/или везикулы аппарата Гольджи. Высвобождение вирионов из клеток происходит путем экзоцитоза.

Антигенные свойства. Антитела, специфичные гликопротеину ORF5 (EAV, LDV, PRRSV), обладают нейтрализующей активностью. Нейтрализационный домен соответствует эктодомену этого протеина. Моноклональные антитела, специфичные протеину ORF4 (PRRSV), также обладают нейтрализующей активностью. Нейтрализующий эпитоп протеина ORF4 соответствует участку между 39 и 79 аминокислотами. Между артеривирусами перекрестной антигенной реактивности не обнаружено. Показан LDV- и PRRSV-специфичный Т-клеточный ответ.

Биологические особенности. Артеривирусы имеют определенный спектр естественных хозяев. EAV инфицирует лошадей и обезьян, LDV – мышей, PRRSV – свиней, а SHFV – некоторые виды африканских (бабуины, африканская зеленая мартышка, обезьяна patas) и азиатских (макак) обезьян.

Артеривирусы передаются горизонтально и вертикально. Горизонтальная передача может осуществляться через респираторный тракт (EAV, PRRSV), с инфицированной спермой (EAV, PRRSV) и через инфицированную кровь или другие жидкости организма (LDV, SHFV). Вертикальная передача (внутриутробное заражение) характерна для PRRSV.

Артеривирусные инфекции могут вызывать остро или бессимптомно протекающие инфекции, а также болезни респираторных органов (PRSSV), аборты (EAV, PRSSV), фатальный полиомиелит (зависимый от возраста) (LDV) или фатальную геморрагическую лихорадку (SHFV).

Первичными клетками мишенями для артеривирусов являются макрофаги. LDV может репродуцироваться в вентральных двигательных нейронах некоторых линий инбредных мышей. LDV репродуцируется только в культуре макрофагов

мышей, SHFV и PRRSV – в первичных культурах макрофагов (легочных альвеолярных макрофагов макак резус и свиней, соответственно), так же как и в культуре клеток MA-104 (линия клеток почки африканской зеленой мартышки), а EAV репродуцируется в первичных культурах макрофагов и клеток почки лошадей, а так же в ВНК, RK-13, Vero и MA-104.

Репликация артеривирусов характеризуется формированием в инфицированных клетках спаренных мембран и двухмембранных везикул. При экспрессии вирусом вакцины гликопротеина ORF5 индуцируется апоптоз, который не ингибируется Bc1-2. Апоптоз также наблюдается в альвеолярных макрофагах свиней, клетках MA-104 и тестикулярных герминативных клетках, инфицированных PRRSV.

Род: *Arterivirus*

Типовой вид: *Equine arteritis virus* (EAV) (Вирус артерита лошадей).

Характерные особенности. Представители рода *Arterivirus* образуют отдельную филогенетическую группу. Геном кодирует 2 большие 5' ORFs la lb, которые экспрессируются с геномной РНК. ORFlb экспрессируется только при смещении рамки считывания. 3' ORFs кодируют структурные протеины и экспрессируются с блока 3'- и 5'-нетерминальных субгеномных мРНК. Вирионы содержат 1 мажерный и 1-3 минорных оболочечных гликопротеина. Нуклеокапсид артеривирусов изометрический. Выросты на поверхности вириона относительно мелкие и неразличимые, а вирусные гликопротеины не имеют суперскрученных структур. Артеривирусные полипептиды M и, особенно, N меньше по размеру аналогичных пептидов вирусов семейства *Coronaviridae.*

Критерии подразделения на виды внутри рода. Род *Arterivirus* составляют 4 вида: EAV, LDV, PRRSV и SHFV. Каждый вид представляет отдельную филогенетическую ветвь внутри рода и представлен кластером штаммов. LDV, PRRSV и SHFV более близки друг другу, чем EAV. Размер генома артеривирусов варьирует от 12,7 kb (EAV) до 15,7 kb (SHFV). У PRRSV различают два «подвида» – Американский и Европейский. Идентичность по аминокислотным сиквенсам полипротеинов ORF lb Американских (VR2332) и Европейских (LV) PRRSV составляет 75,7 %, тогда как идентичность между протеинами ORF lb PRRSV (LV) и LDV (LDV-P) со-

ставляет 55,2 %. Аминокилостная идентичность по нуклеокапсидным протеинам EAV (прототипа) и трех других артеривирусов варьирует в пределах от 22 % до 33,3 %. Вариабельность по длине N-концевого участка ORF la среди артеривирусов дает основания полагать, что этот участок может обладать видоспецифическими функциями. Все 4 вида вируса антигенно различны. Каждый вид имеет определенный спектр естественных хозяев, но может инфицировать разные виды. Официально зарегистрировано 4 вида.

Сходство с другими таксонами. Представители семейства *Arteriviridae* имеют организацию генома и стратегию репликации сходные с таковыми представителей семейства *Coronaviridae,* но геном артеривирусов и сам вирион примерно в два раза меньше, чем у коронавирусов. Артеривирусы и другие нидовирусы имеют в своих полимеразах SDD вместо канонического GDD, и содержат нидовирусспецифичный домен по С-концу протеина ORF lb. Некоторое сходство в организации генома прослеживается между артеривирусами и вирусами растений семейства *Potyviridae.*

14.2.12 Семейство: *Flaviviridae*

Род: *Flavivirus, Pestivirus, Hepacivirus*

Характеристика вириона. Вирионы сферической формы, имеют липидную оболочку; диаметр от 40 нм до 60 нм. Капсид образован капсидным протеином (С), а оболочка содержит 2-3 мембранных протеина, кодируемых вирусом. В целом, общие структурные характеристики гепацивирусов сходны с таковыми флави- и пестивирусов.

Геном. РНК: односпиральная, линейная, позитивная; размер 11 kb, 12,3 kb и 9,6 kb у флави-, пести- и гепацивирусов, соответственно. 3'-концевого поли(А)-трека нет. У вирусов рода *Flavivirus* по 5'-концу РНК есть кэп типа I.

Протеины. Все вирусы семейства имеют один небольшой основной капсидный протеин и 2 *(Flavivirus* и *Hepacivirus)* или 3 *(Pestivirus)* мембраноассоциированных протеина. В составе сиквенсов неструктурных протеинов опреде-

лены мотивы, характерные сериновой протеазе, РНК хеликазе и РНК-зависимой РНК полимеразе, которые имеют сходную локализацию в геноме у вирусов всех трех родов.

Другие компоненты вириона. Липиды (от 15 % до 20 % общей массы вириона у флавивирусов), образующие оболочку вириона, имеют клеточное происхождение. Липидные компоненты пести- и гепацивирусов не идентифицированы.

Углеводороды присутствуют в вирионе в виде гликолипидов и гликопротеинов.

Организация генома и репликация. Геномная РНК вирусов всех трех родов имеет сходную организацию. В инфицированных клетках обнаруживают только мРНК, которая имеет одну ORF, фланкированную по 5′-и 3'-кондам некодирующими участками (noncoding regions, NCR), формирующими специфические вторичные структуры, необходимые для репликации генома. У флавивирусов инициация трансляции кэп-зависимая в случае, тогда как у пести- и гепацивирусов идентифицирован внутренний сайт входа рибосомы (internal ribosomal entry site. IRES). Вирусные протеины синтезируются как части полипротеина (более 3000 аминокислот), который подвергается ко- и пост-трансляционному разрезанию вирусными и клеточными протеиназами. Структурные протеины расположены в N-концевой части полипротеина, а неструктурные – в остальной. Последние включают сериновую протеазу, РНК хеликазу и РНК-зависимую РНК полимеразу. Синтез РНК происходит в цитоплазме в ассоциации с мембранами через синтез негативных промежуточных форм. Сборка вириона и приобретение оболочки происходит на внутриклеточных мембранах, после чего частицы транспортируются в секреторных цитоплазматических везикулах и высвобождаются из клетки путем экзоцитоза.

Антигенные свойства. Между вирусами разных родов антигенного родства нет. Перекрестная активность в серологических тестах наблюдается на внутриродовом уровне *(Flavivirus, Pestivitus).* Гепацивирусы антигенному анализу пока не поддаются.

Род: *Flavivirus*

Типовой вид: *Yellow fever virus* (YFV) (вирус желтой лихорадки).

Характерные особенности. Распространение большинства флавивирусов происходит с участием членистоногих переносчиков (москитов или клещей), в которых они активно репродуцируются. Некоторые флавивирусы являются этиологическими агентами зоонозов грызунов и летучих мышей, не связанных с участием членистоногих переносчиков.

Характеристика вириона. Вирионы сферические; диаметр 50 нм. Различают две формы вирионов. Зрелые вирионы содержат два вирусных мембрано-ассоциированных протеина E и M. Внутриклеточные незрелые вирусные частицы имеют в своем составе вместо M его предшественника – prM, который протеолитически разрезается во время созревания. Детальный структурный анализ был проведен в отношении вируса клещевого энцефалита *(Tick-borne encephalitis virus,* TBEV). Его мажерный оболочечный протеин E формирует димеры, атомная структура которых определена с использованием методов кристаллографии в рентгеновских лучах (X-ray cristallography). Димеры протеина E имеют палочковидную (цилиндрическую) форму и ориентированы параллельно мембране, т.е. не образуют спайкоподобных выступов (при своем нейтральном pH). Воссоздание имиджа с криоэлектронных микрофотографий дает основание полагать, что оболочка вириона и кор имеют икосаэдральную симметрию.

Точная Mr вириона не определена, но расчетная, в соответствии с композицией вируса, составляет примерно 60×10^6. Плавучая плотность в сахарозе составляет 1,19 г/см^3.

Вирус стабилен при pH 8,0, но быстро инактивируется при низких значениях pH, температуре выше 40 °C, при воздействии органических растворителей, детергентов и УФ лучей.

Геном. РНК: односпиральная, позитивная, линейная; размер примерно 11 kb. 5'-конец имеет кэп типа I, предшествующий консервативному динуклеотиду AG. 3'-конец не имеет поли(A)-трека и заканчивается консервативным динуклеотидом CU.

Протеины. В состав вириона входит 3 структурных протеина: капсидный протеин (C), мажерный оболочечный протеин E, и либо prM (у незрелых вирионов), либо M (у зрелых вирионов). Атомная структура растворимых димерных форм про-

теина Е определена кристаллографией в рентгеновских лучах. Протеин Е является вирусным гемагглютинином и участвует в процессе связывании с рецептором и pH-зависимого слияния мембран (вируса и клетки) в процессе рецептор-медилированного эндоцитоза. В инфицированных клетках синтезируется 7 неструктурных протеинов: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5. NS3 является мульти-функциональным протеином. N-концевая треть протеина формирует вместе с NS2B комплекс вирусной сериновой протеиназы, участвующий в процессинге полипротеина. С-концевая часть NS3 содержит РНК хеликазный домен, участвующий в репликации РНК, а также обладает РНК-трифосфатазной активностью, которая, вероятно, используется в формировании 5'-концевой кэп-структуры вирусной РНК. NS5 является самым крупным и наиболее консервативным протеином флавивирусов. NS5 является РНК-зависимой РНК полимеразой, и также, предположительно, имеет мотив, определяющий метилтрансферазную активность, участвующий в метилировании 5'-кэп-структуры.

Другие компоненты вириона. Липиды (17 % массы вириона) имеют клеточное происхождение.

Углеводы, составляющие 9 % массы вириона (в ассоциации с липидами и протеинами) имеют композицию и структуру, зависимые от клеток-хозяев (позвоночных или членистоногих). Сайты N-гликозилирования присутствуют у протеинов prM (1-3 сайта), E (0-2 сайта) и NS1 (1-3 сайта).

Организация генома и репликация. В инфицированных клетках обнаруживают только одну вирусную мРНК, которая имеет одну ORF (более 10000 оснований), кодирующую все структурные и неструктурные протеины, фланкированную по 5'- и 3'-концам короткими некодирующими участками (NCR).

Предполагаемая вторичная структура 5'- и 3'-NCRs консервативна у разных флавивирусов. NCRs имеют консервативные участки, различающиеся у флавивирусов, распространяемых москитами или клещами. Длина 3'-NCR вируса клещевого энцефалита может значительно варьировать (от 45 до 800 нуклеотидов) и, в некоторых случаях, содержать внутренний поли(А)-тракт. Синтез РНК происходит на мембранах перинуклеарного эндоплазматического ретикулума. После трансляции

исходной геномной РНК, запускается процесс репликации РНК, начинающийся с синтеза комплементарных негативных цепей, используемы в качестве матриц для образования полноразмерных позитивных молекул РНК. Они синтезируются по полуконсервативному механизму с образованием промежуточных (содержащих как двухцепочечные участки, так и вновь синтезированные одноцепочечные молекулы) и репликативных (дуплексы молекул РНК) форм. Синтез негативных цепей в клетках, инфицированных флавивирусами, продолжается в течение всего цикла репродукции.

Трансляция обычно начинается с первого AUG ORP, но у флавивирусов, передающихся москитами, может также начинаться со второго внутреннего AUG, расположенного на 12-14 кодонов ниже. Полипротеин процессируется клеточными протеазами и вирусной NS2B-NS3 сериновой протеазой с образованием зрелых структурных и неструктурных протеинов.

Топология протеинов относительно эндоплазматического ретикулума и цитоплазмы определяется внутренними сигналами и специфическими стоп-трансферными сиквенсами (stop-transfer sequences). Пролиферация и гипертрофия внутриклеточных мембран является характерной особенностью клеток, инфицированных флавивирусами. Репликативные комплексы осаждаются с мембранными фракциями экстракта инфицированных клеток. Первоначально вирусные частицы могут быть обнаружены в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме, который считается местом сборки вирионов. Затем такие незрелые вирионы транспортируются через мембранные системы секреторного аппарата клетки к ее поверхности, где происходит их экзоцитоз. Непосредственно перед высвобождением вириона протеин prM разрезается фуриновыми или фурино-подобными клеточными протеазами с образованием зрелых вирионов. Инфицированные флавивирусами клетки высвобождают также неинфекционные субвирусные частицы, имеющие более низкий (по сравнению с целым вирионом) коэффициент седиментации (70 S против 200 S) и проявляющие гемагглютинирующую активность (медленно седиментирующий гемагглютинин, SHA).

