

VOПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ *old Green*

РОССИЙСКАЯ
АКАДЕМИЯ
МЕДИЦИНСКИХ
НАУК

ВОПРОСЫ ВИРУСОЛОГИИ

PROBLEMS OF VIROLOGY

ДВУХМЕСЯЧНЫЙ НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ

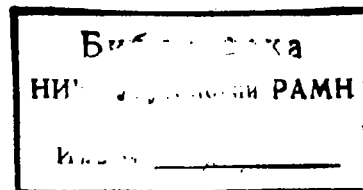
Основан в 1956 г.

том 46

3

МАЙ—ИЮНЬ

2001



РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор Д. К. ЛЬВОВ

В. И. АГОЛ, И. Г. АТАБЕКОВ,
И. Ф. БАРИНСКИЙ,
Т. А. БЕКТИМИРОВ (ответственный секретарь),
Р. В. БЕЛОУСОВА, Г. А. ГАЛЕГОВ,
Ю. З. ГЕНДОН, В. А. ГОЛЬЦОВ,
В. В. ГУНЕНКОВ, С. Г. ДРОЗДОВ,
Ф. И. ЕРШОВ, В. В. ЗВЕРЕВ, В. А. ЗУЕВ,
Н. В. КАВЕРИН, Ф. Л. КИСЕЛЕВ,
С. М. КЛИМЕНКО,
В. А. ЛАШКЕВИЧ (зам. главного редактора),
Г. Р. МАЦЕВИЧ, Г. Г. ОНИЩЕНКО,
В. В. ПОКРОВСКИЙ, И. В. ТАРАСЕВИЧ



МОСКВА • МЕДИЦИНА

СОДЕРЖАНИЕ

ИНФОРМАЦИЯ К РАЗМЫШЛЕНИЮ	4
ОБЗОРЫ	
Гендон Ю. З. Живые холодоадаптированные реассортантные гриппозные вакцины	5
ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	
Казеннова Е. В., Бобков А. Ф., Селимова Л. М., Ханина Т. А., Покровский В. В., Хейндрикс Л., ван дер Гроен Г. Анализ субтипов гена gag вариантов ВИЧ-1, выделенных в России, методом сравнительной оценки электрофоретической подвижности гетеродуплексов.	12
Гмыль Л. В., Карганова Г. Г., Смирнова С. Е., Лашкевич В. А. Вирусспецифические белки вируса Крымской—Конго геморрагической лихорадки	16
Прокудина Е. Н., Семенова Н. П., Чумаков В. М., Руднева И. А. Внеклеточный иммунореактивный нуклеопротеин вируса гриппа, не связанный с вирионами	21
Гайдамович С. Я., Ткаченко А. В., Ларичев В. Ф., Алексеев С. Б., Бутенко А. М., Филатов Ф. П., Науменко М. Г., Русанова А. В., Красильников И. В. Показатели гуморального иммунитета к вирусу краснухи у жителей Москвы в 1998—1999 гг.	26
Агафонов А. П., Стрельцова М. А., Суслопаров И. М., Игнатъев Г. М. Иммунологические показатели у больных эпидемическим паротитом.	30
Шишкина Л. Н., Сафатов А. С., Сергеев А. Н., Пьянков О. В., Порываев В. Д., Булычев Л. Е., Петрищенко В. А., Пьянкова О. Г., Жуков В. А., Рыжиков А. Б., Болдырев А. Н., Буряк Г. А., Ралдугин В. А., Кукина Т. П. Механизмы резистентности мышей к вирусу гриппа A/AICHI/2/68 при профилактическом введении полипренолов.	34
Пиотровский Л. Б., Козелецкая К. Н., Медведева Н. А., Думпис М. А., Познякова Л. Н., Киселев О. И. Влияние комплексов фуллерена C ₆₀ с поливинилпирролидоном на репродукцию вирусов гриппа	38
Тикунова Н. В., Орешкова С. Ф., Мишин В. П., Кононова Г. Л., Ильичев А. А. Структура области перекрытия генов ICP18.5 и gB герпесвируса крупного рогатого скота 1-го типа, штамм ТК-А.	42
ДИСКУССИИ	
Ручко В. М., Махлай Л. И., Борисевич С. В., Махлай А. А. Синдром хронической усталости и иммунной дисфункции	46