Антигенные свойства. Все флавивирусы серологически родственны, что мо-

жет быть продемонстрировано в ELISA или реакции ингибиции гемагглютинации с использованием поли- и моноклональных антител. Реакция нейтрализации более значима и может быть использована для определения отдельных серокомплексов более близкородственных флавивирусов. Оболочечный протеин Е является основной мишенью для нейтрализующих антител и вызывает образование протективного иммунитета. Протеин Е индуцирует, также, образование перекрестно реагирующих, но не обладающих нейтрализующей активностью антител. Антигенные сайты, участвующие в нейтрализации определены для всех трех структурных доменов протеина Е. Антитела, специфичные prM, взаимодействуют, в основном, с нейтрализованными вирионами, имеющими частично неразрезанный prM.

Биологические особенности:

Спектр естественных хозяев. Флавивирусы могут инфицировать различные виды позвоночных и, во многих случаях, членистоногих. Некоторые вирусы имеют ограниченный спектр восприимчивых хозяев-позвоночных (например, только приматы); другие могут инфицировать широкий спектр видов (млекопитающих, птиц и др.). Членистоногие обычно инфицируются во время прокормления на хозяине (позвоночном), во время виремии, или при ее отсутствии (последнее описано в отношении флавивирусов, передающихся клещами).

Пути распространения и родство по переносчику. Большинство флавивирусов являются арбовирусами и поддерживаются в природе путем передачи между кровососущими членистоногими (переносчиками) и позвоночными (хозяевами). Примерно 50 % известных флавивирусов распространяются москитами, 28 % – клещами, а остальные являются зоонозными агентами, распространяющимися между грызунами и летучими мышами при отсутствии известных векторов. В некоторых случаях цикл передачи не идентифицирован. У членистоногих вирус может передаваться трансовариально (москиты, клещи) и трансстадийно (клещи).

Географическое распространение. Флавивирусы распространены повсеместно, но некоторые виды встречаются в определенных эндемичных или эпидемичных районах, например, вирус желтой лихорадки (YFV) – в тропических и субтропических областях Африки и Южной Америки, вирус Денге (DENV) – в тропических об-

ластях Азии, Океании, Африки, Австралии и Америки, вирус японского энцефалита (JEV) – в Юго-Восточной Азии, вирус клещевого энцефалита (TBEV) – в Европе и Северной Азии.

Ассоциация с болезнью. Более 50 % известных флавивирусов ассоциированы с болезнями человека, включая такие опасные патогены как YFV, DENV (тип 1-4), JEV и TBEV. Болезни, вызываемые флавивирусами, могут быть ассоциированы с симптомами поражения центральной нервной системы (менингиты, энцефалиты), лихорадкой, артралгией, сыпью и геморрагической лихорадкой. Некоторые флавивирусы патогенны для домашних и диких животных (лошадей, свиней, овец, собак, индеек, куропаток, ондатр) и вызывать экономически значимые болезни.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Видовую принадлежность флавивирусов определяют по следующим критериям:

- нуклеотидный и аминокислотный сиквенс;
- антигенные свойства;
- географическое распространение;
- переносчики;
- естественные хозяева; ассоциация с болезнью;
- экологические характеристики.

Вирусы данного рода сгруппированы по серологическим характеристикам и в соответствии с преобладающими векторами. Официально зарегистрировано 53 основных и 2 предполагаемых вида.

Род: *Pestivirus*

Типовой вид: *Bovine viral diarrhea virus I* (BVDV-1) (вирус вирусной диареи КРС 1).

Характерные особенности. Пестивирусы кодируют два уникальных продукта генов. Первый протеин ORF – неструктурный протеин N, обладающий аутопротеолитической активностью, отвечающей за высвобождение из вновь образованного полипротеина. Один из трех вирусных оболочечных гликопротеинов F обладает РНК-азной активностью.

Характеристика вириона. Вирионы сферические, оболочечные; диаметр от 40 нм до 60 нм. На поверхности вириона различают кольцевидные (ring-like) субъединицы размером от 10 нм до 12 нм. Структура и симметрия кора не изучена.

Точная Mr вириона не определена, но расчетная, в соответствии с композицией вируса, составляет примерно 60 $\times 10^3$. Плавучая плотность в сахарозе составляет от 1,10 г/см^3 до 1,15 г/см^3. Инфекционность вируса стабильна в пределах относительно широкого спектра pH, но быстро снижается при температуре выше 40 °C и воздействии растворителей и детергентов.

Геном. РНК: односпиральная, позитивная, линейная; размер примерно 12,3 kb. Данных, свидетельствующих о наличии кэпа по 5'-концу, нет. 3'-конец не имеет поли(А)-тракта. Геномная РНК содержит одну ORF, охватывающую почти весь геном вируса. У некоторых цитопатогенных штаммов BVDV-1 в определенных участках генома (NS2 или по месту перехода NS2 в NS3) идентифицированы небольшие вариабельные интегрированные фрагменты нуклеиновой кислоты (вирусного или клеточного происхождения). Другие цитопатогенные изоляты BVDV имеют генетические дуплексы, охватывающие целиком или частично участки генома, кодирующие протеины N^{pro} или NS3, что приводит к увеличению вирусного генома до 16,5 kb. Во всех этих случаях сохраняется одна большая ORF. Цитопатогенные вирусы могут также образовываться при делециях больших участков генома. Такие дефектные геномы могут сохраняться в присутствии интактного хелперного вируса (помощника).

Протеины. В состав вириона входит 4 структурных протеина: основной нуклеокапсидный протеин (С), и 3 оболочечных гликопротеина E^{ms}, El и Е2. Все три гликопротеина существуют в виде межмолекулярных комплексов, связанных дисульфидными связями: гомодимеры E^{ms}, гетеродимеры Е1-Е2, гомодимеры Е2. E^{rns} обладает РНК-азной активностью и является уникальным продуктом пестивирусов, не найденным у вирусов других родов семейства. Пестивирусы кодируют 7-8 неструктурных протеинов (NS). Протеин N^{pro}, также уникальный для пестивирусов, является протеиназной, аутокаталитически высвобождающейся от вновь образованного полипротеина. Неструктурный протеин р7, вероятно, участвует в созревании вируса. Протеин NS2-3 многофункциональный. N-концевая область (40 %, или NS2)

является гидрофобной и содержит мотив «цинкового пальца» (zinc finger motif), что свидетельствует о его участии в связывании РНК или репликации. С-концевая область (60 % или NS3) функционирует как сериновая протеиназа, участвующая в процессинге полипротеина и как РНК-хеликаза / МТР-аза, вероятно, участвующая в репликации РНК. NS2-3 обнаруживается у нецитопатогенных BVDV. У цитопатогенных изолятов BVDV, вируса пограничной болезни овец (BDV) и классической чумы свиней (CSFV) NS2 и NS3 могут продуцироваться в добавление к NS2-3. Роль NS4B неизвестна. NS5A является единственным фосфорилированным пестивирусным протеином и, вероятно, участвует в репликации РНК. NS5B обладает активностью РНК-зависимой РНК полимеразы.

Другие компоненты вириона. Вирус имеет липидную оболочку, но по композиции липидов данных нет. Все вирусные оболочечные гликопротеины имеют N-связанные гликаны.

Организация генома и репликация. Геномная РНК состоит из одной ORF, кодирующей полипротеин примерно в 4000 аминокислот, предшествующей ей 5'-NCR (от 360 до 385 нуклеотидов), и следующей за ней 3'-NCR (230 нуклеотидов).

Порядок расположения генов:

Репликация пестивирусов инициируется рецептор-опосредованным эндоцитозом, в котором участвуют один или более поверхностных клеточных молекул и вирусных гликопротеинов E^{ras} и Е2. После эндоцитоза и раздевания геномная РНК служит в качестве мРНК. Субгеномных молекул мРНК нет. Инициация трансляции происходит по кэп-независимому внутреннему инициирующему механизму с использованием внутреннего сайта входа рибосомы (IRES), расположенного в 5'-NCR РНК. Процессинг полипротеина осуществляется ко- и посттрансляционно за счет клеточных и вирусных протеиназ. Неструктурный протеин N^{pro} (первый протеин ORF) отрезается аутопротеолитически от вновь образованного полипротеина по сайту N^{pro}/C. Последующие разрезания полипротеина, сопровождающиеся образованием структурных протеинов С, E^{ms}, El и Е2, вероятно медируется клеточными сигнальными пептидазами. Транслокация гликопротеина в эндоплазматический ретикулум происходит, вероятно, при участии внутренней сигнальной последовательно-

сти, возможно внутри протеина С. Разрезание между Е2 и р7 происходит не полностью, что приводит к образованию внутриклеточных форм Е2 с разными С-концами. В зависимости от вируса NS2-3 остается интактным (нецитопатогенные вирусы) или обнаруживаются вместе с N- и С-концевыми продуктами NS2 и NS3 (цитопатогенные вирусы). Механизм образования NS3 включает события рекомбинации РНК. Цитопатогенные BVDV имеют генетические вставки, делеции, дуплексы или реорганизации, что, в итоге, приводит к продукции NS3. NS3 (или NS2-3 у нецитопатогенных вирусов) обладает активностью сериновой протеазы, ответственной за весь последующий процессинг полипротеина. NS4A облегчает разрезание, обусловленное NS3, по сайтам NS4B/5A и 5A/5B.

Репликация РНК происходит в ассоциации с внутрицитоплазматическими мембранами, предположительно в репликационных комплексах, образованных вирусной РНК и вирусными неструктурными протеинами. Обнаруживаются репликативные формы РНК пестивирусов. Соотношение позитивных и негативных цепей РНК в клетках, через 12 часов после инфицирования, равно 10. Синтез РНК не ингибируется актиномицином D. Созревание вируса изучено не достаточно. Однако вирусные протеины не обнаружены не поверхности клетки, что может свидетельствовать о созревании вирионов во внутриклеточных везикулах, и последующем высвобождении путем экзоцитоза. Значительное количество инфекционных вирусных частиц остаются клеточно-ассоциированными. Синтез клеточных РНК и протеинов продолжается в процессе инфекции.

Антигенные свойства. Пестивирусы антигенно родственны, и имеют общие эпитопы, участвующие в перекрестной активности. Отдельные антигенные детерминанты были определены с использованием моноклональных антител. Антигенные вариации особенно хорошо просматриваются между изолятами BVDV. N-концевая часть Е2 содержит гипервариабельный, в антигенном отношении, участок. Профиль взаимодействия с моноклональными антителами согласуется генетическим родством вирусов.

У инфицированных животных вырабатываются антитела, специфичные двум структурным гликопротеинам (E^{ms} и Е2) и протеину NS3, тогда как на все остальные

протеины ответ развивается очень слабый или не развивается совсем. Протеины E^{ms} и E2 способны индуцировать протективную защиту независимо друг от друга. Моноклинальные антитела, специфичные этим протеинам могут обладать нейтрализующей активностью. Антитела, специфичные NS3, нейтрализующей активностью не обладают.

Биологические особенности:

Спектр естественных хозяев. Пестивирусы инфицируют свиней и жвачных, включая КРС, овец, коз и диких жвачных. Беспозвоночных хозяев нет.

Пути распространения. Передача вируса происходит путем прямого и непрямого контактов (например, с носовыми истечениями, мочой, контаминированным кормом и т.п.). Трансплацентраная и конгениальная передача происходит у всех видов животных (хозяев).

Патогенность. Пестивирусные инфекции могут протекать субклинически и сопровождаться различными клиническими состояниями, включая диарею, острый геморрагический синдром, острую фатальную болезнь и изнуряющую болезнь. Трансплацентарное инфицирование может приводить к смерти плода, врожденным нарушениям или развитию пожизненной персистентной инфекции. Фатальная болезнь слизистых случается у КРС, персистентно инфицированного нецитопатогенным BVDV, который суперинфицируется цитопатогенным вирусом. Пестивирусные инфекции сельскохозяйственных животных имеют важное экономическое значение во всем мире.

Экспериментальная инфекция. В экспериментальных условиях ни у каких видов животных, кроме естественных хозяев вызвать инфекцию BVDV или BDV не удалось. Однако CSFV был адаптирован к репродукции у кроликов.

Культуры клеток. Клетки, полученные от естественных хозяев (КРС, свиней, овец) поддерживают репликацию вируса. Большинство вирусных изолятов нецитопатогенны и создают персистентную инфекцию в культуре клеток. Инфекционный нецитопатогенный BVDV часто присутствует в продуктах сыворотки крови КРС, используемых для культивирования клеток. Цитопатогенные BVDV, которые возникают у животных во время персистентной инфекций, способны к бляшкообразо-

ванию и цитопатогенному действию.

Гемагглютинации. Пестивирусы гемагглютинирующей активностью не обладают.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Видовую принадлежность пестивирусов определяют по следующим критериям:

- родство по нуклеотидному сиквенсу;
- серологическое родство;
- вид животного-хозяина (от которого выделен изолят).

Подразделение пестивирусов на виды проводится но нескольким параметрам, и их родству с типовыми вирусами видов, идентифицированных, на данный момент (BVDV-1: NADL; BVDV-2: 890; BDV: BD31 и CSFV: Alfort/187). Родство по нуклеотидному сиквенсу является важнейшим критерием подразделения пестивирусов на виды. Например, сиквенсы 5'-NCR между типовыми вирусами четырех известных, на данный момент, видов различаются на 15 %. В большинстве случаев степень гомологии по 5'-NCR позволяет дифференцировать виды. Однако иногда родство по нуклеотидному сиквенсу может быть непонятным (двусмысленным) и должно быть подкреплено дополнительными сравнительными анализами. Сыворотка крови переболевших животных, содержащая антитела против данного вида пестивирусов (например, BVDV-1), обычно имеет титр нейтрализующей активности в несколько раз выше в отношении вирусов соответствующего вида (BVDV-1), чем против вирусов других видов. Наконец, различия по виду животного, от которого выделен вирус, могут (но не всегда) помочь в определении видовой принадлежности.

Например, BVDV-1 и CSFV считаются разными видами, так как они отличаются друг от друга по (1) не менее чем 25 %-му различию нуклеотидного состава (по полному геному), (2) не менее чем 10-ти кратным различиям по титрам нейтрализации, при проведении реакции перекрестной нейтрализации с использованием поликлональных антител (сывороток иммунных животных), и (3) по спектру восприимчивых видов животных-хозяев (в естественных условиях CSFV инфицирует только свиней, тогда как BVDV-1 инфицирует как жвачных, так и свиней). Официально зарегистрировано 4 вида.

Род: *Hepacivirus*

Типовой вид: *Hepatitis C virus* (HCV) (вирус гепатита С).

Характерные особенности. Гепацивирусы распространяются между людьми, в основном, через контакт с контаминированной кровью или продуктами крови. Беспозвоночных переносчиков (векторов) нет. Гепацивирусы отличаются от флави- и пестивирусов неспособностью к эффективному накоплению в культурах клеток и по тому, что протеин-предшественник, состоящий из неструктурных (NS) протеинов 2 и 3, аутокаталитически разрезается по сайту соединения NS2-3 по цинк-зависимому механизму.

Характеристика вириона. Вирионы сферические, оболочечные; диаметр около 50 нм. Вирусный кор сферический, около 30 нм в диаметре. Инактивируются при обработке хлороформом. Детально структура вириона не изучена.

Плавучая плотность в сахарозе составляет 1,06 г/см^3, если вирус выделен из сыворотки крови при остром течении инфекции, и от 1,15 г/см^3 до 1,18 г/см^3, если вирус выделен из сыворотки крови при хроническом течении инфекции. Более низкая плотность является результатом физической ассоциации вирионов с сывороточными низкоплотностными липопротеинами. Более высокая плотность появляется вследствие связывания вируса с сывороточными антителами. Вирус гепатита С (HCV), полученный из культуры клеток, имеет плавучую плотность в сахарозе 1,12 г/см^3. Вирионы стабильны в буфере при pH от 8,0 до 8,7, но чувствительны к нагреванию, органическим растворителям и детергентам.

Геном. РНК: односпиральная, позитивная, линейная; размер примерно 9,6 kb. 5'-конец содержит внутренний сайт входа рибосомы (IRES) и имеет длину 340 нуклеотидов. 3'-конец сложный и содержит вариабельные участки (примерно 50 нуклеотидов), полипиримидиновый, различающийся по длине, участок (примерно 100 нуклеотидов) и высоко консервативный концевой участок (около 100 нуклеотидов).

Протеины. В состав вириона входит как минимум 3 протеина: коровый (нуклеокапсидный) протеин С (p19) и два оболочечных протеина El (gp31) и E2 (gp70). Дополнительный протеин p7 неполностью отрезается от предшественника E2, что приводит к образованию E2-p7 и p7, неизвестно, являются ли они структурными

компонентами вириона. Два оболочечных протеина образуют в составе вириона гетеродимеры (вероятно нековалентно связанные). Распознаваемые неструктурные протеины включают: NS2 (Mr 21 × 10^3) – протеин, который до разрезания является частью цинк-зависимой протеиназы, соединяющей NS2 и NS3, и медиирующей аутокаталитическое разрезание по месту соединения NS2/NS3; NS3 (Mr 70 × 10^3) – протеин с активностью сериновой протеазы, хеликазы и NTP-азы (протеиназная активность используется для разрезания по сайтам между оставшимися неструктурными протеинами); NS4A (Mr 6 × 10^3) – кофактор, существенный для активности сериновой протеазы NS3; NS4B (Mr 27 × 10^3) (функция не известна): NS5A – сериновый фосфопротеин, с неясной функцией (Mr от 56 × 10^3 до 58 × 10^3, в зависимости от степени фосфорилирования); NS5B (Mr 68 × 10^3) – протеин с активностью РНК-зависимой РНК-полимеразы.

Другие компоненты вириона. Наличие липидов не было показано непосредственно. Однако наблюдения по удалению вирусной оболочки и потере инфекционности при воздействии растворителей или детергентов свидетельствуют о присутствии липидов.

Углеводы также не идентифицированы непосредственно, но наличие сайтов гликозилирования в предполагаемых кодирующих областях генов E1 и E2 и демонстрация углеводов, ассоциированных с продуктами этих двух генов, экспрессированных как рекомбинантные протеины, согласуется с наличием углеводов в составе вирионов.

Организация генома и репликация. Геномная РНК состоит из одной ORF, кодирующей полипротеин примерно в 3000 аминокислот.

Все 3 структурных протеина (C, E1 и E2) кодируются в аминоконцевой части ORF. Непосредственно 3' находится мелкий протеин p7, функция которого неизвестна. Идентифицированные структурные протеины кодируются в 3'-части ORF. Репликация изучена плохо, но есть данные, что она происходит в ассоциации с внутрицитоплазматическими мембранами. Репликативные формы вирусной РНК были обнаружены в ткани печени. Геномная РНК транслируется в полипротеин, ко-

торый быстро процессируется ко- и посттрансляционно. Инициация трансляции происходит через IRES, расположенный внутри 5'-NCR, который также содержит несколько, расположенных близко друг к другу, AUGs. Транслокация структурных гликопротеинов в эндоплазматический ретикулум, вероятно, происходит с использованием внутренних сигнальных сиквенсов. Разрезание структурных протеинов осуществляется клеточными сигнальными пептидазами; вирусные протеазы разрезают все соединения между неструктурными протеинами. Сборка вирионов происходит, вероятно, путем почкования в везикулы.

Антигенные свойства. Вирусспецифические антитела к структурным протеинам (C, E1 и E2) и неструктурным протеинам (в основном NS3, NS4 и NS5) могут быть выявлены, с использованием рекомбинантных антигенов, в крови людей, инфицированных HCV. В формировании гуморального иммунного ответа участвуют конформационно-зависимые и линейные эпитопы HCV. Значительная гетерогенность по геному отражается в некоторой серологической гетерогенности гуморального иммунного ответа, особенно в отношении продукта гена NS4. Наиболее широкая гетерогенность обнаружена по N-концевым 27 аминокислотам E2 (гипервариабельный участок 1, HVR-1). Есть данные, что HVR-1 является нейтрализующим эпитопом протеинов HCV и, что уклоняющиеся от нейтрализации варианты (эскейп-варианты) селектируются под влиянием иммунного ответа хозяина. Могут быть другие эпитопы нейтрализации, но они еще не определены. Клеточно-опосредованный иммунный ответ на все протеины HCV был показан, но его значимость не ясна. Однако есть свидетельства, что такой ответ ассоциируется с улучшением или прекращением инфекции. Из-за отсутствия системы культуры клеток, приемлемой для культивирования HCV, нет возможности широкого использования реакции нейтрализации *in vitro.* Отсутствие протективного иммунитета у шимпанзе, ранее инфицированных HCV, на реинфицирование другим штаммом HCV или даже тем же (сходные данные получены по естественной инфекции у людей), свидетельствует, что определение серотипов HCV затруднительно.

Биологические особенности:

Спектр естественных хозяев. Естественным хозяином и резервуаром HCV

является человек. Экспериментально инфекция передавалась шимпанзе. Других хозяев не идентифицировано.

Пути распространения. Вирус гепатита С распространяется почти исключительно парентерально, через кровь, продукты крови или другие предметы, контаминированные кровью. Эффективный скрининг донорской крови и использование инактивирующих процедур могут значительно снизить уровень распространения HCV через кровь и ее продукты, однако и другие пути заражения, особенно через нестерильные шприцы, остаются важнейшими фактами. Официально зарегистрирован 1 вид.

Неклассифицированные вирусы семейства. На основании данных по организации генома и генетического сходства с уже известными членами семейства 3 группы вирусов были предварительно отнесены в семейство *Flaviviridae.*

14.2.13 Семейство: *Togaviridae*

Род: *Alphavirus, Rubivirus*

Характеристика вириона. Вирионы сферической формы (диаметр 70 нм), покрыты липидной оболочкой, содержащей спайки (выступы), образованные гетеродимерами двух вирусных гликопротеинов. У альфавирусов гетеродимеры организованы в икосаэдральную структуру (решетку, T = 4), состоящую из 80 тримеров. Оболочка тесно прилегает к икосаэдральному (T = 4) нуклеокапсиду (диаметр 40 нм), образованному капсидным протеином и геномной РНК. Взаимодействие между гликопротеиновыми гетеродимерами и нуклеокапсидными протеинами считается важными для сборки вириона. Трехмерная структура вириона вируса краснухи (*Rubella virus,* RUBV) не определена. Вирионы вируса краснухи плеоморфны, что свидетельствует о нетесном взаимодействии капсида и гликопротеинов (в отличие от вирионов альфавирусов).

Вирион альфавирусов имеет Mr 52×10^3; плавучая плотность в сахарозе составляет 1,22 г/см^3. Вирус краснухи имеет плавучую плотность от 1,18 г/см^3 до 1,19 г/см^3.

Альфавирусы стабильны в пределах pH от 7 до 8, но быстро инактивируются при низких значениях pH. Период полужизни (half-life) вирионов в культуральной среде при 37 °C составляет около 7 часов. Большинство альфавирусов быстро инактивируются при 58 °C, когда период полужизни измеряется в минутах. Вирус краснухи более чувствителен к повышению температуры и имеет период полужизни при 37 °C от 1 до 2 часов, а при 58 °C – от 5 до 20 минут. Тогавирусы, как правило, чувствительны к воздействию органических растворителей и детергентов, которые растворяют их липопротеиновую оболочку. Чувствительность к облучению прямо пропорциональна размеру вирусного генома.

Геном. РНК: односпиральная, позитивная, линейная; размер от 9,0 kb до 11,8 kb. Вирусная РНК кэпирована (7-метилгуанозин) по 5'-концу и полиаденилирована по 3'-концу.

Протеины. К структурным протеинам тогавирусов относятся основной капсидный протеин (CP, Мг от 30×10^3 до 33×10^3) и два оболочечных гликопротеина (E1 и E2, Mr от 45×10^3 до 58×10^3). Некоторые альфавирусы могут содержать третий оболочечный протеин E3 (Mr 10×10^3). Четыре неструктурных протеина, обнаруживаемые в инфицированных клетках, но не входящие в состав вириона, обозначаются nsl-4.

Другие компоненты вириона. Липиды составляют примерно 30 % сухого веса вириона. Они заимствуются из клеточных мембран, через которые происходит почкование: плазматическая мембрана – для альфавирусов, плазматическая и внутриклеточные мембраны – для вируса краснухи. Их композиция зависит от клеток, в которых происходит репродукция вируса. Фосфолипиды (включая фосфатидилэтаноламин, фосфатидилхолин, фосфатидилсерин и сфингомиелин) и холестерол присутствуют в молярном соотношении 2 : 1 у альфавирусов и 4 : 1 у вируса краснухи, предположительно за счет того, что созревание вируса краснухи происходит главным образом на внутриклеточных мембранах.

В составе оболочечных гликопротеинов обнаружены высокоманнозные и сложные N-связанные гликаны. Кроме этого, протеин E2 содержит O-связанные

гликаны.

Организация генома и репликация. Геномная РНК служит в качестве мРНК неструктурных протеинов вируса. У альфавирусов полипротеиновый предшественник разрезается вирускодируемой протеазой nsP2 с образованием nsPl, nsP2, nsP3 и nsP4. У 8-ми из 10-ти секвенированных альфавирусов обнаружен терминирующий кодон (UGA) между генами nsP3 и nsP4, которые считываются со средней эффективностью (от 5 % до 20 %), тогда как у двух других альфавирусов этот кодон замещен кодоном аргинина (CGA). Полипротеины, содержащие nsP2 являются энзимами и функционируют, в основном, *in trans* с образованием неструктурных протеинов. У вируса краснухи полипротеин-предшественник разрезается на 2 продукта P150 и P90. Протеаза, осуществляющая это разрезание локализована рядом с С-концом P150 и может функционировать *cis* и *in trans.*

Неструктурные протеины сами по себе или в составе полипротеинов необходимы для репликации вирусной РНК и, вероятно, действуют в ассоциации с клеточными протеинами. Считается, что альфавирусный протеин nsPl участвует в копировании вирусных РНК и синтезе негативных цепей РНК. Протеин nsP2 функционирует как протеаза, процессирующая неструктурные протеины, и, вероятно, как хеликаза, участвующая в репликации РНК. Протеин nsP4, вероятно, является вирусной РНК полимеразой. Протеин nsP3 также необходим для репликации РНК; P123 и nsP4 образуют репликазный комплекс для синтеза минус-цепей, тогда как для эффективного синтеза плюс-цепей требуется разрезание P123. Протеин P150 вируса краснухи и nsP3 альфавирусов содержат метилтрансферазный мотив, функция которого неизвестна. Протеин P90 вируса краснухи содержит репликазный и хеликазный мотивы, но их порядок отличается от такового у альфавирусов. Различия в процессинге и порядке мотивов неструктурных протеинов между альфавирусами и вирусом краснухи дают основания полагать, что эволюция этих двух родов была более сложной, чем просто дивергенция от общего предшественника. При репликации РНК образуются комплементарные негативные копии, которые служат матрицами для синтеза полноразмерной геномной РНК и субгеномной 26S мРНК, соответствующей 3'-трети вирусного генома, и кодирующей структурные протеины вириона.