CONTENTS

INFORMATION FOR REFLECTIONS	4
REVIEW OF LITERATURE	
Gendon Yu. Z. Live cold-adapted reassortant influenza vaccines	5
ORIGINAL INVESTIGATIONS	
Kazenova Ye. V., Bobkov A. F., Selimova L. M., Khanina T. A., Pokrovsky V. V., Heyndrickx L., Van der Groen G. Analysis of gag gene subtypes of HIV-1 variants isolated in Russia by comparative assessment of heteroduplex electrophoretic mobility	12
Gmyl L. V., Karganova G. G., Smirnova S. Ye., Lashkevich V. A. Virus-specific proteins of Crimean-Congo hemorrhagic fever	16
Prokudina Ye. N., Semenova N. P., Chumakov V. M., Rudneva I. A. Influenza virus extracellular immunoreactive nucleoprotein not related to virions	21
Gaidamovich S. Ya., Tkachenko A. V., Larichev V. F., Alexeev S. B., Butenko A. M., Filatov F. P., Naumenko M. G., Rusanova A. V., Krasilnikov I. V. Humoral immunity to rubella virus in residents of Moscow in 1998-1999	26
Agafonov A. P., Streltsova M. A., Susloparov I. M., Ignatyev G. M. Immunological values of patients with epidemic parotitis	30
Shishkina L. N., Safatov A. S., Sergeev A. N., Pyankov O. V., Poryvaev V. D., Bulychev L. Ye., Petrishchenko V. A., Pynkova O. G., Zhukov V. A., Ryzhikov A. B., Boldyrev A. N., Buryak G. A., Raldugin V. A., Kukina T. P. Mechanisms of mouse resistance to influenza virus A/AICHI/2/68 after preventive injection with polyprenols	34
Plotrovsky L. B., Kozeletskaya K. N., Medvedeva N. A., Dumpis M. A., Poznyakova L. N., Kiselev O. I. Effect of fullerene C ₆₀ -polyvinylpyrrolidone complexes on influenza virus reproduction	38
Tikunova N. V., Oreshkova S. F., Mishin V. P., Kononova G. L., Ilyichev A. A. Structure of overlapping region of ICP18.5 and gB genes of type 1 bovine herpesvirus, strain TK-A	42
DISCUSSION	
Ruchko V. M., Makhlai L. I., Borisevich S. V., Makhlai A. A. Chronic fatigue and immune dysfunction syndrome	46

- // Options for the Control of Influenza III. — Amsterdam, 1996. — P. 129—136.
- 30a. Klimov A., Kiseleva L., Alexandrova G. et al. Genes coding for polymerase proteins are essential for attenuation of the cold-adapted A/Leningrad/134/17/57 (H2N2) influenza virus // Options for the Control of Influenza IV. — Crete, Hersonissos, 2000. — P. 72.
 31. Levy E. French economic evaluation of influenza and influenza vaccination // Pharmaco Economics. — 1996. — Vol. 3. — Suppl. 9. — P. 62—66.
 32. Maassab H. Adaptation a growth characteristics of influenza virus at 25°C // Nature. — 1967. — Vol. 213. — P. 612—614.
 33. Maassab H., De Borde D. Development and characterization of cold-adapted viruses for use as live virus vaccines // Vaccine. — 1980. — Vol. 16. — P. 355—369.
 34. Murphy B., Rennels M., Douglas R. et al. Evaluation of influenza A/HongKong/123/77 (H1N1) and cold-adapted recombinant viruses in seronegative adult volunteers // Infect. and Immun. — 1980. — Vol. 29. — P. 348—355.
 35. Nguen-Van-Tam J. Epidemiology of influenza // Textbook of Influenza. — Oxford, 1998. — P. 181—206.
 36. Nichol K., Goodman M. The health and economic benefits of influenza vaccination for healthy and at-risk persons aged 65 to 74 years // Pharmaco Economics. — 1999. — Vol. 16. — Suppl. 9. — P. 63—71.
 37. Nichol K., Mendelman P., Mullan K. et al. Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults. A randomised control trial // J. A. M. A. — 1999. — Vol. 282. — P. 137—144.
 38. Piedra P., Glezen W. Influenza in children: epidemiology, immunity and vaccines // Sem. Ped. Infect. Dis. — 1991. — Vol. 2. — P. 140—146.
 39. Piedra P., Glezen W., Mbawuke L. et al. Studies on reactogenicity and immunogenicity of attenuated bivalent cold recombinant influenza type A and inactivated trivalent influenza virus vaccines in infants and young children // Vaccine. — 1993. — Vol. 11. — P. 718—724.
 40. Potter C. Chronicle of influenza pandemics // Textbook of Influenza. — Oxford, 1998. — P. 3—18.
 41. Powers D., Fries L., Murphy B. et al. In elderly persons live attenuated influenza A virus vaccines do not offer an advantage over inactivated virus vaccine in inducing serum or secretory antibodies or local immunologic memory // Clin. Microbiol. — 1991. — Vol. 29. — P. 498—505.
 42. Rudenko L., Slepshkin A., Monto A. et al. Efficacy of live attenuated and inactivated influenza vaccines in schoolchildren and their unvaccinated contacts in Novgorod, Russia // J. Infect. Dis. — 1993. — Vol. 168. — P. 881—887.
 43. Rudenko L., Lonskaya N., Klimov A. et al. Clinical and epidemiological evaluation of a live, cold-adapted influenza vaccine for 3—14 years-olds // Bull. Wld Hlth Org. — 1996. — Vol. 74. — P. 77—84.
 - 43a. Current strategies for the prevention of influenza by the Russian cold-adapted live influenza vaccine among different populations // Options for the Control of Influenza IV. — Crete, Hersonissos, 2000. — P. 8.
 44. Schoenbaum S. Impact of influenza in persons and populations // Options for the Control of Influenza III. — Amsterdam, 1996. — P. 17—25.
 45. Simonsen L., Schonberger L., Stroup D. et al. The impact of influenza on mortality in the USA // Ibid. — P. 26—33.
 46. Snyder M., Betts R., De Borde D. et al. Four viral genes independently contribute to attenuation of live influenza A/Ann Arbor/6/60 (H2N2) cold-adapted reassortant virus vaccines // J. Virol. — 1988. — Vol. 62. — P. 488—495.
 47. Swierkosz E., Newman F., Anderson E. et al. Multidose, live attenuated, cold-recombinant, trivalent influenza vaccine in infants and young children // J. Infect. Dis. — 1994. — Vol. 169. — P. 121—124.
 48. Szucs T. The economical impact of influenza in Europe // Options for the Control of Influenza III. — Amsterdam, 1996. — P. 34—42.
 49. Tanaka Y., Ueda K., Miyazaki C. et al. Trivalent cold recombinant influenza live vaccine in institutionalized children with bronchial asthma and patients with psychomotor retardation // Pediatr. Infect. Dis. — 1993. — Vol. 12. — P. 600—605.
 50. Treanor J., Mattison H., Dumyati G. et al. Protection efficacy of combined live intranasal and inactivated influenza A virus vaccines in the elderly // Ann. Intern. Med. — 1992. — Vol. 117. — P. 625—633.
 51. Treanor J., Dunnyatt G., O'Brien D. et al. Evaluation of cold-adapted, reassortant influenza B virus vaccines in elderly and chronically ill adults // J. Infect. Dis. — 1994. — Vol. 169. — P. 402—407.
 52. Wright P., Karzon D. Live attenuated influenza vaccines // Progr. Med. Virol. — 1987. — Vol. 34. — P. 70—88.

Поступила 27.04.2000

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2001

УДК 578.828.6.083.2

Е. В. Казеннова, А. Ф. Бобков, Л. М. Селимова, Т. А. Ханина, В. В. Покровский, Л. Хейндрикс, Г. ван дер Гроен

Анализ субтипов гена gag вариантов ВИЧ-1, выделенных в России, методом сравнительной оценки электрофоретической подвижности гетеродуплексов

Институт вирусологии им. Д. И. Иванова РАН, Российский научно-методический центр по профилактике и борьбе со СПИДом, Москва; Институт тропической медицины, Антверпен, Бельгия

С помощью метода сравнительной оценки электрофоретической подвижности гетеродуплексов, модифицированного для анализа гена gag (HMA-gag), проведено исследование 37 образцов вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), предварительно генотипированных на основании анализа данных о нуклеотидных последовательностях генов gag и env. Показано, что чувствительность и специфичность HMA-gag составляют 100%. С помощью этого метода проведен анализ области гена gag 20 изолятов ВИЧ-1, относящихся к субтипу А по гену env. Среди 5 вирусов, выделенных от людей, инфицировавшихся в результате гетеросексуальных контактов на территории России, был обнаружен один AG-рекомбинант, представляющий собой циркулирующую рекомбинантную форму ВИЧ-1 AG_{IND}. Среди 15 вариантов вируса, выделенных от наркоманов в 7 городах России, новых рекомбинантных форм не обнаружено. Разработанный ме-

тод HMA-gag существенно расширяет возможности исследования изменчивости ВИЧ-1 и в сочетании с методом, предложенным ранее для гена env, является удобным подходом для поиска рекомбинантных форм этого вируса.

Ключевые слова: ВИЧ-1, субтипы, ген gag, электрофорез, подвижность гетеродуплексов, анализ вариантов

Using heteroduplex mobility assay modified for gag gene analysis (HMA-gag), 37 HIV-1 samples previously genotyped by gag and env nucleotide sequencing were studied. It has been demonstrated that both sensitivity and specificity of HMA-gag were 100%. The gag gene region derived from 20 env subtype A HIV-1 isolates was analyzed by this method. AG recombinant, representing a circulating recombinant form of HIV-1 (AG_{IBNG}) was found among five HIV-1 strains isolated from patients infected through heterosexual contacts in Russia. No novel recombinant forms were found among fifteen HIV-1 variants infected from drug users in 7 cities of Russia. The proposed HMA-gag method extends the potentialities of investigating the genetic variability of HIV-1 and in combination with the previously proposed method for env gene is a convenient approach to search for recombinant forms of this virus.

Key words: HIV-1, subtypes, gag gene, electrophoresis, primary heteroduplexes, virion analysis

Анализ субтипов вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1), циркулирующих в разных географических областях и группах риска, представляет интерес как для фундаментальной науки, так и для практического здравоохранения. Однако для определения первичной структуры достаточно протяженных участков генома ВИЧ-1 требуются дорогостоящее оборудование и реактивы. Кроме того, такая работа может выполняться только в лабораториях, располагающих специалистами соответствующего профиля. Среди других подходов, используемых для генотипирования ВИЧ-1, наиболее перспективным представляется метод сравнительной оценки электрофоретической подвижности гетеродуплексов (heteroduplex mobility assay, HMA) [7]. Этот метод, относительно недорогой и менее трудоемкий, позволяет определить субтип ВИЧ-1 в 91—98% случаев [2, 7, 8, 12]. Однако единственная модификация HMA, использовавшаяся до последнего времени, давала возможность определять субтип вируса только по области гена env, кодирующей гликопротеин gp120 [7]. В то же время присутствие в популяции большого числа вариантов ВИЧ-1 с мозаичным геномом, образовавшихся в результате рекомбинации между вирусами разных субтипов, требует разработки методов генотипирования по другим областям генома ВИЧ-1. В настоящей работе мы приводим результаты анализа вариантов ВИЧ-1, циркулирующих в России, с помощью новой модификации HMA, недавно разработанной для генотипирования ВИЧ-1 по гену gag (HMA-gag) [9].