Эта мРНК кэпирована и полиаденилирована, транслируется как полипротеин, который процессируется, у альфавирусов, комбинацией аутопротеазной активности, присущей СР, и клеточных протеаз, с образованием вирусных структурных протеинов. Протеин СР вируса краснухи не обладает аутопротеазной активностью и все разрезания предшественника медиируются клеточными сигнальными эндопептидазами.

Содействующие регуляторные элементы в 5'- и 3'-нетранслируемых областях геномной РНК необходимы для образования, у альфавирусов, минус-цепей и их копирования в плюс-цепи. Считается, что внутри вирусной РНК существуют и другие действующие регуляторные элементы. У альфавирусов промотор для синтеза 26S субгеномной РНК является участком из 24 нуклеотидов, который является начальным участком субгеномной РНК. Этот минимальный элемент 24 нуклеотида регулируется сиквенсами, расположенными выше. Субгеномный промотор вируса краснухи имеет длину 50 нуклеотидов и располагается выше места начала субгеномной РНК. Альфавирусы и вирус краснухи имеют гомологию по содействующим элементам 5'-концов геномных и субгеномных промоторных участков.

Неструктурные протеины функционируют в цитоплазме инфицированных клеток, хотя некоторые альфавирусные nsP2 транслоцированы в ядре. СР ассемблируется с вирусной РНК, образуя вирусный капсид, в цитозоле. Гликопротеины, вошедшие во время трансляции в эндоплазматический ретикулум, транслоцируются через аппарат Гольджи в плазматическую мембрану альфавирусов; гликопротеины вируса краснухи также обнаружены на внутриклеточных мембранах. Сформированный нуклеокапсид почкуется сквозь эти мембраны, приобретая липидную оболочку, содержащую 2 интегративных мембранных гликопротеина. Гликопротеины вируса краснухи остаются в аппарате Гольджи, который является основным местом почкования. В отличие от альфавирусов, капсид вируса краснухи не проходит предсборки в цитозоле, и формируется только в процессе почкования. На поздних стадиях инфекции гликопротеины вируса краснухи накапливаются в плазматической мембране, где также может происходить почкование.

Антигенные свойства. Представители рода *Alfavirus* первоначально были оп-

ределены на основе перекрестной активности в серологических тестах. Все альфавирусы антигенно родственны между собой. Идентичность по аминокислотным сиквенсам составляет не менее 40 % по наиболее различающимся структурным протеинам и около 60 % – по неструктурным протеинами. На основе серологической перекрестной активности альфавирусы могут быть сгруппированы в 7 антигенных комплексов: Восточного, Венесуэльского и Западного энцефалитов лошадей, Мидделбург (Middelburg), Ндуму (Ndumu), Леса Семлики и Леса Бармах. Вирус краснухи серологически отличен от альфавирусов; гомологии по аминокислотным сиквенсам структурных протеинов альфавирусов и вируса краснухи нет.

Биологические особенности. В естественных условиях распространение альфавирусов среди позвоночных происходит при участии москитов или других кровососущих членистоногих. Альфавирусы имеют широкий спектр восприимчивых хозяев и характеризуются практически повсеместным распространением. Инфекция клеток из тканей позвоночных цитолитическая и сопровождается выключением синтеза клеточных макромолекул. В клетках москитов альфавирусы, обычно, вызывают нецитолитическую инфекцию, при которой клетки остаются жизнеспособными и становятся персистентно инфицированными. Цитопатология описана в отношении среднего отдела кишечника москитов, инфицированных вирусом Восточного или Западного энцефалитов лошадей (EEEV и WEEV, соответственно). Сборка вирионов в клетках москитов отличается от таковой, наблюдаемой в клетках млекопитающих, так как происходит в ассоциации с внутриклеточным мембранами, а не при почковании через плазматическую мембрану. Детали могут различаться в зависимости от типа клеток, а почкование через плазматическую мембрану описано у москитов *in vivo.* В противоположность вышеописанному, распространение вируса краснухи происходит аэрозольно (респираторно), а единственным естественным хозяином является человек. Вирус краснухи может реплицироваться в ряде культур клеток млекопитающих, включая линии клеток человека, обезьян, кроликов и хомяков. В большинстве культур клеток вирус не проявляет цитопатогенного эффекта и имеет предрасположенность к развитию персистентной инфекции.

Род: ***Alphavirus***

Типовой вид: *Sindbix vims* (SINV) (Вирус Синдбис).

Характерные особенности. Размер генома от 11 kb до 12 kb (не считая 3'-концевой поли(А)-тракт: вирус Синдбис (SINV) – 11703 нуклеотида; вирус О'Ньонг-Ньонг (ONNV) – 11835 нуклеотидов; вирус Росс Ривер (RRV) – 11444 нуклеотида; вирус Леса семдики (SFV) – 11442 нуклеотида). Порядок генов неструктурных протеинов в геномной РНК: nsPl, nsP2, nsP3 и nsP4. Они синтезируются в виде полипротеина-предшественника с последующим процессингом протеазой nsP2. Расположение генов в 26S мРНК: СР-Е3-В2-6К-Е1. Образующийся полипротеин процессируется за счет аутопротеолитической активности СР, клеточных сигнальных пептидаз и энзима, являющегося компонентом аппарата Гольджи. Гликопротеин Е2 образуется в виде предшественника (РЕ2, или р62), который разрезается в процессе своего созревания. У некоторых вирусов продукт N-концевого разрезания РЕ2, обозначаемый как Е3 (Mr около 10×10^3), остается ассоциированным внутри вириона. Углеводороды составляют 14 % массы оболочечных гликопротеинов и около 5 % массы вириона.

Альфавирусы обладают способностью репродуцироваться и передаваться горизонтально среди москитов. Для каждого вируса характерен определенный вид москита-переносчика; однако, в целом, переносчиками служит широкий спектр москитов. Вирус Форт Морган (FMV) распространяется членистоногими, относящимися к семейству *Cimicidae* (отряда *Hemiptera),* ассоциируемыми с птицами. Большинство альфавирусов могут инфицировать широкий спектр позвоночных. Основным естественным резервуаром (среди позвоночных) многих альфавирусов являются птицы, но многие из них также способны к репродукции у млекопитающих. Для ряда альфавирусов основным резервуаром являются млекопитающие. Некоторые из них (например, вирус Росс Ривер) могут репродуцироваться у птиц (хотя с меньшей эффективность). Сообщалось о выделении альфавирусов из рептилий и амфибий. Вирусы были обнаружены на всех континентах, кроме Антарктиды и некоторых островов. Однако большинство вирусов имеют более ограниченное распространение. Вирус Синдбис (SINV) был выделен во многих регионах Европы, Африки,

Азии, Филипин и Австралии. WEEV распространен на территории от Канады до Аргентины. В противоположность этому, ONNV был выделен только в Восточной Африке, где он вызывал эпидемии в 1959-1960 и 1996-1997 годах. Многие альфавирусы Старого Света вызывают серьезные, но, обычно, не опасные для жизни, болезни, характеризующиеся лихорадкой, сыпью, артралгией. RRV, вирус Майаро (MAYV) и вирус Ockelbo (субтип SINV) вызывают у человека эпидемические полиартриты с симптомами (редко), сохраняющимися в течение месяцев или лет. Альфавирусы Нового Света EEEV, VEEV и WEEV вызывают у человека фатальные энцефалиты (хотя инфекции с клиническим проявлением достаточно редки). Эти вирусы также вызывают энцефалиты у лошадей и эму. *Highlands J virus* (HJV) обычно не ассоциируется с какими-либо болезнями человека или лошадей, но считается важным патогеном для индеек, фазанов, куропаток, уток, журавлей и эму.

Критерии подразделения на виды внутри рода. Единственные формальные параметры подразделения альфавирусов были приняты Американским комитетом по арбовирусам. Эта классификация основана на антигенных свойствах и определяет вирусы или виды как «отдельные агенты, антигенно родственные, но легко различимые (четырехкратное или выше различие титров при использовании обеих гомологичных и гетерологичных антисывороток)». На уровне выше видового, антигенные комплексы включают «арбовирусы, которые очень близкородственны, но отличаются между собой». На уровне ниже видового, антигенные серотипы представляются «изолятами вирусов, различающимися между собой, как минимум, по четырехкратной разнице титров одной, но не обеих, гомологичных и гетерологичных антисывороток», антигенные варианты – «изоляты, различимые только при использовании специальных тестов или реагентов (кинетика HI, методы на основе моноклональных антител и т.д.)»

С появлением новых генетических и экологических данных для обеспечения более обстоятельной классификации альфавирусов были адаптированы новые критерии видового подразделения (например, дивергенция по родословной (lineage divergence), различия по экологическим нишам), дополняющие систему классификации по антигенным свойствам. В целом, результаты филогенетических исследова-

ний совместимы с данными анализа антигенного родства. Вирусы, определенные ранее как виды (на уровне МКТВ) обычно различаются более чем на 23 % по нуклеотидному составу и 10 % по аминокислотному сиквенсу при сравнительном анализе гена протеина Е1, и имеют разный трансмиссионный цикл (цикл передачи). Официально зарегистрировано 24 вида.

Род: *Rubivirus*

Типовой вид: *Rubella virus* (RUBV) (Вирус красней),

Характерные особенности. Размер генома 9757 нуклеотидов (не считая 3'-концевой поли(А)-тракт). Порядок генов ORF неструктурных протеинов: NH_2-P150-P90-COOH. Неструктурный протеин-предшественник разрезается папаино-подобной цистеиновой протеазой, локализованной близ С-концаР150. Вирион имеет капсидный протеин (СР, Mr 34×10^3)и 2 оболочечных гликопротеина (Mr 59×10^3; Mr от 44×10^3 до 50×10^3), но нет протеина, эквивалентного Е3 или 6К альфавирусов. Порядок расположения генов структурных протеинов: NH2-CP-E2-E1-COOH. Два разрезания, высвобождающих эти 3 структурных протеина, осуществляются клеточной сигнальной пептидазой (Е2 сигнальный сиквенс остается в составе СР). Углеводы составляют 10 % массы Е1 и от 30 % до 40 % Е2. Е2 гетерогенный по размеру, что связано с различными вариантами процессинга гликанов (N- и О-связывание). Вирус краснухи распространяется аэрозольно. Болезнь, обусловленная вирусом краснухи, и известная под одноименным названием (краснуха) или как Германская корь, обычно, протекает доброкачественно, но могут быть осложнения в виде артритов, энцефалитов. Наиболее серьезные последствия связаны с конгенитальным инфицированием плода во время первого триместра беременности, что приводит к развитию у новорожденного «конгенитального краснушного синдрома» (ККС). У пациентов с ККС наблюдаются различные аутоиммунные и психиатрические нарушения, включая фатальную нейродегеперативную болезнь, известную под названием прогрессирующего краснушного панэнцефалита (который, также, был описан у потенциально инфицированных пациентов); вирусовыделение продолжается в течение 6 месяцев. Вирус краснухи распространен повсеместно, хотя контролируется профилактической вакцинацией в большинстве развивающихся стран.

Описан только один серотип, хотя идентифицировано два генотипа.

Филогенетическое родство внутри семейства. Гомология по аминокислотным сиквенсам между вирусом краснухи и альфавирусами детектируется только по неструктурным протеинам. Нуклеотидные и аминокислотные гомологии, по доступным сиквенсам альфавирусов, а также, определение филогенетического родства, проводилось по генам nsPl, nsP4 и El. Шесть из семи антигенных комплексов определены как разные в филогенетическом отношении группы вирусов.

Сходство с другими таксонами. Неструктурные протеины тогавирусов (альфавирусные nsPl, nsP2 и nsP4, а также участки метилтрансферазы, хеликазы и репликазы вируса краснухи) имеют сходство по сиквенсам с неструктурными протеинами вируса гепатита Е, и некоторых групп вирусов растений, включая тобамо-, бромо- и тобравирусы, предполагая общее происхождение репликазы этих вирусов. Различия в организации генома и седиментации, предположительно, отражают широкую рекомбинацию и эволюцию.

Неклассифицированные вирусы.

Araguari virus *(*ARAV) (Вирус Арагуари). Вирус Araguari был выделен от *Philander opossum,* отловленных в 1969 году в Serra do Navio, T.F. Amapa (Бразилия). Вирион оболочечный, содержит 8 видов РНК, 3 мажерных полипептида (Mr 67×10^3; 58×10^3; 30×10^3; в соотношении 1 : 2 : 3), 2 минорных полипептида (Mr 43×10^3; 35×10^3). Протеины с Mr 67×10^3 и 30×10^3 являются гликопротеинами (не сходными с таковыми аренавирусов). Данный вирус патогенен для определенных видов лабораторных животных (позвоночных) и культур клеток.

Johnston Atoll virus (JAV) (Вирус Атолла Джонстон). Вирус Johnston Atoll (родственный вирусу Quaranfil) был выделен от клещей *Orni-thodoros capensis,* собранных в 1969 г на острове Sand Island (Johnston Atoll, Тихий Океан). Все другие изоляты были получены от клещей *O. Capensis* в Австралии. Данный вирус патогенен для определенных видов лабораторных животных (позвоночных) и культур клеток. Вирион оболочечный, содержит 3 мажерных полипептида, 2 минорных полипептида. Протеины с Mr 67×10^3 и 30×10^3 являются гликопротеинами (не сходны-

ми с таковыми аренавирусов).

Nyamanini virus (NYMV) (Вирус Ньяманини). Впервые вирус был выделен от *Bubulcus ibis* (белых цапель, cattle egret), отловленных в 1959 г в Южной Африке, и после этого был выделен от белых цапель и клещей в Африке. Данный вирус патогенен для определенных видов лабораторных животных (позвоночных) и культур клеток. Вирион оболочечный, содержит РНК.