Материалы и методы

В работе использовали 3 панели образцов: 1) панель образцов ДНК лимфоцитов, выделенных от ВИЧ-1-инфицированных граждан Российской Федерации — пациентов Российского научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИДом ($n = 20$). Все образцы были предварительно генотипированы на основании анализа данных о нуклеотидных последовательностях генов gag и env; 2) панель из 17 образцов, содержащих геномную ДНК вариантов ВИЧ-1 различных субтипов, полученную из Института тропической медицины (Антверпен, Бельгия). Образцы этой панели были присланы в Москву зашифрованными и использовались для оценки работы метода; 3) образцы ДНК лимфоцитов, выделенных от ВИЧ-1-инфицированных граждан Российской Федерации ($n = 20$). Анализ нуклеотидной последовательности области гена env, кодирующей участок C2-V3 gp120, прове-

денный ранее, показал, что все они относятся к субтипу А.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили, как описано ранее, с использованием праймеров H1G777 и H1P202 для 1-го раунда и H1gag1584 и g17 для 2-го раунда [9]. Второй раунд ПЦР приводил к амплификации участка генома ВИЧ-1 с координатами 1123—1589 (координаты даны для ВИЧ-1-варианта ELI (K03454), кодирующего часть gag-предшественника со 132-го аминокислотного остатка p24 по 20-й аминокислотный остаток p7. HMA проводили, как описано ранее [9]. В качестве стандартов использовали следующие варианты ВИЧ-1: VI310, CI4, VI57, K29 (субтип А), LBV23-10, DJ258, CI51 (рекомбинанты AG_{IBNG}), TN238, CA10 (рекомбинанты AE_{CM240}), TB132, UG280 (субтип В), DJ259, VI313 (субтип С), K31, VI2003 (субтип D), BZ162, VII74 (субтип F), LBV21-7, RU520 (субтип G), VI525, VI991 (субтип H), SE9173, SE9280 (субтип J). По 4,5 мкл реакционной смеси, полученной после проведения 2-го раунда ПЦР, смешивали с 1 мкл десятикратного буфера отжига (1М NaCl, 100 мМ трис-HCl pH 7,8, 20 мМ ЭДТА). Для получения гетеродуплексов продукты ПЦР денатурировали при 94°C в течение 2 мин, а затем быстро охлаждали во льду. Анализ электрофоретической подвижности гетеродуплексов проводили в 5% полиакриламидном геле (соотношение акриламид: бисакриламид составляло 29:1) с 20% мочевины в трис-боратном буфере (88 мМ трис-борат, 89 мМ борной кислоты, 2 мМ ЭДТА) при постоянном напряжении 250 В в течение 2,5 ч. Затем гели прокрашивали в растворе бромид этидия (0,5 мкг/мл) и фотографировали на пленку "Свема". Как и в случае HMA-env, оценку результатов проводили, сравнивая электрофоретическую подвижность гетеродуплексов, образованных в результате отжига анализируемого образца, со стандартными продуктами. Для выявления рекомбинантных вариантов с генотипами AE_{CM240} или AG_{IBNG} (см. ниже) использовали гели с добавлением 30% мочевины.

Результаты и обсуждение

На рис. 1,а представлены результаты анализа образца RU19 из России. Видно, что электрофоретическая подвижность гетеродуплексов, образуемых между RU19 и стандартами, принадлежащими к субтипу А (VI310, CI4 и LBV23-10), оказывается существенно выше по сравнению с гетеродуплексами, которые RU19 образует со стандартами других субтипов. Аналогично вариант RU2 образует

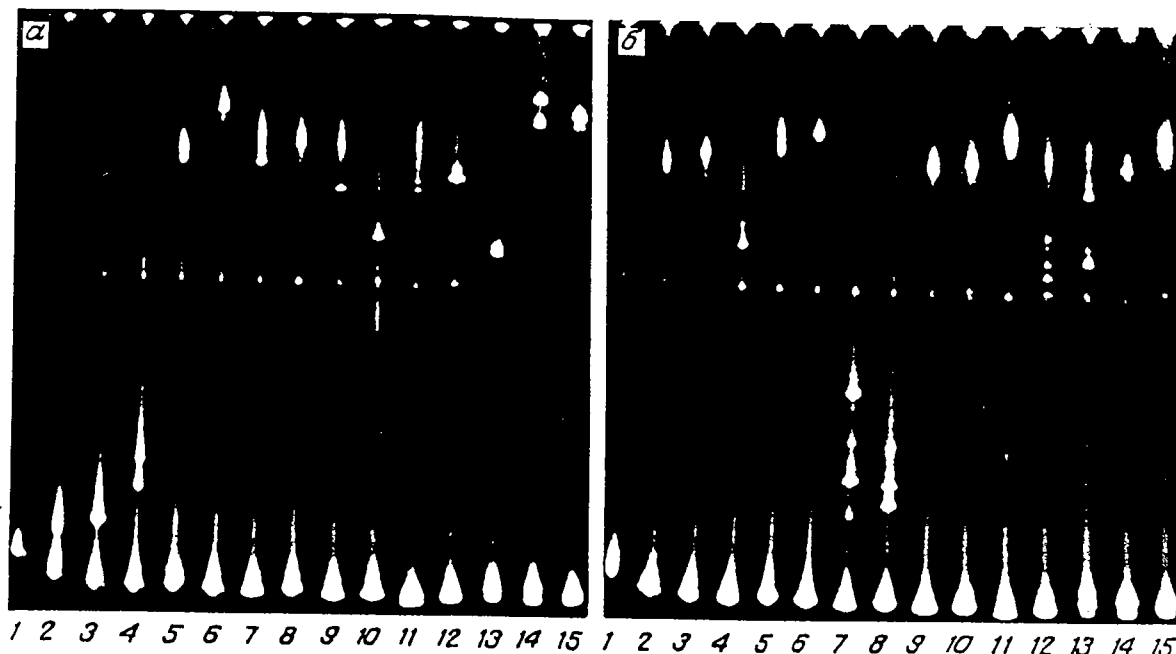


Рис. 1. Результаты анализа образцов RU19 (а) и RU2 (б) методом НМА-gag в 5% полиакриламидном геле с 20% мочевины. а: 1 — RU19; 2 — RU19/VI310 (А); 3 — RU19/С14 (А); 4 — RU19/LBV23-10 (А); 5 — RU19/TB132 (В); 6 — RU19/UG280 (В); 7 — RU19/DJ250 (С); 8 — RU19/VI313 (С); 9 — RU19/К31 (D); 10 — RU19/VI203 (D); 11 — RU19/BZ162 (F); 12 — RU19/VI174 (F); 13 — RU19/LBV21-7 (G); 14 — RU19/RU520 (G); 15 — RU19/VI525 (H); б: 1 — RU2; 2 — RU2/VI310 (А); 3 — RU2/С14 (А); 4 — RU2/LBV23-10 (А); 5 — RU2/TB132 (В); 6 — RU2/UG280 (В); 7 — RU2/DJ259 (С); 8 — RU2/VI313 (С); 9 — RU2/К31 (D); 10 — RU2/VI203 (D); 11 — RU2/BZ162 (F); 12 — RU2/VI174 (F); 13 — RU2/LBV21-7 (G); 14 — RU2/RU520 (G); 15 — RU2/VI525 (H).

наиболее подвижные гетеродуплексы со стандартами субтипа С (DJ259 и VI313) и, таким образом, принадлежит к этому субтипу (рис. 1, б).

Предлагаемый метод НМА-gag позволяет не только определять субтип соответствующей области гена gag, но и выявлять среди вирусов субтипа А 2 наиболее широко распространенных типа рекомбинантов AG_{bNG} и AE_{CM240} [9]. Из рис. 2, а, где приведены результаты сравнения электрофоретической подвижности в 5% полиакриламидном геле с 30% мочевины гетеродуплексов, образующихся между RU19 и другими стандартами субтипа А, следует, что этот образец относится к группе рекомбинантов AE_{CM240} [8].

Полученные нами результаты определения генотипов генов gag в 20 клинических образцах из Российского научно-методического центра по профилактике и борьбе со СПИДом суммированы в табл. 1. Видно, что результаты генотипирования полностью совпали с данными определения нуклеотидной последовательности указанной области генома ВИЧ-1 у данных изолятов. Более того, нам удалось однозначно типировать все 17 вариантов ВИЧ-1 контрольной панели, переданной в Институт вирусологии им. Д. И. Иванова РАМН из Бельгии (данные не приводятся), которая включала в себя изоляты субтипов А ($n = 2$), В ($n = 2$), С ($n = 3$), D ($n = 2$), F ($n = 1$), G ($n = 3$) и H ($n = 1$), а также рекомбинанты AG_{bNG} ($n = 2$) AE_{CM240} ($n = 1$). Таким образом, чувствительность и специфичность НМА-gag в наших условиях составляли 100%.

Ранее нами было показано, что на территории Российской Федерации циркулирует несколько вариантов рекомбинантных вирусов. Наиболее широко распространен рекомбинант с генотипом

gagAenvB, вызвавший вспышку среди наркоманов в Калининградской области [4, 11]. За пределами Калининградской области эпидемиологическое значение этого варианта ВИЧ-1 существенно ниже, хотя вызванные им вспышки регистрировались