Quaranfil virus (QRFV) (Вирус Куаранфил). Вирус Quaranfil (родственный вирусу Johnston Atoll) был выделен от клещей рода *Argas (Persicargus) arboreus,* собранных в 1953 г близ Каира (Египет). Последующие изоляты были выделены от людей (с лихорадкой), цапель и голубей, а также клещей в Египте, Южной Африке, Афганистане, Нигерии и Иране. Данные электронномикроскопических исследований (многочисленных попыток) неубедительны. Вирион оболочечный. Данный вирус патогенен для широкого спектра лабораторных систем.

14.3 Прионы (агенты губкообразных энцефалопатии)

Прионы (proieinaceous infectious particles) – мелкие белковые инфекционные частицы, не имеющие нуклеиновой кислоты. Прионы представлены, в основном, не полностью, анормальными изоформами нормального клеточного протеина. У млекопитающих прионы представляют собой анормальную, патогенную изоформу приемного протеина (PrP), PrP кодируется хромосомным геном, но этот ген не обнаруживается в очищенных препаратах прионов. В таких препаратах, обладающих инфекционностью, не обнаруживается прион-специфическая нуклеиновая кислота, ни вирусоподобные частицы. Имеются данные по трем разным прионам у грибов.

Прионы млекопитающих.

Общие сведения. Прионы млекопитающих являются этиологическими агентами скрепи и других сходных нейродегенеративных болезней животных и человека (таблица 10). Прионные болезни также называются трансмиссивными губкообразными энцефалопатиями (transmissible spoil-giform encephalopathies, TSEs).

Прионы представляют собой анормальную патогенную изоформу белка PrP,

обозначаемую PrP^{Sc}. Обозначение «Sc» было заимствовано от термина «screpie» (скрепи), обозначавшего одноименную прототипную прионную болезнь. Так как при всех известных прионных болезнях млекопитающих отмечается измененный метаболизм протеина PrP, сходный с таковым, наблюдаемым при скрепи, было предложено использовать обозначение «Sc» для всех анормальных патогенных изоформ PrP.

Посттрансляционные процессы переводят нормальную изоформу клеточного протеина, обозначаемую PrP^{c} в PrP^{Se}. Попытки определить химические различия этих двух изоформ оказались безуспешными. Более того, PrP^{c} в PrP^{Sc} кодируются одним и тем же однокопийным хромосомным геном. Конформации двух изоформ PrP значительно различаются; PrP имеет мало р-слоев (Р-складчатость) или не имеет их вовсе, тогда как PrP^{Sc} имеет много таких р-слоев.

Таблица 10 – Прионные болезни.

Название болезни	**Название болезни на русском языке**	**Естественный хозяин**	**прион**	**изоформа**
Screpie	Скрепи	Овцы и козы	Scrapie prion	$OvPrP^{Sc}$
Transmissible mink encephalopathy (TME)	Трансмиссивная энцефалопатия норок	Норка	TME prion	$MkPrP^{Sc}$
Chronic wasting disease (CWD)	Хроническая изнуряющая болезнь	Лось, олень, мул	CWD prion	$MDePrP^{Sc}$
Bovine spongiform encephalopathy (BSE)	Губкообразная энцефалопатия КРС	КРС	BSE prion	$BoPrP^{Sc}$
Feline spongiform encephalopathy (FSE)	Губкообразная энцефалопатия кошек	Кошки	FSE prion	$FePrP^{Sc}$
Exotic ungulate encephalopaty (EUE)	Губкообразная энцефалопатия экзотических копытных	Ньяла и большой куду	EUE prion	$UngPrP^{Sc}$
Kuri	Куру	Человек	Kuril prion	$HuPrP^{Sc}$
Creutzfeldt-Jakob disease (CJD)	Болезнь Крейтцфельда-Якоба	Человек	CJD prion	$HuPrP^{So}$
Gerstmann-Slraussler Scheinker syndrome (GSS)	Синдром Герстмана-Штрейсслера Шейнкера	Человек	GSS prion	$HuPrP^{Sc}$
Fatal familial insomnia (FFI)	Фатальная семейная инсомния (бессоница)	Человек	FFI prion	$HuPrP^{Sc}$

Как и вирусы, прионы инфекционны, так как индуцируют процесс, при кото-

ром происходит увеличение количества патогена, приводящее к развитию болезни. Как прионы, так и вирусы существуют в разных вариантах или субтипах, называемых штаммами. Но многие особенности структуры и репликации прионов отличают их от вирусов и всех других известных патогенов.

Прионы отличаются от вирусов и вироидов отсутствием генома, представленного нуклеиновой кислотой, определяющего синтез их потомства. Прионы представляют собой анормальную изоформу клеточного протеина, тогда как большинство вирусных протеинов кодируются вирусным геномом, а вироиды не имеют в своем составе протеина. Прионы могут существовать в виде множества молекулярных форм, тогда как вирусы существуют в одной форме с определенной ультраструктурной морфологией. Прионы не иммуногенны, в отличие от вирусов, которые почти всегда индуцируют иммунный ответ. Штаммы прионов определяются конформацией PrP^{c}; тогда как у вирусов и вироидов они определяются различием нуклеотидной последовательности, обусловливающей отличительные черты патогена.

Номенклатура прионов млекопитающих. Прионная терминология еще находится в процессе становления. Так одни термины были взяты из инфекционной патологии вирусной природы, другие – из генетики, биологии структуры белков, нейропатологии.

Свойства прионов. Микросомальная фракция инфекционных тканей, обогащенная по прионной инфекционности, содержит многочисленные мембранные везикулы. Экстракция детергентами и ограниченный протеолиз мозговых микросом приводит к появлению палочковидных частиц, большинство из которых имеет одинаковый диаметр (11 нм), со средней длиной 165 нм (от 25 нм до 550 нм). Палочки плоские, почти лентоподобные, редко скрученные. Палочки напоминают очищенные препараты амилоида как ультраструктурно, так и гистохимически. Палочки не представляют собой инфекционных сущностей, поскольку крупные полимеры PrP от 27 до 30 не определяют инфекционность.

Физико-химические особенности. Наименьшими инфекционными частицами прионов являются, вероятно, димеры PrP^{Sc}, что согласуется с размером мишени (55 ± 9) kDa при анализе с использованием ионизирующего излучения. Прионы аг-

регируются в частицы разного размера и не растворяются детергентами, за исключением денатурирующих условий, при которых инфекционность утрачивается. Однако растворение PrP и прионов достигается с использованием фосфолилидов. Прионы устойчивы к УФ-облучению при длине волны 254 нм, воздействию нуклеаз, двухвалентных катионов, хелатов ионов металлов, кислых сред (pH от 3 до 7), гидроксиламина, формалина, протеаз и кипячению. Инфекционность прионов снижается при длительной обработке протеазами, мочевиной, щелочью (pH >10), при кипячении в присутствии додецилсульфат натрия, автоклавировании при 132 °C не менее 2 часов, денатурирующими органическими растворителями (например, фенолом) или хаотропными агентами типа гуанидин изоцианат.

Прион-специфических нуклеиновых кислот не идентифицировано.

Протеины. PrP представляет собой трехспиральный скрученный протеин. При переходе PrP в PrP^c, отмечается значительное изменение определенного участка (аминокислоты 90-125), приводящее, к исчезновению антителоспецифических эпитопов. Данные, полученные с использованием оптической спектроскопии, показали, что одновременно с переходом PrP в PrP^c происходит снижение содержания односпиральных структур PrP и увеличение слоев. В целом, PrP^c отличается от PrP по биохимическим и биофизическим свойствам. Ограниченный протеолиз PrP^{Sc} приводит к образованию более мелких, устойчивых к протеазам, молекул, примерно в 142 аминокислоты, обозначаемых PrP от 27 до 30. При таких же условиях, PrP^c полностью гидролизуется. Аминокислотный сиквенс PrP^{Sc}, изученный на основе методов протеинового сиквенса и масс-спектрометрии, идентичен таковому, рассчитанному по сиквенсу геномной ДНК. Кроме PrP^{Sc} других протеинов во фракциях, обогащенных по прионной инфекционности, не обнаруживается.

Липиды. PrP^{Sc} содержит фосфолипид (гликозилинозитол, GPI), связанный с аминокислотным остатком 231 (серии) PrP сирийских хомяков. Липиды дирадилглицероловой фракции данного фосфолипида (GPI) изучены недостаточно.

Углеводы. Кроме GPI-якоря, содержащего сиаловую кислоту, PrP^{Sc} имеет два консенсусных сайта гликозилирования по N-связям (по 181 и 197 остаткам PrP сирийского хомяка). Для N-связанных гликанов сложного типа характерны би-, три- и

тетраантигенные структуры. Некоторые из таких олигосахаридов сложного типа имеют ответвляющиеся фукозные (fucose) остатки, или концевые остатки опаловой кислоты. Идентифицировано 6 разных GPI-гликанов, два из которых сталированы.

Организация генома и репликация. Полноразмерная ORF всех известных генов PrP млекопитающих находится внутри одного экзона. Обычно, гены PrP образованы тремя экзонами, что показано в отношении мышей и овец. Гены PrP человека и сирийских хомяков (SHa) имеют три экзона, но большинство HuPrP и SHaPrP мРНК сплайсируются только из двух экзонов, разделенных между собой примерно 10 kb. Экзон-1 гена SHaPrP кодирует часть 5'-нетранслируемого лидерного сиквенса, тогда как экзон-3 кодирует ORF и 3'-нетранслируемый участок. ORF гена HuPrP кодирует протеин в 253 аминокислоты, тогда как гены PrP мышей и сирийских хомяков кодируют протеины в 254 аминокислоты. Промоторы генов PrP обоих животных содержат, соответственно, три или два повтора G-C нонамеров, но лишены TATA-боксов. Эти наномеры представляют мотив, который может функционировать как канонический сайт связывания для транскрипции.

Увеличение прионной инфекционности включает посттрансляционную конверсию PrP^c-предшественника в PrP^{Sc}. Исследования, основанные на экспрессии у мышей чужеродных SHaPrP, HuPrP или BoPrP трансгенов, подтвердили, что образование прионов является результатом взаимодействия инфекционных молекул PrP^c с гомологичными, кодируемыми хозяином, молекулами PrP^c, приводящим к появлению новых молекул PrP^{Sc}.

Дополнительные свидетельства, подкрепляющие данную модель репликации прионов, получены в исследованиях на трансгенных мышах, экспрессирующих химерные или мутантные PrPs, где прионы, образованные с этих трансгенных продуктов, имели неестественный спектр хозяев. При отсутствии известных фактов посттрансляционной химической модификации, позволяющей дифференцировать PrP^c от PrP^{Sc}, эти две изоформы остаются различимыми только по своей конформации.

Антигенные свойства. PrP^{Sc} является слабым антигеном. Антигенность PrP^{Sc} усиливается при иммунизации PrP-дефицитных мышей, которые нетолерантны в отношении PrP^c. Иммунореактивность PrP^{Sc} значительно усиливается при денатура-

ции, Некоторые антитела и рекомбинантные Fab-фрагменты способны связываться с неденатурированным PrP^c; более того анти-PrP-антитела были использованы для нейтрализации инфекционной активности прионов, распределенных в лизосомах.

Биологические особенности. Прионные болезни представляют собой группу нейродегенеративных нарушений, наблюдаемых у млекопитающих. (таблица 1). Болезни передаются при определенных условиях, но, в отличие от других трансмиссивных болезней, прионные болезни могут вызываться мутациями в PrP-гене хозяина. Механизм распространения прионов среди овец и коз, сопровождающийся развитием скрепи, не известен. Считается, что CWD, TME, BSE, FSE, EUE проявляется после контакта с инфекционным материалом. Считается, что болезнь Куру, наблюдавшаяся у людей в Новой Гвинее, связана с ритуальным каннибализмом. Семейные CJD, GSS и FF1 являются, преимущественно, генетически наследуемыми прионными болезнями; показана генетическая связь пяти разных мутаций гена PrP с развитием наследственных прионных болезней. Ятрогенные случаи CJD могут быть связаны с инокуляцией прионов с человеческим гипофизарным гормоном роста, трансплантацией роговицы, твердого тела, или с вживлением церебральных электродов, тем не менее, такие случаи встречаются редко. Считается, что новые варианты CJD связаны с контактом с продуктами от BSE-пораженных животных.

Большинство случаев CJD спорадические, и, вероятно, являются результатом соматических мутаций гена PrP или спонтанного перехода PrP^c в PrP^{Sc}. От 10 % до 15 % случаев CJD и почти все случаи GSS и FFI связаны с мутациями PrP генов герминативных клеток. Описано 20 разных мутаций гена PrP связанных с прионными болезнями человека.

Штаммы прионов. Штаммы или изоляты прионов характеризуются по продолжительности инкубационного периода, распределению вакуольных поражений и профилю PrP^{Sc}-аккумуляции. Штаммоспецифическая информация по прионам определяется конформацией PrP^{Sc}. Данные PrP^c, различающиеся по конформации, реплицировались у мышей, экспрессирующих химерные мышь/человек трансгены. Происхождение инокулума определяло продолжительность инкубационного периода, распределение нейропатологических поражений и профиль депозиции PrP^c у

трансгенных мышей. Дополнительные доказательства штаммоспецифичности были получены при расшифровке конформации PrP^{Sc} двух прионных штаммов, выделенных от норок, павших от ТМЕ, и пассированных на сирийских хомяках, у которых PrP^{c} каждого штамма характеризовался разной чувствительностью к протеолизису.

15 Тестовые задания для контроля уровня знаний

Тесты по разделу 1 – История вирусологии, природа и происхождение вирусов

1.1. В каком году американский вирусолог Херстом открыл феномен гемагглютинации:

1) 1941;
2) 1942;
3) 1943;
4) 1944.