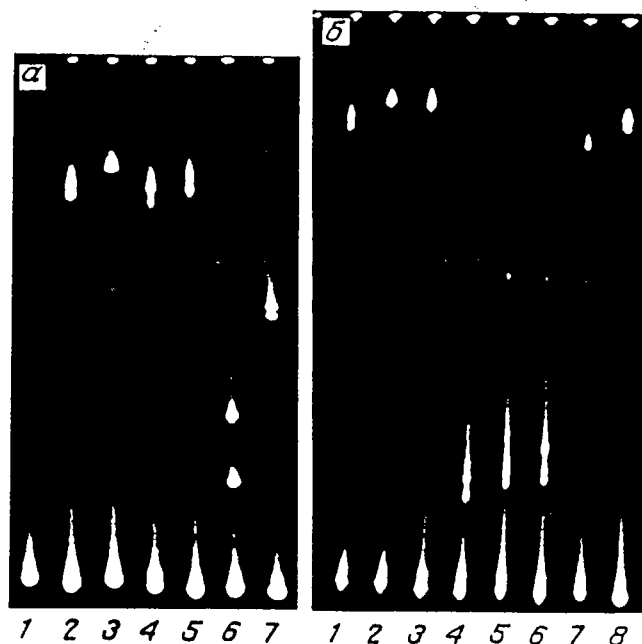


Рис. 2. Результаты анализа образцов RU19 (а) и RU1021 (б) методом НМА-gag в 5% полиакриламидном геле с 30% мочевины. а: 1 — RU19; 2 — RU19/С14 (А); 3 — RU19/VI57 (А); 4 — RU19/LBV23-10 (AG_{bNG}); 5 — RU19/DJ258 (AG_{bNG}); 6 — RU19/TN238 (AE_{CM20}); 7 — RU19/CA10 (AE_{CM20}); б: 1 — RU1021/С14 (А); 2 — RU1021/VI57 (А); 3 — RU1021/К29 (А); 4 — RU1021/LBV23-10 (AG_{bNG}); 5 — RU1021/DJ258 (AG_{bNG}); 6 — RU1021/С151 (AG_{bNG}); 7 — RU1021/TN238 (AE_{CM20}); 8 — RU1021/CA10 (AE_{CM20}).

Таблица 1

Сравнение результатов генотипирования методом НМА-gag вариантов ВИЧ-1, выделенных от граждан Российской Федерации, с данными определения нуклеотидной последовательности гена gag

Генотип гена gag	Результаты генотипирования	
	НМА-gag	определение нуклеотидной последовательности гена gag
A	4 (RU1, RU3, RU4, RU5)	4 (RU1, RU3, RU4, RU5)
AE _{СМ240}	1 (RU19)	1 (RU19)
B	3 (RU8, RU18, RU20)	3 (RU8, RU18, RU20)
C	3 (RU2, RU9, RU14)	3 (RU2, RU9, RU14)
D	3 (RU10, RU15, RU16)	3 (RU10, RU15, RU16)
G	5 (RU6, RU11, RU12, RU13, RU17)	5 (RU6, RU11, RU12, RU13, RU17)
H	1 (RU7)	1 (RU7)

и в других областях России [1, 13]. Кроме того, в нашей стране мы выявляли рекомбинантные вирусы с генотипами gagDenvG [5], gagAenvG, а также gagAenvE [3]. Последний характерен для вирусов, вызвавших эпидемию в Юго-Восточной Азии, и, по-видимому, является наиболее широко распространенным в мире вариантом ВИЧ-1 с мозаичной структурой [8]. С целью обнаружения новых рекомбинантных изолятов ВИЧ-1 мы провели с помощью НМА-gag анализ 20 вариантов ВИЧ-1, относящихся к субтипу А на основании генотипирования области гена env. Вирусы env-субтипа А были выбраны в связи с тем, что именно этот субтип доминирует в странах Центральной и Западной Африки [9], где частота образования рекомбинантов наиболее высока. Кроме того, в литературе имеются предварительные данные об обнаружении на территории Украины нового рекомбинантного вируса с генотипом gagBenvA [15]. Этот вариант был обнаружен в образцах крови, собранных в популяциях наркоманов Одессы в 1997 г. Используя новый метод генотипирования, нам удалось определить генотип гена gag у всех изученных вариантов ВИЧ-1, среди которых было 15 вирусов, выделенных в популяциях наркоманов Москвы, Иркутска, Ростова-на-Дону, Твери, Тюмени, Краснодара и Воронежа, а также 5 вирусов, обнаруженных у жителей Москвы, Перми и Твери, заразившихся половым путем (табл. 2).

Как следует из табл. 2, среди 20 изолятов env-субтипа А мы обнаружили только 1 рекомбинантный вирус RU1021. Результаты анализа электрофоретической подвижности гетеродуплексов в полиакриламидном геле с 30% мочевины показали, что RU1021 относится к группе рекомбинантов AG_{IbNG} (рис. 2, б). Вирус, получивший наименование IbNG, был выделен в 1994 г. в Нигерии и первоначально отнесен к субтипу А [10]. Анализ полной нуклеотидной последовательности генома этого вируса показал, что на самом деле он является вирусом со сложной мозаичной структурой [6, 8, 14]. Более того, позднее было показано, что вирусы с точно такой же мозаичной структурой циркулируют во многих странах Африки, а на территории Камеруна и Республики Кот-д'Ивуар являются, по-видимому, доминирующими вариантами ВИЧ-1 [9, 14]. Широкое распространение AG_{IbNG} позволило отнести этот вирус наряду с AE_{СМ240}, AG_{IСУ032} и рекомбинантом из Калининграда АВ_{Ка1153}, к так на-

зываемым циркулирующим рекомбинантным формам, т. е. к вирусам с характерной мозаичной структурой генома, получившим широкое распространение. Пациент RU1021 — мужчина 1959 года рождения, житель Москвы. Диагноз "ВИЧ-инфекция" был поставлен ему в 1991 г., при этом основным фактором риска заражения явились гетеросексуальные контакты с иностранцами, в том числе и с гражданами стран Африки. Ранее мы уже обнаружили на территории России рекомбинант А/С, однако структура его генома не позволяла отнести его к циркулирующей рекомбинантной форме AG_{IbNG}. Таким образом, в нашей стране выделено уже 2 рекомбинанта между вирусами субтипов А и С с различной структурой, а общее число рекомбинантных форм, выделенных нами в России, достигло 5.

С другой стороны, среди 15 образцов, относящихся к env-субтипу А, выделенных от наркоманов, мы не обнаружили вирусов с рекомбинантным генотипом gagBenvA. Ранее нами уже были исследованы нуклеотидные последовательности генов gag в 57 образцах, выделенных от ВИЧ-1-инфицированных наркоманов на территории Российской Федерации [1]. Принимая во внимание этот факт, а также то обстоятельство, что распространение вирусов в большинстве регионов России происходило взрывообразно, из общего источника заражения [1, 4], можно, по-видимому, предположить, что новый рекомбинантный вирус, обнаруженный в Одессе, не получил широкого распространения в нашей стране.

Таблица 2

Результаты генотипирования гена gag российских вариантов ВИЧ-1, по гену env относящихся к субтипу А¹

Код пациента	Пол	Город	Дата взятия крови	Главный фактор риска заражения ²	Субтип гена gag	Субтип гена env
RU1021	М.	Москва	07.02.95	Гтск	AG _{IbNG}	А
RU1136	М.	Тюмень	05.03.96	Прнт	А	А
RU1177	М.	Краснодар	12.06.96	Прнт	А	А
RU1183	Ж.	Ростов-на-Дону	09.07.96	Прнт	А	А
RU1246	М.	Ростов-на-Дону	01.04.97	Прнт	А	А
RU1266	М.	Ростов-на-Дону	24.06.97	Прнт	А	А
RU1273	М.	Тверь	15.07.97	Прнт	А	А
RU1291	М.	Москва	15.09.97	Прнт	А	А
RU1293	М.	Москва	18.09.97	Прнт	А	А
RU1295	М.	Воронеж	17.10.97	Прнт	А	А
RU1317	Ж.	Пермь	27.11.97	Гтск	А	А
RU1321	Ж.	Москва	16.12.97	Гтск	А	А
RU1337	М.	Тверь	26.03.98	Гтск	А	А
RU1338	М.	Тверь	26.03.98	Гтск	А	А
RU1527	М.	Иркутск	14.07.99	Прнт	А	А
RU1534	М.	Иркутск	14.07.99	Прнт	А	А
RU1547	М.	Иркутск	14.07.99	Прнт	А	А
RU1569	М.	Москва	17.04.99	Прнт	А	А
RU1572	М.	Москва	28.05.99	Прнт	А	А
RU1583	Ж.	Москва	23.04.99	Прнт	А	А

¹Определение субтипа гена env проводили с помощью НМА-env и определения нуклеотидной последовательности области участка гена env, кодирующего область С2-V3 gp120.

²Гтск — гетеросексуальные контакты, Прнт — внутривенное введение психотропных препаратов.

Таким образом, с помощью HMA-gag нам удалось генотипировать все 57 образцов, использованных в работе. Данный метод существенно расширяет возможности исследования изменчивости ВИЧ-1 и в сочетании с методом, предложенным ранее для гена env, является удобным подходом для поиска рекомбинантных форм вируса.

Работа финансировалась Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 99-04-48149), а также из средств комплексного проекта "СПИД".

ЛИТЕРАТУРА

1. Бобков А. Ф., Покровский В. В., Селимова Л. М. и др. Генетическая характеристика вариантов вируса иммунодефицита человека 1-го типа, вызвавших эпидемию среди наркоманов в странах СНГ // *Вопр. вирусол.* — 1998. — Т. 43, № 6. — P. 226—229.
2. Bobkov A., Cheingsong-Popov R., Selimova L. et al. Genetic heterogeneity of HIV type 1 in Russia: Identification of H variants and relationship with epidemiological data // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* — 1996. — Vol. 12. — P. 1687—1690.
3. Bobkov A., Cheingsong-Popov R., Selimova L. et al. HIV type 1 subtype E in Russia // *Ibid.* — 1997. — Vol. 13. — P. 755—727.
4. Bobkov A., Kazennova E., Selimova L. et al. A sudden epidemic of HIV type 1 among injecting drug users in the former Soviet Union: Identification of subtype A., subtype B, and novel gagA/envB recombinants // *Ibid.* — 1998. — Vol. 14. — P. 669—676.
5. Bobkov A., Kazennova E., Selimova L. et al. HIV type 1 gagD/envG recombinants in Russia // *Ibid.* — P. 1597—1599.
6. Carr J. K., Salminen M. O., Albert J. et al. Full genome sequences of human immunodeficiency virus type 1 subtypes G and A/G intersubtype recombinants // *Virology.* — 1998. — Vol. 247. — P. 22—31.
7. Delwart E., Shipper E. G., Louwagie J. et al. Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay analysis