1.2. В каком году была открыта возможность культивировать клетки в искусственных условиях:

1) 1949;
2) 1950;
3) 1951;
4) 1952.

1.3. В каком году была проведена массовая иммунизация детского населения в СССР (около 15 млн.) живой полиомиелитной вакциной:

1) 1958;
2) 1959;
3) 1960;
4) 1961.

1.4. В каком году была открыта обратная транскриптаза в составе РНК-содержащих онкогенных вирусов, фермент, переписывающий РНК на ДНК:

1) 1968;
2) 1969;
3) 1970;
4) 1971.

1.5. В каком году возникает новый раздел молекулярной биологии – генная инженерия:

1) 1970;
2) 1971;
3) 1972;
4) 1973;

1.6. Какому из ученых в 1976 году была присуждена Нобелевская премия за открытие антигена гепатита В:

1) Г. Бламберг;
2) К. Гайдушек;
3) П. Берг;
4) Д. Балтимор.

1.7. Какой из ниже перечисленных ученых не принимал участие в разработке, апробации и внедрении в практику убитой и живой вакцины против полиомиелита:

1) Дж. Солк;
2) А. Сейбин;
3) М. П. Чумаков;
4) Ф. Роббинс.

1.8. В каком году была организована первая экспедиция в ходе которой был открыт вирус клещевого энцефалита, выявлены его переносчики – иксодовые клещи, разработаны методы лабораторной диагностики, профилактики и лечения:

1) 1936;
2) 1937;
3) 1938;
4) 1939.

1.9. Какой год считается годом открытия вирусов:

1) 1888;
2) 1890;
3) 1892;
4) 1917;

1.10. Какой ученый считал что, возбудитель табачной мозаики – жидкий живой контагий:

1) Ф. Леффлер;
2) П. Фроша;
3) В. Бейеринк;
4) Ф. д'Эррель.

1.11. Период развития вирусологии «уровень клетки» приходится на:

1) 30-40е годы;
2) 50-е годы;
3) 60-е годы.

Тесты по разделу 2 – Химический состав вирусов

2.1. Сколько процентов липидов у ДНК-содержащих вирусов (вирусы оспы, герпеса и гепатита В) представлено фосфолипидами:

1) 40-50%
2) 50-60%
3) 60-70%

2.2. Сколько процентов липидов у ДНК-содержащих вирусов (вирусы оспы, герпеса и гепатита В) составляет холестерин:

1) 20-30%
2) 30-40%
3) 40-50%

2.3. Какой из типов белков выделяют не из очищенных препаратов вирусов, а из зараженных клеток

1) капсидные белки;
2) суперкапсидные белки;
3) неструктурные белки.

2.4 Основной функцией каких белков является функция защиты вирусного генома от неблагоприятных воздействий внешней среды, у многих вирусов в составе данных белков есть белки и с другими функциями:

1) капсидные белки;
2) суперкапсидные белки;
3) неструктурные белки.

2.5 Эти белки являются типичными внутримембранными белками и имеют много общего с клеточными мембранными белками:

1) капсидные белки;
2) суперкапсидные белки;
3) неструктурные белки.

2.6. Что является обычными сахарными остатками, обнаруживаемыми в вирусных белках:

1) фруктоза;
2) манноза;
3) глюкоза.

2.7. *Что является каркасом для локальных участков гликопротеида, обеспечивая сохранение конформации белковой молекулы, и обусловливает защиту молекулы от протеаз:*

1) белки;
2) липиды;
3) углеводы.

Тесты по разделу 3 – Морфология, морфогенез, биофизические свойства и генетика вирусов

3.1. Способность вирусной РНК хранить наследственную информацию впервые была продемонстрирована при изучении:

1) вирус осповакцины;
2) вируса табачной мозаики (ВТМ);
3) поксвирусов;
4) герпетовирусов.

3.2. Фермент обратной транскриптазы - РНК-зависимая ДНК-полимераза был открыт:

1) Ф. Уотсоном и Криком;
2) Б. МакАусланом;
3) Х. Френкель-Конратом;
4) К. Балтимором.

3.3. Соотношение общего количества известных ДНК-геномных вирусов к РНК-геномным составляет:

1) 20% / 80%;
2) 50% / 50%;
3) 80% / 20%;
4) 44% / 56%.

3.4. Минимальный размер генома вирусов составляет:

1) 1,2 т.п.н;
2) 2,3 т.п.н;
3) 4,4 т.п.н;
4) 5 т.п.н.

3.5. Характерными чертами генома вирусов является (исключите лишнее):

1) малый размер;

2) экономичность организации;
3) единый способ укладки;
4) наличие двух типов геномов.

3.6. Какой способ увеличения информационной емкости генома характерен для вирусов?

1) сдвиг рамки трансляции;
2) сплайсинг;
3) транскрипция с перекрывающихся областей ДНК;
4) все ответы верны.

3.7. К РНК-содержащим вирусам относятся:

1) папиломавирусы;
2) аденовирусы;
3) ретровирусы;
4) парвовирусы.

3.8. Укажите геном, характерный для рабдовирусов:

1) двунитевая, кольцевая ДНК;
2) однонитевая, линейная ДНК;
3) двунитевая, кольцевая РНК;
4) однонитевая, линейная РНК.

3.9. «Плюс-нитевыми» вирусами являются:

1) буньявирусы;
2) ортомиксовирусы;
3) парамиксовирусы;
4) пикорнавирусы.

3.10. «Минус-нитевыми» вирусами являются:

1) тогавирусы;
2) рабдовирусы;
3) коронавирусы;
4) ретровирусы.

3.11. Особенностью «плюс-нитевых» вирусов является:

1) наличие у генома функций информационной РНК;
2) не способна вызвать инфекционный процесс;
3) присутствие собственного фермента, осуществляющего транскрипцию геномной РНК и синтез иРНК
4) отсутствует специфическая структура на 5'-конце – «сар».

3.12. К ДНК-содержащим вирусам относятся:

1) герпесвирусы;
2) парамиксовирусы;
3) рабдовирусы;
4) реовирусы.

3.13. Укажите модели репликации нуклеиновых кислот, обнаруженные только у вирусов:

1) консервативная;
2) полуконсервативная;
3) дисперсная;
4) все ответы верны.

3.14. Какая модель репликации не характерна для ДНК-содержащих вирусов:

1) консервативная;
2) полуконсервативная;
3) дисперсная;
4) консервативная и дисперсная.

3.15. Укажите геном, характерный для папаломавирусов:

1) двунитевая, кольцевая ДНК;
2) однонитевая, линейная ДНК;
3) двунитевая, кольцевая РНК;
4) однонитевая, линейная РНК.

3.16. Основная масса РНК-содержащих вирусов реплицируется

1) на поверхности клетки;
2) в ядре;
3) в цитоплазме;
4) на внутренней поверхности ЦПМ.

3.17. К способам инициации синтеза ДНК у вирусов относят:

1) инициация на внутренних участках ДНК;
2) инициация на концах ДНК;
3) инициация синтеза с использованием разрывов и брешей;
4) все ответы верны.

18. Укажите тип репликации геномной ДНК, характерный для парвовирусов:

1) терминальная инициация с помощью самозатравочного механизма;
2) схема Кернса;
3) механизм катящегося кольца;

4) репликация через интеграцию.

3.19. Укажите тип репликации геномной ДНК, протекающей через процесс репликативной транспозиции:

1) терминальная инициация с помощью самозатравочного механизма;
2) схема Кернса;
3) механизм катящегося кольца;
4) репликация через интеграцию.

3.20. Терминация синтеза полноразмерных линейных форм ДНК у вирусов может проходить:

1) через образование конкатемеров;
2) через образование шпильки;
3) путем совмещения синтезированных цепей;
4) все ответы верны.

Тесты по разделу 4 – Репродукция вирусов

4.1. За адсорбцию каких семейств вирусов являются ответственными рецепторы в составе которых имеется сиаловая кислота в составе гликопротеидов и гликолипидов:

1) Рабдовирусов;
2) Реовирусов;
3) Пикорнавирусов;
4) Ортомиксовирусов.

4.2. За адсорбцию каких семейств вирусов являются ответственными рецепторы в составе которых имеется сиаловая кислота в составе гликопротеидов и гликолипидов:

1) Рабдовирусов;
2) Реовирусов;
3) Парамиксовирусов;
4) Пикорнавирусов.

4.3. За адсорбцию каких семейств вирусов являются ответственными рецепторы в составе которых имеется углеводный компонент в составе белков и липидов:

1) Рабдовирусов;
2) Реовирусов;
3) Пикорнавирусов;
4) Ортомиксовирусов.

4.4. За адсорбцию каких семейств вирусов являются ответственными рецепторы в составе которых имеются белки:

1) Рабдовирусов;
2) Пикорнавирусов;
3) Аденовирусов;
4) Ортомиксовирусов.

4.5. В каком из процессов принимают участие специфические рецепторы:

1) прикрепление вирусной частицы к клеточной поверхности;
2) внутриклеточный транспорт;
3) синтез комплементарных РНК на родительских матрицах;
4) доставка вирусной частицы в определенные участки цитоплазмы и ядра.

4.6. Для какого семейства вирусов характерен путь передачи генетической информации РНК → белок:

1) Пикорнавирусы;
2) Тогавирусы;
3) Ретровирусы;
4) Рабдовирусы.

4.7. Для какого семейства вирусов характерен путь передачи генетической информации РНК → РНК → белок:

1) Пикорнавирусы;
2) Тогавирусы;
3) Рабдовирусы;
4) Реовирусы.

4.8. Для какого семейства вирусов характерен путь передачи генетической информации РНК → ДНК → РНК → белок

1) Пикорнавирусы;
2) Ретровирусы;
3) Рабдовирусы;
4) Реовирусы.

4.9. Геном каких вирусов представлен однонитчатой РНК:

1) Ортомиксовирусов;
2) Парамиксовирусов;
3) Рабдовирусов;
4) Реовирусов.

4.10. Какое из семейств вирусов относится к диплорнавирусам

1) Ортомиксовирусов;
2) Парамиксовирусов;
3) Буньявирусов;
4) Реовирусов.

4.11. Где и с использованием, какого фермента осуществляется транскрипция ДНК-содержащих вирусов – паповавирусов, вирусов герпеса, парвовирусов, гепаднавирусов:

1) осуществляется в ядре клетки с использованием фермента клеточной РНК-полимеразой II – который осуществляет транскрипцию клеточного генома;
2) осуществляется в ядре клетки с использованием клеточного фермента – РНК-полимеразы III;
3) происходит в цитоплазме, транскрипция этих вирусов нуждается в специальном вирусном ферменте – вирусной РНК-полимеразе являющимся структурным вирусным белком.

4.12. Где и с использованием, какого фермента осуществляется транскрипция ДНК-содержащих вирусов – аденовирусов:

1) осуществляется в ядре клетки с использованием фермента клеточной РНК-полимеразой II – который осуществляет транскрипцию клеточного генома;
2) осуществляется в ядре клетки с использованием клеточного фермента – РНК-полимеразы III;
3) происходит в цитоплазме, транскрипция этих вирусов нуждается в специальном вирусном ферменте – вирусной РНК-полимеразе являющимся структурным вирусным белком.

4.13. Где и с использованием, какого фермента осуществляется транскрипция ДНК-содержащих вирусов – поксвирусов, иридовирусов:

1) осуществляется в ядре клетки с использованием фермента клеточной РНК-полимеразой II – который осуществляет транскрипцию клеточного генома;
2) осуществляется в ядре клетки с использованием клеточного фермента – РНК-полимеразы III;
3) происходит в цитоплазме, транскрипция этих вирусов нуждается в специаль-

ном вирусном ферменте – вирусной РНК-полимеразе являющимся структурным вирусным белком.

4.14. Какие посттрансляционные ковалентные модификации является обратимыми:

1) фосфорилирование;
2) ацилирование;
3) метилирование;
4) сульфирование.

4.15. Какие из семейств вирусов по месту проведения репликации относятся к ядерным:

1) Аденовирусы;
2) Папповавирусы;
3) Поксвирусы;
4) Парвовирусы.

4.16. Какие из семейств вирусов по месту проведения репликации относятся к цитоплазматическим:

1) Поксвирусы;
2) Парвовирусы;
3) Герпетовирусы;
4) Рабдовирусы.

4.17. У каких из семейств РНК- содержащих вирусов репликации происходит не в цитоплазме:

1) Поксвирусов;
2) Ортомиксовирусов;
3) Ретровирусов;
4) Тогавирусов;
5) Флавивирусов.

4.18. Какая из перечисленных ниже стадий репликации вирусов не является температурозависимым процессом:

1) адсорбция;
2) проникновение;
3) сборка;
4) высвобождение.

4.19 Какова правильная последовательность репликации +РНК-содержащих вирусов:

1) депротеинизация, транскрипция, синтез белка, синтез вирусной РНК;
2) депротеинизация, синтез белка, синтез копии РНК, синтез вирусной РНК;
3) транскрипция, синтез белка, депротеинизация, синтез вирусной РНК;
4) синтез белка, депротеинизация, синтез копии РНК, синтез вирусной РНК.

4.20. Какова правильная последовательность репликации герпесвирусов:

1) депротеинизация, транскрипция, синтез белка, синтез вирусной ДНК;
2) депротеинизация, синтез белка, транскрипция, синтез вирусной ДНК;
3) транскрипция, синтез белка, депротеинизация, синтез вирусной ДНК;
4) синтез белка, депротеинизация, транскрипция, синтез вирусной ДНК.

4.21. Какова основная функция продуктов начальных генов в репликации поксвирусов:

1) новая полимеразная активность;
2) депротеинизация сердцевины вируса;
3) антилизосомальная активность;
4) разрушение РНК хозяина.