- of HIV-1 env genes // *Science.* — 1993. — Vol. 262. — P. 1257—1261.
8. Gao F., Robertson D., Morrison S. G. et al. The heterosexual human immunodeficiency virus type 1 epidemic in Thailand is caused by an intersubtype (A/E) recombinant of African origin // *J. Virol.* — 1996. — Vol. 70. — P. 7013—7029.
 9. Heyndrickx L., Janssens W., Zekeng L. et al. Simplified strategy for detection of recombinant human immunodeficiency virus type 1 group M isolates by gag/env heteroduplex mobility assay // *Ibid.* — 2000. — Vol. 74.
 10. Howard T. M., Olayele D. O., Rasheed S. Sequence analysis of the glycoprotein 120 coding region of a new HIV type 1 subtype A strain (HIV-11bNG) from Nigeria // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* — 1994. — Vol. 10. — P. 1755—1757.
 11. Liitsola K., Tashkinova L., Laukkanen T. et al. HIV-1 genetic subtype A/B recombinant stln causing an explosive epidemic in injecting drug users in Kaliningrad // *AIDS.* — 1998. — Vol. 12. — P. 1907—1910.
 12. Loussert-Ajaka L., Menu E., Apetrei C. et al. HIV type 1 diversity and the reliability of the heteroduplex mobility assay // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* — 1998. — Vol. 14. — P. 877—883.
 13. Lukashov V. V., Huismans R., Rakhmanova A. G. et al. Circulation of subtype A and gagA/envB recombinant HIV type 1 strains among injecting drug users in St. Petersburg, Russia, correlates with geographical origin of infections // *Ibid.* — 1999. — Vol. 15. — P. 1577—1583.
 14. McCuichan F. E., Carr J. K., Bajani M. et al. Subtype G and multiple forms of A/G inter-subtype recombinant human immunodeficiency virus type 1 in Nigeria // *Virology.* — 1999. — Vol. 254. — P. 226—234.
 15. Novitsky V. A., Montano M. A., Essex M. Molecular monitoring of AIDS epidemic in the southern Ukraine revealed that HIV-1 infections among IDU were caused by subtypes A, B, and A/B recombinant. // *International Symposium on HIV, Leukemia, and Opportunistic Cancers. Twentieth Symposium of the International Association for Comparative Research on Leukemia and Related Diseases (LACRLRD).* — Marrakech, Morocco. — May 23—28, 1999. — Abstr. 68.

Поступила 17. 04. 2000

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2001
УДК 578.833.29:578.1].083.2

Л. В. Гмыль, Г. Г. Карганова, С. Е. Смирнова, В. А. Лашкевич

Вирусспецифические белки вируса Крымской—Конго геморрагической лихорадки

Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова РАМН, Москва

Для анализа синтеза вирусспецифических белков и белкового состава вирионов использовали адаптированный к культуре клеток Vero-E6 вариант азиатского штамма Ходжа вируса Крымской—Конго геморрагической лихорадки (Ходжа-А), дающий сравнительно высокие урожаи в этой культуре клеток. С помощью иммунопреципитации с гипериммунной асцитической жидкостью и электрофореза в полиакриламидном геле в лизатах инфицированных клеток были выявлены мажорные вирусспецифические белки с мол. массами 110, 83, 78, 55, 57 и 45 кД и минорные низкомолекулярные белки с мол. массами 42, 36, 23 и 21 кД. Наблюдалось включение меченых сахаров в белки с мол. массами 110, 83, 78, 55—57 кД. С использованием туникамицина показано, что gp83 и gp78 гликозилированы по N-типу. В культуральной жидкости инфицированных клеток, а также в препаратах очищенных вирионов после ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахаразы обнаружены вирусные белки с мол. массами 83, 78, 55, 57 и 45 кД. В препаратах очищенных нуклеокапсидов выявлены 2 белка с мол. массами 55—57 и около 180 кД.

Ключевые слова: вирус Крымской—Конго геморрагической лихорадки, белки, гликопротеины, нуклеокапсидный белок

A variant of Asian strain Hodzha of Crimean-Congo hemorrhagic fever (Hodzha-A), adapted to Vero-E6 culture and yielding high harvest in it, was used for analysis of the synthesis of virus-specific proteins and protein composition of virions. Major virus-specific proteins with mol. weights 110, 83, 78, 55, 57, and 45 kD and minor low-molecular-weight proteins of 42, 36, 23, and 21 kD were detected by immunoprecipitation with hyperimmune ascitic fluid and polyacrylamide gel electrophoresis in infected cell lysates. N-type glycosylation of gp83 and gp78 was shown using tunicamycin. Viral proteins with mol. weights of 83, 78, 55, 57, and 45 kD were detected in infected cell culture fluid and in purified virion preparations after ultracentrifugation in sucrose density gradient. Two proteins with mol. weights 55-57 and about 180 kD were detected in purified nucleocapside preparations.

Key words: Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, proteins, glycoproteins, nucleocapside protein