4.22. Какой из перечисленных посредников репликации ретровирусов выполняет функцию матрицы для синтеза вирусной мРНК:

1) вирусная РНК;
2) первичная копия ДНК;
3) молекула-гибрид РНК-ДНК;
4) интегрированный ДНК-провирус.

4.23. Вирусные поражения могут проявляться в виде продуктивных, абортивных, латентных и инаппарантных инфекций. Какие вирусы способны вызвать персистирующее течение инфекционного процесса:

1) высоковирулентные литические;
2) значительно изменяющие метаболизм клетки;
3) инфицирующие нечувствительные клетки;
4) вирусы, высвобождающиеся почкованием.

Тесты по разделу 5 – Основные процессы, контролирующие наследственность и изменчивость вирусов

5.1. Как называются не наследуемые (фенотипические) изменения у вирусов, обусловленные клеткой-хозяином:

1) мутация;
2) модификация;
3) оба варианта верны;
4) оба варианта не верны.

5.2. Как называют обмен генетическим материалом, происходящий между родительскими вирусами. Причем возможен как обмен полными генами (межгенная рекомбинация), так и участками одного и того же гена (внутригенная рекомбинация). Образующийся вирус-рекомбинант обладает свойствами, унаследованными от разных родителей:

1) множественная реактивация;
2) рекомбинация;
3) пересортировка генов;
4) перекрестная реактивация.

5.3. В основе какого из ниже перечисленных процессов лежит кооперативный процесс, при котором вирионы с поражением разных генов дополняют друг друга путем генетической рекомбинации, в результате чего репродуцируется исходный неповрежденный вирус:

1) множественная реактивация;
2) рекомбинация;
3) пересортировка генов;
4) перекрестная реактивация.

5.4. В каком случае происходит кросс-реактивация или реактивация при скрещивании, когда у одного из штаммов вируса часть генома повреждена, а другой геном интактен. При смешанной инфекции двумя такими вирусами возможна рекомбинация неповрежденных участков генома инактивированного вируса с геномом интактного вируса, и в результате этого процесса появляются штаммы вируса со свойствами обоих родителей:

1) множественная реактивация;
2) рекомбинация;
3) пересортировка генов;
4) перекрестная реактивация.

5.5. Какой из процессов наблюдается при генетических взаимодействиях между вирусами, имеющими сегментированный геном. Образующиеся при этом гибридные формы вирусов называют реассортантами. Реассортанты вирусов гриппа получают при совместном культивировании вирусов с разными генами гемагглютинина и нейраминидазы:

1) множественная реактивация;
2) рекомбинация;
3) пересортировка генов;
4) перекрестная реактивация.

5.6. Культура клеток HeLa была заражена двумя различными термолабильными мутантами полиовируса и содержалась в неподходящем температурном режиме. По окончании инкубации в культуре идентифицированы «нормальные» вирусы обоих типов. Какой тип взаимодействий между вирусами лежит в основе подобного феномена:

1) фенотипическое смешивание;
2) комплементация;
3) рекомбинация;
4) псевдотипирование;
5) сайтспецифический мутагенез.

5.7. Взаимодействие между какими вирусами может привести к фенотипическому смешиванию:

1) между близкородственными вирусами с «голыми» капсидами;
2) между «голым» и «одетым» вирусами;
3) между близкородственными ДНК-содержащими вирусами;
4) между любыми вирусами, инфицирующими одну и ту же клетку;
5) только между ДНК-содержащими и РНК-содержащими вирусами.

Тесты по разделу 6 – Классификация и патогенез вирусных инфекций

6.1. Какими из ниже перечисленных факторов организма определяется вирулентность вируса:

1) конституция;
2) возраст и питание;
3) наличие стресса;
4) естественный и приобретенный иммунитет.

6.2. Путь передачи инфекции возникающий при хирургических вмешательствах, переливании крови, стоматологических операциях и т.д. называется:

1) воздушно-капельный;
2) фекально-оральный;
3) трансмиссивный;
4) парентеральный.

6.3. Какими из ниже перечисленных факторов определяется патогенез вирусного заболевания:

1) тропизмом вируса;
2) скоростью репродукции вируса и количеством инфекционных частиц в потомстве;
3) реакцией клетки на инфекцию;
4) реакцией организма на вызванные инфекцией изменения клеток и тканей.

6.4. Как называется путь передачи вируса через укус насекомых:

1) воздушно-капельный;
2) фекально-оральный;
3) трансмиссивный;
4) парентеральный.

6.5. Какие варианты нуклеиновых кислот встречают в вирусном геноме:

1) несегментированную двунитевую ДНК;
2) несегментированный двунитевый гибрид ДНК-РНК;
3) сегментированную двунитевую РНК;
4) сегментированную двунитевую ДНК.

6.6. В чувствительной популяции патогенные вирусы распространяются горизонтально и вертикально. Какой путь наиболее характерен, и какая форма пере-

дачи возбудителя наиболее часто вызывает развитие эпидемических вспышек:

1) воздушно-капельный;
2) фекально-оральный;
3) трансмиссивный;
4) парентеральный.

6.7. Невосприимчивость к инфицированию патогенными вирусами. Назовите наиболее важный фактор:

1) внутривидовая резистентность;
2) невосприимчивость к повторному заражению;
3) формирование иммунной прослойки;
4) проведение вакцинопрофилактики.

6.8. Клиническую картину вирусных поражений определяют биологические свойства возбудителя и индивидуальные особенности пациента. Какие из этих особенностей существенно влияют на течение вирусной инфекции:

1) возраст пациента;
2) характер профессиональной деятельности, вредные привычки;
3) образ жизни и характер питания;
4) наследственные факторы, сопутствующие заболевания.

6.9. Как называется инфекция при которой нет ни сборки вирусной частицы, ни выхода вируса из клетки. Клетка может сохранить нормальные функции и при ее делении вирусные последовательности могут переходить в геном дочерних клеток:

1) интеграционная инфекция;
2) абортивная инфекция;
3) цитолитическая;
4) нецитолитическая.

6.10. Для какого из семейств вирусов невозможен интеграционный тип инфекции:

1) Аденовирусов;
2) Паповавирусов;
3) Поксвирусов;
4) Вирусов герпеса;
5) Ретровирусов.

6.11. Для какого из семейств РНК-содержащих вирусов обязателен интеграционный тип инфекции:

1) Аденовирусов;
2) Паповавирусов;
3) Поксвирусов;
4) Вирусов герпеса;
5) Ретровирусов.

6.12. Как называется инфекция, которая не завершается образованием инфекционных вирусных частиц, или они образуются в гораздо меньшем количестве, чем при продуктивной инфекции:

1) абортивная инфекция;
2) цитолитическая;
3) нецитолитическая;
4) смешенная;
5) острая;
6) хроническая.

6.13. Как называется инфекция, завершающаяся гибелью (лизисом) клетки:

1) абортивная инфекция;
2) цитолитическая;
3) нецитолитическая;
4) смешенная;
5) острая;
6) хроническая.

6.14. Как называется инфекция, которая непосредственно не приводит к лизису клетки, и клетка еще может функционировать в течение некоторого периода времени, продуцируя вирусные частицы:

1) абортивная инфекция;
2) цитолитическая;
3) нецитолитическая;
4) смешенная;
5) острая;
6) хроническая.

6.15. Как называется инфекция, при которой клетка заражается двумя или несколькими разными вирусами. Два и больше инфекционных процесса, происходящих одновременно в одной клетке, могут оказывать различное влияние друг на друга:

1) абортивная инфекция;
2) цитолитическая;
3) нецитолитическая;
4) смешенная;
5) острая;
6) хроническая.

6.16. Как называется форма инфекции, при которой после образования вирусного потомства клетка либо погибает, либо выздоравливает и не содержит вирусных компонентов:

1) абортивная инфекция;
2) цитолитическая;
3) нецитолитическая;
4) смешенная;
5) острая;
6) хроническая.

6.17. Как называется форма инфекции, при которой клетка продолжает продуцировать вирусные частицы или вирусные компоненты в течение длительного времени и передает эту способность дочерним клеткам:

1) абортивная инфекция;
2) цитолитическая;
3) нецитолитическая;
4) смешенная;
5) острая;
6) хроническая.

6.18. Как называется процесс при котором один из вирусов подавляет репродукцию второго вируса, или подавляется репродукция обоих вирусов:

1) интеграционная инфекция;
2) абортивная инфекция;
3) цитолитическая;
4) интерференция вирусов.

6.19. Как называется инфекция, не сопровождающаяся выделением вирусов в окружающую среду:

1) смешенная;
2) острая;
3) хроническая;
4) медленная.

6.20. Как называется инфекция, характеризующееся длительным инкубационным периодом, тянущимся многие месяцы и даже годы, и последующим неуклонным развитием симптомов заболевания, ведущим к тяжелому нарушению функций органов и летальному исходу:

1) смешенная;
2) острая;
3) хроническая;
4) латентная;
5) медленная.

6.21. Таким путем в организм проникают вирусы герпеса, бородавок человека (семейство паповавирусов):

1) пищевой;
2) трансмиссивный;
3) половой;
4) парентеральный;
5) воздушно-капельный.

6.22. Таким путем в организм проникает вирус бешенства:

1) пищевой;
2) через кожу;
3) трансмиссивный;
4) половой;
5) парентеральный;
6) воздушно-капельный.

Тесты по разделу 7 – Противовирусный иммунитет

7.1. Какие иммуноглобулины являются минорными сывороточными компонентами, т.е. находятся в сыворотке в наименьших концентрациях:

1) IgA;
2) IgE;
3) IgG;
4) IgM;
5) IgD.

7.2. Как называется способность организма давать ускоренные иммунологические реакции на повторное введение антигена:

1) иммунологическая память;
2) специфический иммунитет;
3) врожденный иммунитет;
4) приобретенный иммунитет.

7.3. Какие клетки принимают участие в иммунной стимуляции, распознавании антигена, регуляции пролиферации и дифференцировки лимфоцитов. Кроме того, они являются активными помощниками в разрушении и удалении из организма неродственных антигенов:

1) макрофаги;
2) лимфоциты;
3) нейтроилы;
4) нет правильного ответа.

7.4. Как называется определенная конфигурация аминокислот на поверхности антигена, обладающая иммуногенными свойствами:

1) эпитоп
2) моноклональные антитела
2) антигенные детерминанты
4) нет правильного ответа.

7.5. Что образуют участки перекрывающихся эпитопов:

1) эпитоп
2) моноклональные антитела
2) антигенные детерминанты
4) нет правильного ответа.

7.6. На какой день при первичном введении антигена появляются антитела класса IgM:

1) 3-6-й день;
2) 5-14-й день;
3) 15-21-й день;
4) 20-30-й день.

7.7. На какой день при первичном введении антигена появляются антитела класса IgG:

1) 3-6-й день;
2) 5-14-й день;
3) 15-21-й день;

4) 20-30-й день.

7.8. На какой день при первичном введении антигена появляются антитела класса IgA:

1) 3-6-й день;
2) 5-14-й день;
3) 15-21-й день;
4) 20-30-й день.

7.9. Сколько процентов среди лимфоцитов периферической крови человека составляют Т-лимфоциты:

1) 55-60 %;
2) 25-30 %;
3) 40-50 %;
4) 10-20 %.

7.10. Сколько процентов среди лимфоцитов периферической крови человека составляют В-лимфоциты:

1) 55-60 %;
2) 25-30 %;
3) 40-50 %;
4) 10-20 %.

7.11. Сколько процентов среди лимфоцитов периферической крови человека составляют лимфоциты (нулевые клетки):

1) 55-60 %;
2) 25-30 %;
3) 40-50 %;
4) 10-20 %.

7.12. Какие антитела получают путем гибридизации лимфоцитов селезенки мышей, иммунизированных определенным антигеном, с клетками злокачественной опухоли иммунной системы мышей – миеломы:

1) эпитоп;
2) моноклональные антитела;
2) антигенные детерминанты;
4) нет правильного ответа.

7.13. Что из ниже перечисленного относится к факторам неспецифической резистентности:

1) кожные и слизистые покровы;
2) лизоцимы, выделяемые слизистыми оболочками и циркулирующие в крови;
3) пропердиновая система;
4) мукопротеины клеток слизистых оболочек;
5) фагоциты и макрофаги;
6) Т- и В-лимфоциты.

7.14. Что из ниже перечисленного не относится к факторам неспецифической резистентности:

1) кожные и слизистые покровы;
2) лизоцимы, выделяемые слизистыми оболочками и циркулирующие в крови;
3) пропердиновая система;
4) мукопротеины клеток слизистых оболочек;
5) фагоциты и макрофаги;
6) Т- и В-лимфоциты.

7.15. Что из ниже перечисленного относится к клеточному иммунитету:

1) кожные и слизистые покровы;
2) лизоцимы, выделяемые слизистыми оболочками и циркулирующие в крови;
3) пропердиновая система;
4) мукопротеины клеток слизистых оболочек;
5) фагоциты и макрофаги;
6) Т- и В-лимфоциты.

7.16. По наличию в крови, какого класса антител определяют гуморальный иммунитет:

1) IgA;
2) IgE;
3) IgG;
4) IgM;
5) IgD.

7.17. По наличию в крови, какого класса антител установают свежеперенесенные инфекции:

1) IgE;
2) IgG;
3) IgM;
4) IgD.

Тесты по разделу 10 – Принципы и методы диагностики вирусных инфекций

6.1. С помощью какого из ниже перечисленных методов может быть использован для обнаружения и идентификации вирусов:

1) РН;
2) РИФ;
3) ИФА;
4) **ПЦР.**

6.2. Какой из подходов используется в лабораторной диагностике вирусных инфекций:

1) непосредственное исследование материала на наличие вирусного антигена или нуклеиновых кислот;
2) изоляция и идентификация вируса из клинического материала;
3) серологическая диагностика, основанная на установлении значительного прироста вирусных антител в течение болезни;
4) не один из выше перечисленные варианты;
5) все выше перечисленные варианты.

6.3. Какой из методов основывается на мечении антител ферментами:

1) РН;
2) РИФ;
3) ИФА;
4) **ПЦР.**

6.4. Какой метод оптимален для определения общего количества вирусных частиц в суспензии:

1) прямое изучение вирусных колоний;
2) прямой анализ инфекционности;
3) количественная электронная микроскопия;
4) количественная гемагглютинация;
5) ни один из перечисленных.

6.5. Какой из нижеперечисленных факторов обеспечивает преодоление адсорбционного барьера культуры клеток птиц для полиовирусов:

1) трипсинизация клеток;
2) использование инфекционной РНК;
3) воздействие на клетки нейраминидазой;

4) воздействие на вирус нейраминидазой;
5) ни один из перечисленных.

6.6. Каким образом можно выявить наличие вируса в заражённой культуре клеток:

1) По цитопатическим изменениям в культуре;
2) По способности цитоплазматической мембраны инфицированных клеток адсорбировать эритроциты;
3) Обнаружением вирусных протеинов в монослое инфицированных клеток;
4) Выявлением изменения питательных потребностей инфицированных клеток.

6.7. Какие из указанных лабораторных методов исследования используют на практике для диагностики вирусных инфекций:

1) определение титра противовирусных АТ в парных сыворотках;
2) культивирование возбудителя в культуре клеток или на чувствительных животных;
3) исследование поражений для прямого определения цитопатического эффекта, выявления инфекционного агента, его Аг или нуклеиновых кислот;
4) определение функциональной активности иммунокомпетентных клеток, особенно $CD4^+$ лимфоцитов.

6.8. Культура часто содержит разные типы клеток, хотя и формирует монослои и способна к субкультивированию на протяжении нескольких генераций:

1) культура органа;
2) к**ультура первичных клеток;**
3) перевиваемые линии клеток;
4) линии диплоидных клеток;
5) ни один из указанных.

6.9. Способна к пассированию 20-30 раз, после чего отмирает или подвергается спонтанной трансформации:

1) культура органа;
2) к**ультура первичных клеток;**
3) перевиваемые линии клеток;
4) линии диплоидных клеток;
5) ни один из указанных.

6.10. Не растёт в виде монослоя, но поддерживает жизнеспособность вируса:

1) культура органа;
2) к**ультура первичных клеток;**
3) перевиваемые линии клеток;
4) линии диплоидных клеток;
5) ни один из указанных.

6.11. Поддерживает некоторые формы специфических тканевых маркёров:

1) культура органа;
2) к**ультура первичных клеток;**
3) перевиваемые линии клеток;
4) линии диплоидных клеток;
5) ни один из указанных.

6.12. Поддерживает широкий спектр клеточных маркёров:

1) культура органа;
2) к**ультура первичных клеток;**
3) перевиваемые линии клеток;
4) линии диплоидных клеток;
5) ни один из указанных.

6.13. Методы, которые позволяют обнаружить вирус, вирусный антиген или вирусную нуклеиновую кислоту непосредственно в клиническом материале называются:

1) прямые;
2) непрямые;
3) косвенные;
4) нет правильного ответа.

6.14. Метод основанный на использовании антител, связанных с красителем, например флюоресцеинизотиоцианатом называется:

1) РИФ;
2) ИФА;
3) **РИА;**
4) ПЦР.

6.15. Какой метод основан на метке антител радиоизотопами, что обеспечивало высокую чувствительность в определении вирусного антигена:

1) РИФ;
2) ИФА;
3) **РИА;**
4) ПЦР.

6.16. Какой метод основан на гибридизации комплементарных нитей ДНК или РНК с образованием двунитевых структур и на выявлении их с помощью метки:

1) РИФ;
2) ИФА;
3) **РИА;**
4) ПЦР.

6.17. Способ получения патологического материала при респираторных инфекциях:

1) смыв и фекалии;
2) кровь, спинномозговая жидкость;
3) носоглоточный смыв;
4) соскобы, содержимое пузырьков;
5) смывы, соскобы, кровь.

6.18. Способ получения патологического материала при энтеровирусных инфекциях:

1) смыв и фекалии;
2) кровь, спинномозговая жидкость;
3) носоглоточный смыв;
4) соскобы, содержимое пузырьков;
5) смывы, соскобы, кровь.

6.19. Способ получения патологического материала при поражениях кожи и слизистых оболочек:

1) смыв и фекалии;
2) кровь, спинномозговая жидкость;
3) носоглоточный смыв;
4) соскобы, содержимое пузырьков;
5) смывы, соскобы, кровь.

6.20. Способ получения патологического материала при арбовирусных инфекциях:

1) смыв и фекалии;
2) кровь, спинномозговая жидкость;

3) носоглоточный смыв;
4) соскобы, содержимое пузырьков;
5) смывы, соскобы, кровь.

6.21. Обнаружение, каких специфических антител используют для ранней диагностики заболевания:

1) IgA;
2) IgE;
3) IgG;
4) IgM;
5) IgD.

6.22. Какая реакция основана на связывании антителами сыворотки больного добавленного стандартного вируса. Индикатором реакции являются эритроциты, агглютинирующиеся вирусом (формирование характерного "зонтика") при отсутствии специфических антител и оседающие на дно неагглютинированными при их наличии:

1) РН;
2) **РТГА;**
3) РПГА;
4) РНГА;
5) РСК.

6.23. В какой реакции принимают участие две системы: антитела сыворотки больного + стандартный вирус и эритроциты барана + антитела к ним, а также оттитрованный комплемент:

1) РН;
2) **РТГА;**
3) РПГА;
4) РНГА;
5) РСК.

6.24. Какая реакция основана на агглютинации сенсибилизированных вирусными антигенами эритроцитов (или полистироловых шариков) в присутствии антител. На эритроцитах могут быть сорбированы любые вирусы, независимо от наличия или отсутствия у них гемагглютинирующей активности:

1) РН;
2) **РТГА;**

3) РПГА;
4) РНГА;
5) РСК.

6.25. Какой метод основан на агглютинации эритроцитов, сенсибилизированных специфическими антителами в присутствии вирусных антигенов:

1) РН;
2) **РТГА;**
3) РПГА;
4) РНГА;
5) РСК.

6.26. Какие из перечисленных методов используются для их лабораторной диагностики вирусов гриппа А и В:

1) РТГА, РСК, ИФА;
2) РТГА, РИФ, ИФА;
3) РСК - для стабильного типоспецифичного антигена; РТГА - для штаммоспецифичного антигена;
4) РСК, ИФА;
5) РИА, ИФА.

6.27. Какие из перечисленных методов используются для их лабораторной диагностики вируса парагриппа:

1) РТГА, РСК, ИФА;
2) РТГА, РИФ, ИФА;
3) РСК - для стабильного типоспецифичного антигена; РТГА - для штаммоспецифичного антигена;
4) РСК, ИФА;
5) РИА, ИФА.

6.28. Какие из перечисленных методов используются для их лабораторной диагностики аденовирусов:

1) РТГА, РСК, ИФА;
2) РТГА, РИФ, ИФА;
3) РСК - для стабильного типоспецифичного антигена; РТГА - для штаммоспецифичного антигена;
4) РСК, ИФА;
5) РИА, ИФА.

6.29. Какие из перечисленных методов используются для их лабораторной диагностики вируса паротита:

1) РТГА, РСК, ИФА;
2) РТГА, РИФ, ИФА;
3) РСК - для стабильного типоспецифичного антигена; РТГА - для штаммоспецифичного антигена;
4) РСК, ИФА;
5) РИА, ИФА.

6.30. Какие из перечисленных методов используются для их лабораторной диагностики энтеровирусов:

1) РСК, РНГА, ИФА, РИФ;
2) РИА, ИФА;
3) РТГА, РИФ, ИФА;
4) РСК, РИФ;
5) РСК, РН, ИФА.

6.31. Какие из перечисленных методов используются для их лабораторной диагностики вируса парагриппа:

1) РСК, РНГА, ИФА, РИФ;
2) РИА, ИФА;
3) РТГА, РИФ, ИФА;
4) РСК, РИФ;
5) РСК, РН, ИФА.

6.32. Какие из перечисленных методов используются для их лабораторной диагностики вируса простого герпеса:

1) РСК, РНГА, ИФА, РИФ;
2) РИА, ИФА;
3) РТГА, РИФ, ИФА;
4) РСК, РИФ;
5) РСК, РН, ИФА.

6.33. Какие из перечисленных методов используются для их лабораторной диагностики вируса гепатита А:

1) РСК, РНГА, ИФА, РИФ;
2) РИА, ИФА;
3) РТГА, РИФ, ИФА;
4) РСК, РИФ;
5) РСК, РН, ИФА.

6.34. Какие из перечисленных методов используются для их лабораторной диагностики вируса краснухи:

1) РСК, РИФ;
2) РТГА, РИФ, ИФА;
3) Гетерофильный тест, РИФ;
4) РИФ, ИФА, РСК;
5) РСК, РНГА, ИФА, РИФ.

6.35. Какие из перечисленных методов используются для их лабораторной диагностики вируса цитомегалии:

1) РСК, РИФ;
2) РТГА, РИФ, ИФА;
3) Гетерофильный тест, РИФ;
4) РИФ, ИФА, РСК;
5) РСК, РНГА, ИФА, РИФ.

6.36. Какие из перечисленных методов используются для их лабораторной диагностики вируса опоясывающего герпеса:

1) РСК, РИФ;
2) РТГА, РИФ, ИФА;
3) Гетерофильный тест, РИФ;
4) РИФ, ИФА, РСК;
5) РСК, РНГА, ИФА, РИФ.

6.37. Какие из перечисленных методов используются для их лабораторной диагностики вируса Эпштейна-Барра:

1) РСК, РИФ;
2) РТГА, РИФ, ИФА;
3) Гетерофильный тест, РИФ;
4) РИФ, ИФА, РСК;
5) РСК, РНГА, ИФА, РИФ.

Список истользованных источников

1 **Антонов, Е. И.** Лабораторные исследования в ветеринарии: Вирусные, риккетсиозные и паразитарные болезни. справочник / под ред. Е. И.Антонова. — М.: Агропромиздат, 1987. – 240 с.

2 **Букринская, А. Г.** Вирусология / А. Г. Букринская. – М. : Медицина, 1986. – 336 с.

3 Вирусология. В 3-х т. : пер. с англ. / Б. Н. Филдс, Д. М. Найп, Ф. А. Мэрфи, С. Харрисон, Д. Уайли, Б. Ройзман, Д. Дж. Холланд, Р. Ф. Рэмиг, Р. Шоуп, Р. Кауфман, Ш. Пенмен, М. Грин, Д. Р. Лоуи ; под ред. Б. Филдса, Д. Найпа, Р. Ченока, Б. Ройзмана, Дж. Мелника, Р. Шоупа. – М. : Мир, 1989. – Т. 1. – 492 с

4 Вирусология. Методы : пер. с англ. / Т. Баррет, П. Берд, Дж. Клегг, Э. Гулд, Р. Халл, С. Инглис, Р. Киллингтон, М. Мак-Кри, П. Майнор, П. Морган-Капнер, Дж. Паттисон, К. Пауэлл, Б. Прешиос, К. Прингл, В. Рассел, Х. Тюрлер, В. Вуннер ; под. ред. Б. Мейхи. – М.: Мир, 1988. – 344 с.

5 **Воробьев, А. А.** Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / под ред. А.А. Воробьева, А.С. Быков. – М. : Медицинское информационное агентство, 2003. – 236 с.

6 **Кишкун, А. А.** Иммунологические и серологические исследования в медицинской практике / А. А. Кишкун. – М. : ООО «Медицинское информационное агентство», 2006. – 536 с.

7 Медицинская вирусология / под ред. А.М. Королюка, В. Б. Сбойчакова. – СПб. : ООО «ЭЛБИ СПб», 2002. – 163 с.

8 Методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных: справочник / В. Н. Сюрин, Р. В. Белоусова, Б. В.Соловьев, Н. В. Фомина. – М. : Агропромиздат, 1986. – 351 с.

9 **Покровский, В. И.** Медицинская микробиология / под ред. В. И. Покровского, О. К. Поздеева. – М. : ГЭОТАР Медиа, 2006. – 768 с.

10 Практикум по общей вирусологии / И. Г. Атабеков, Т. Ю. Угарова, А. Ф. Бобкова ; под ред. И. Г. Атабекова. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1981. – 192 с.

11 Практикум по общей вирусологии: учеб. пособие / А. А. Аграновский, Н. О. Х. Алиева, И. Г. Атабеков, А. В. Баранова, Г. А. Белов, А. Ф. Бобкова, О. В.Борисова, В. К. Вишниченко, Т. М.Дмитриева, Е. Н.Добров, Д. В.Иванов, О. В.Карпова, С. В. Куст, А. Н. Майсурян, В. К. Новиков, С. Н. Рубцова, В. И. Самойлов, М. Ю. Скоблов, В. Н. Фролов ; под ред. И. Г. Атабекова. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Изд-во МГУ, 2002. – 184 с.

12 Руководство к практическим занятиям по ветеринарной вирусологии: учеб. пособие / Н. И. Смирнова,. В. М. Жавненко, В. И. Науменков, У. Е. Стародубцева ; под ред. Н. И. Смирновой, В. М. Жавненко. – М.: Высшая школа, 1980. – 128 с.

13 **Соколов, М. И.** Вирусологические и серологические исследования при вирусных инфекциях / М. И. Соколов, А. А. Синицкий, П. И. Ремезов. – М. : Медицина, Ленингр. отд-ние, 1972. – 215 с.

14 **Троценко, Н. И.** Практикум по ветеринарной вирусологии. / Н. И. Троценко, Р. В. Белоусова, Э. А. Преображенская. – М. : Агропромиздат, 1989. – 287с.